

BPA'S HORMONFORSTYRRENDE EFFEKTER

BPA's endocrine disrupting effects

Afleveres: 30/05 2016

2. Semester – Nat-Bach, Roskilde Universitet



Gruppe 4

*Signe Vedel Borchert, Josefine Tange Møller,
Cecilie Bøving Magnussen og Mads Teglhuis Henriksen*

Vejleder: Per Homann Jespersen

Indholdsfortegnelse

Resume.....	3
Abstract.....	4
Forord.....	5
Ordliste.....	6
Indledning	7
Semesterbinding.....	10
Problemformulering.....	11
Metode	11
Hormoner	14
Transport af hormoner	14
Hormoners virkning gennem cellulære receptorer.....	15
Regulering af hormonfrigivelse	16
Undergrupper af hormoner.....	18
Steroider	18
Hormonforstyrrende stoffer	22
Østrogenlignende effekt.....	23
Risikovurdering til fastsættelse af grænseværdier	24
Kombinationseffekt (Cocktaileffekt)	25
Dosis-respons	26
Terapeutisk indeks og bredde	28
Bisphenol A.....	28
Hvad er BPA	29
BPA's hormonforstyrrende effekt ved binding til receptorer	30
Konsekvenser ved eksponering af BPA.....	33
Konsekvenser hos hunkønnet.....	34
Reproduktive skader	35
Tidlig pubertet.....	36
Brystkræft.....	36
Konsekvenser hos hankønnet.....	37
Skader på reproduktive funktioner.....	37
Hvordan eksponeres vi for BPA	40
Overførsel af BPA til madvarer	41
Absorbering af BPA til huden.....	42
I hvor høj grad er vi eksponeret for BPA?	43

Grænseværdier for BPA i produkter	43
YES-assay	44
YES-assay som model	44
YAS-assay.....	46
Ekspimentel del – XenoScreen YES/YAS	46
Databehandling fra XenoScreen YES/YAS.....	48
Kvalitativ behandling af data fra YES agonist og YES antagonist.....	49
Kvantitativ behandling af data fra YES agonist og YES antagonist.....	50
Diskussion.....	54
Forsøgsresultater fra YES	56
YES-assay som metode.....	57
Modelanvendelse og god videnskab inden for hormonforstyrrende stoffer	59
Toksicitet og hormonforstyrrende effekt	61
Dosis-responsammenhænge som toksikologisk vurderingsmetode ift. BPA.....	62
Lavdosismekanismer.....	66
Substitueret af BPA med andre stoffer	70
Konklusion.....	73
Perspektivering: Relevansen af BPA som casestudie og BPA's rolle i debatten om sikkerhedsvurderingen af hormonforstyrrende stoffer.....	74
Litteraturliste.....	77
Bilag.....	82
Bilag 1	82
Bilag 2	83
Bilag 3	84
Bilag 4.....	84
Bilag 5.....	86
Koncentrationer for BPA og kontrolkemikalier med tilhørende absorptions	108

Resume

Formålet med dette projekt er at undersøge, hvad der sandsynliggør, at bisphenol A (BPA) har en hormonforstyrrende effekt, og hvilken betydning eksponering for kemikaliet kan have for human sundhed. Til disse formål er der redegjort for teori om hormoner og hormonforstyrrende stoffer. Hormoner kontrollerer mange af kroppens processer, f.eks. har kønshormoner indflydelse på kroppens udvikling af køns karakteristika og reproduktive funktioner. Kemikalier som BPA er i stand til at vekselvirke med endogene hormoner i det endokrine system, og de kaldes derfor hormonforstyrrende. Den hormonforstyrrende effekt af BPA er hovedsageligt østrogenlignende, bl.a. ved BPA-molekylets evne til at binde sig til de humane østrogenreceptorer, ER. En hormonforstyrrende effekt af BPA kan sandsynligvis føre til en lang række sundhedsmæssige konsekvenser i mennesker, hvoraf de mest signifikante er nedsat fertilitet hos både mænd og kvinder samt øget incidens for kræfttyper som bryst- og prostatakræft. Dette er problematisk set i lyset af, at human BPA-eksponering er allestedsværende. Anvendelsesområderne er alsidige, blandt dem er fødevarebeholdere og termisk papir, og produktionen er omfangsrig. Det vurderes, at alle mennesker generelt set har målbare niveauer af BPA i kroppen.

Udbredt human eksponering er problematisk, da ikke-monotone dosis-responskurver og lavdosis effekter er observeret i talrige studier. Ved regulering af kemikalier som BPA anvendes toksikologiske teorier og metoder, der estimerer de biologiske effekter ved lave doser ud fra observerede effekter ved høje doser, da det antages at dosis-responskurven er monoton. Studierne af BPA sår tvivl om validiteten af sikkerhedsvurderingen af BPA og hormonforstyrrende stoffer. Det kan betyde, at grænseværdierne for BPA er ukorrekte. Reguleringspraksissen for hormonforstyrrende stoffer bør reevalueres, da ændringer kan være nødvendige for at værne om den humane sundhed.

Et YES-assay er anvendt som model til at illustrere BPA's østrogenlignende effekt, hvor genmodificerede gærceller blev eksponeret for BPA. I projektets eksperimentelle del sås, at kontrollerne for hhv. YES agonist og antagonist gav et forventet udslag med farveskift fra gul til rød. Det indikerer en østrogen virkningsmekanisme ved binding til ER- α . Prøverne med BPA viste delvist østrogenlignende effekt. YES-assay kan benyttes som en standardmetode til påvisning af stoffers østrogenlignende effekt. YES-assay-metoden er ikke egnet til at undersøge sundhedskonsekvenserne af eksponering for kemikalier med østrogenlignende effekter i hele organismer som mennesker. Til dette formål er dyremodeller som rotter og mus egnede, da der er endokrine ligheder arterne imellem.

Abstract

The purpose of this project is to examine the plausibility of an endocrine disrupting effect of bisphenol A (BPA), and the chemical's potential impact on human health. For these purposes, the theory of hormones and endocrine disruptors is outlined. Hormones control many bodily processes, as an example sex hormones influence the development of sex characteristics and reproductive functions. Chemicals like BPA are able to interact with the endogenous hormones in the endocrine system; therefore, they are referred to as endocrine disruptors. The endocrine disrupting effect of BPA is mainly estrogen mimicking, through the ability of BPA molecules to bind to the human estrogen receptors ER. An endocrine disrupting effect of BPA can likely lead to a number of health related consequences in humans. The most significant consequences are impaired fertility in men and women as well as an increased incidence for breast and prostate cancer. This is problematic in regard, to the ubiquitous nature of BPA exposure. The areas of BPA usage is versatile, among them are food containers and thermic paper, and the production is extensive. It is estimated that all humans have detectable levels of BPA in their bodies.

Non-monotonic dose-response curves and low dose effects are observed in numerous studies, which makes the extensive human exposure problematic. Toxicological theories and methods is employed when chemicals like BPA is regulated. They estimate the biological effects resulting from low doses from observed high dose effects, based on the presumption that the dose-response curve is monotonic. The BPA studies question the validity of BPA safety assessments and endocrine disrupting chemicals and could mean that the safety limits of BPA is incorrect. The regulatory practice for endocrine disrupting chemicals should be reevaluated to ensure that human health is safeguarded.

A YES-assay is used as a model to illustrate the estrogen mimicking effect of BPA and genetically modified yeast cells was exposed for BPA. In the experimental section of the project, the controls for YES agonist and antagonist showed the expected color change from yellow to red, indicating an estrogen mechanism of action through binding to ER α . The samples with BPA partially showed an estrogen mimicking effect. YES-assay is not a suitable method for examining the health consequences of exposure to chemicals with estrogen mimicking effects in entire organisms like humans. For this purpose, animal models like rats and mice is suitable as there is endocrine similarities across the species.

Forord

I udarbejdelsen af projektet har et vigtigt element været vores eksperimentelle arbejde med YES-assay, hvor vi har fået hjælp fra forskellige folk fra RUC.

Først og fremmest vil vi gerne takke Kristian Syberg, som tidligt i vores projekt gav os indsigt i muligheden for YES-assay, og som har været med gennem udarbejdelsen af forsøget. Endvidere vil vi takke Martin Niss og Morten Blomhøj, som begge har været en stor hjælp til at trække i tråde, så vi kunne få bevilliget midler og laboranthjælp. Tillige vil vi takke Lotte Jelsbak og hendes laborant Anette Jensen, som har stillet laboratorie til rådighed for os og hjulpet os med at igangsætte forsøget og supervisere os under forløbet. Rikke Guttesen vil vi takke for at være vores laborant, som har hjulpet os med den kemiske del, fået bestilt vores kemikalier og hjulpet os gennem vores arbejde i laboratoriet og superviseret os gennem samtlige pippeteringer.

Sidst men ikke mindst vil vi takke vores vejleder Per Homann Jespersen, som gennem hele projektet har været en stabil vejleder, som hele tiden har formået at hjælpe os med at finde vores vej gennem projektet, samt været aktiv i planlægning og udarbejdelse af vores forsøg.

Ordliste

Additiv effekt: Kemikaliernes effekt vil i kombination ikke forandres

Ano-genital afstand: Afstand fra anus til kønsdele

CPRG: Chlorophenolred- β -D-galactopyranoside, hvilket er gult substrat i YES

Detektionsgrænsen: Det er den laveste koncentration, som er mulig at måle. Hvis et målt indhold ligger over denne grænse, så er det overvejende sandsynligt, at indholdet / stoffet forekommer i prøverne

DHT (5 α -dihydrotestosterone): Det er et mandligt kønshormon

E2 (17 β -estradiol): Kvindeligt kønshormon, østrogen

Follikel: Celler der omringer kvindens æg i kvinden under meiose. De kan ses som hjælpeceller under modningen.

FL (Flutamide): Fungere som antagonist på androgen-receptorer, konkurrerer med androgener.

FSH: Follikelstimulerende hormon

Føtal: Fostertilstand

HT (4-hydroxytamoxifen): Det er et stof, som virker på østrogenreceptorer

Hypospadi: Ufuldstændig dannelse af mandlige kønsorganer

In vitro: Forsøg eller observationer foretaget på væv uden for den levende organisme i et kontrolleret miljø – ofte i petriskåle eller reagensglas.

In vivo: Forsøget eller observationer er gjort på levende væv af hele organismen i et kontrolleret miljø – enten i organismens naturlige miljø eller i selve organismen.

Kryptorkisme: Mangelfuld nedsynkning af testikler

Karcinogenese: Tumor og kræftudvikling

Letal: Dødelig

Ligand: Det er et molekyle, som er i stand til at binde sig til og danne et kompleks med et andet biomolekyle for et bestemt formål eller respons.

LOEC: Laveste koncentration, hvor der er observeret effekt.

NOEL: Koncentration hvor organismen bliver mindst muligt skadet af kemikaliet.

Prænatal: Før fødslen

Synergi: Eksponering af flere kemikalier kan forstærke kemikaliets hormonforstyrrende virkning på kroppen.

Xenohormon: Naturligt forekommende eller kunstigt skabte stoffer, som besidder hormonlignende egenskaber

Xenoøstrogen: Stoffer med østrogenlignende effekt, såsom BPA

Indledning

Hormonforstyrrende stoffer står i rampelyset i en omfattende diskussion om menneskers sundhed og reproduktion, da de kan påvirke hormonbalancen i mennesker. Men hvorfor bør disse stoffer være af interesse for almindelige mennesker? Hvorfor skal vi som individer bruge tid på at være opmærksomme på og bekymre os om eksponering for hormonforstyrrende stoffer? Vi mener svaret er simpelt. Eksponering for hormonforstyrrende stoffer er under kraftig mistanke for blandt andet at have store konsekvenser for en helt central og essentiel del af den humane biologi; fertilitetsevnen og dermed evnen til at reproducere.

Mistanken har bevirket, at der i løbet af de seneste årtier er kommet stort fokus på og diskussion omkring hormonforstyrrende stoffer. Foruden sammenkædningen mellem hormonforstyrrende stoffer og fertilitets- og reproduktionsmæssige sundhedsproblemer er der indikationer på, at human eksponering for disse kemikalier kan resultere i øget risiko for potentielt livstruende sygdomme som bryst- og prostatakraft, samt autoimmune sygdomme, m.fl. Hvis fertilitetsevnen anskues, er billedet tydeligt; fertiliteten er på retræte. Og samtidigt er incidensen for bryst- og testikelkraft voksende. Undersøgelser fra Danmark, Finland og USA viser, at testosteronniveauet hos mænd har været faldende siden 1980'erne (Danmarks Statistik, 2014). Incidensen for testikelkraft vokser på verdensplan, mindst i udviklingslande som Zimbabwe og mest i vestlige lande som Danmark (Shanmugalingam, Soultati, & M.fl., 2013). En omfattende undersøgelse fra 2012 af danske mænds sædkvalitet viste, at 3 ud af 4 mænd havde nedsat sædkvalitet. I den forbindelse udtalte hovedforfatter og overlæge på Rigshospitalets afdeling for Vækst og Reproduktion, Niels Jørgensen, at *"der er grund til at være bekymret for unge danske mænds fremtidige fertilitet"* (Ebdrub, 2014). For kvinder er tendensen enslydende. Eksempelvis har antallet af nye brystkræfttilfælde blandt danske kvinder været stigende de sidste 60 år (Hansen, Kejs, & M.fl., 2015).

Årsagerne til de nævnte fertilitetsudfordringer og væksten i kræfttilfælde kan naturligvis være mange. Men fælles for dem alle er en tæt relation til hormonelle faktorer, og det er derfor relevant at se på hormonforstyrrende stoffers effekt hos mennesket.

Når hormonforstyrrende stoffer mistænkes for at kunne påvirke fertilitetsevnen, bliver emnet af yderste relevans for mennesker, både ud fra et menneskeligt og biologisk synspunkt. Fra et menneskeligt synspunkt må man kunne antage, at evnen til at få børn er af signifikant betydning for

størstedelen af verdens befolkning. På tværs af verdensdele, kulturer og sociale lag ønsker de fleste individer at sætte børn i verden. Hvis hormonforstyrrende stoffer forringer fertilitetsevnen, betyder det, at også den personlige frihed forringes. Fra et biologisk perspektiv er det logisk at antage, at mennesket som helhed ønsker at få børn. Instinktivt ønsker vi at få børn for at videreføre arten. Når det handler om at videreføre en art, gælder evolutionære, selektive spilleregler - jo bedre evne til at få velfungerende afkom, jo bedre evne vil arten have til at overleve og udbrede sig. Reproduktion og fertilitet er altså altafgørende for en arts evolutionære succes. Og så behøver man ikke meget naturvidenskabelig forståelse for at kunne resonere sig frem til, at en forringet reproduktionsevne og nedsat fertilitet indiskutabelt betyder en forringet overlevelsessevne som art.

Den yderste konsekvens af en forringet reproduktionsevne hos mennesker kunne være, at evnen til at få børn bliver så dårlig, at det i praksis bliver tæt på umuligt at få afkom. Uden evnen til at reproducere uddør menneskearten. Det skal indrømmes, at det er et urealistisk skrækscenarie af en fremtidsforudsigelse, der ikke har meget hold i virkeligheden, som alt ser ud i dag. Men ikke desto mindre er der leget med tanken om en postapokalyptisk verden, hvor alle kvinder er ufrugtbare, i populærkulturen. Dog ville det være ignorant blankt at afvise, at fertiliteten bliver så dårlig, at mennesker på længere sigt får meget svært ved at få børn på den naturlige måde, så flere og flere børn bliver skabt i et reagensglas eller i et laboratorium. Derfor bør al forringelse af den humane reproduktionsevne bør give grund til bekymring, både fra et evolutionært og personligt perspektiv; det rammer simultant den personlige frihed og vores succes som art, hvilket vi finder yderst interessant.

I sagen om hormonforstyrrende stoffer, er det især østrogenlignende effekter, der lægger grund til bekymring. Der er gennem det seneste halve århundrede sket en stigning i forekomsten af fejlfunktioner i hanlige kønsorganer, både hos mennesker og dyr i naturen. I samme periode har man set, at forskellige kemikalier, som vi anvender og dermed udsættes for i dagligdagen på forskellig vis, er i stand til at vekselvirke med funktionen af vores egne kønshormoner. På den måde kan de forstyrre kroppens egen hormonbalance med forskellige konsekvenser til følge. Heraf opstillede Sharpe og Skakkebæk i 1993 østrogenhypotesen, som påstod, at årsagen til fejludviklingerne i hanlige kønsorganer kunne være, at fostrene tidligt i deres udvikling blev udsat for usædvanlige mængder af det kvindelige kønshormon østrogen eller andre stoffer med samme virkning (Bjerregaard, 2013, s. 167). Hormonforstyrrende stoffer er på baggrund af denne hypotese

blevet et centralt emne i sundhedsdebatten, og der er især fokus på østrogenhypotesens fokuspunkt; kemikalier med østrogenlignende effekter.

Et sådan kemikalie er bisphenol A (BPA), som er et industrielt fremstillet stof med mistænkt hormonforstyrrende effekt. De mest betydelige anvendelsesområder af BPA er i fremstillingen af belægningen inde i dåser og ved fremstilling af polycarbonat til plastik, og BPA er i dag vidt udbredt og en stor industri (EuropeanCommission, 2015) (Aster, 2014). Det store omfang af BPA-anvendelsen i plastindustrien samt viden om, at de mest almindelige anvendelsesområder indebærer direkte kontakt mellem BPA og fødevarer, giver anledning til bekymring, set i lyset af, at BPA har en hormonforstyrrende effekt. Derfor er der stort fokus på at undersøge, hvilke konsekvenser human eksponering for BPA kan have.

Der er påvist mekanismer og kemiske egenskaber, der danner tydeligt indicium for at antage, at der er en sammenhæng mellem BPA-eksponering og sundhedskonsekvenser. Men for med relativ sikkerhed at kunne estimere, hvilke konsekvenser eksponering for BPA har for mennesker, er vidensgrundlaget endnu ikke sufficient. I den forbindelse bliver eksperimentelt arbejde med modeller centralt. Modelanvendelse er afgørende for at kunne undersøge potentielt hormonforstyrrende stoffer, da studier med mennesker i vid udstrækning ikke er en mulighed. I stedet benyttes forsøgsmetoder, der anvender dyr, gærceller, m.v. De anvendes som modeller for et kemikalies hormonforstyrrende virkningsmekanismer.

Til det formål er det nødvendigt at have pålidelige, tilgængelige og grundige videnskabelige undersøgelsesmetoder, hvilket gør undersøgelsesmetoden YES-assay (Yeast Estrogen Assay) relevant i dette projekt. Når vi i så høj grad er afhængig af modeller for at kunne påvise effekt og konsekvenser, er vi også forpligtet til at forholde os kritisk til dem. For dette projekt betyder det, at en diskussion af YES-assayet som model er vigtig.

Hvis et kemikalie har fået påvist en østrogenlignende effekt, er det essentielt at beskrive og definere molekyllære processer, der ligger til grund for den østrogenlignende effekt, sundhedsmæssige konsekvenser, og størrelsen af en toksisk dosis. Men hvis man skal diskutere toksiciteten af hormonforstyrrende stoffer, opstår der udfordringer.

Fra videnskabsmanden Paracelsus (1493-1541) stammer toksikologiens klassiske doktrin; ”*all substances are poison; there is none which is not a poison. The right dose differentiates a poison from a remedy*” (Rank, 2013). Denne generalisering er ofte grundstenen i toksikologiens tankegang og udgangspunktet for bestemmelse af det pågældende kemikalies toksicitet. Toksicitet hænger desuden tæt sammen med at definere grænseværdier og finde dosisresponsammenhænge. De danner vidensgrundlag for at kunne lovgive på området, og lovgivningsfastsatte forholdsregler er yderst vigtige i forsøget på at minimere sundhedsrisikoen. Men det er udfordrende regulativt at fastsætte definitivt korrekte værdier for BPA og lignende kemikalier ud fra toksikologien. Det skyldes, at toksicitet og hormonforstyrrende effekt ikke er analoge til hinanden, og at der er indikationer på, at BPA afviger fra den klassiske toksikologiske teori, der dikterer, at jo højere dosis, jo større resulterende, biologiske konsekvenser. Reguleringsmæssige og toksikologiske udfordringer ved BPA bevirker, at kemikaliet er et oplagt eksempel at tage udgangspunkt i.

Udfordringerne betyder også, at sundhedskonsekvenserne af eksponering for BPA diskuteres i medier, blandt forskere og i lovgivende myndigheder, men på trods af en omfattende mængde forskning og igangværende forskningsprojekter, er det lidt, man med relativ sikkerhed kan sige om, hvilken sundhedsfare eksponering for BPA og andre hormonforstyrrende stoffer udgør.

Det betyder, at det eneste, vi reelt har på nuværende tidspunkt er en mistanke om og frygt for, hvilke konsekvenser hormonforstyrrende stoffer kan have. Men mistanken er bestemt substantiel og stadig voksende. For selvom mange spørgsmål mangler at blive besvaret, er eksponeringen for BPA og hormonforstyrrende stoffer af et betragteligt omfang, og effekterne af disse stoffer ser stadig større, mere komplekse og vidtrækkende ud. Det betyder, at det er en mistanke, som skal tages særdeles alvorligt.

Semesterbinding

Semesterbindingen er i dette semester ”Samspil mellem teori, model, eksperiment og simulering i naturvidenskab”. Vi ser semesterbindingen i vores projekt i, at vi har teori om hormoner, hormonforstyrrende stoffer, som dækker baggrunden for vores model, som er YES-assay. Dette bruges som model til undersøgelse af østrogenlignende effekt, hvor rollen i vores projekt er, at det skal illustrere, at BPA har østrogenlignende effekt. Yderligere bruges YES-assay også som eksperiment i projektet, hvor gærceller eksponeres for BPA, hvilket efter hensigten giver udslag for østrogenlignende effekt.

Problemformulering

Hvilke problemstillinger om den humane sundhed rejses i forbindelse med eksponering af det hormonforstyrrende stof bisphenol A, og hvordan kan YES-assay bruges som model for påvisning af stoffers østrogenlignende effekt med fokus på bisphenol A?

Underspørgsmål

- Kan vi påvise BPA's østrogenlignende effekt ved benyttelse af YES-assay?
- Hvilke problemer er der ved fastsættelse af grænseværdier og lavdosis effekt ved BPA?

Metode

For at besvare opgavens problemformulering vil vi arbejde med hormonforstyrrende stoffer med fokus på BPA, hvilke biologiske konsekvenser BPA mistænkes at have og undersøge YES-assays evne som model til indikation af østrogenlignende effekt. Vi har valgt at benytte BPA i dette projekt, da det har sat gang i et paradigmeskifte indenfor miljømæssig sundhedsvidenskab og kemikaliesikkerhed (Vogel, 2009).

Projektet indledes med baggrundsviden, som er aktuel for at kunne sætte os ind i problemstillingen om BPA's mulige konsekvenser for den humane sundhed. Indledningsvis behandles teorien bag kroppens endokrine system, hormoner og disses påvirkning af forskellige processer i kroppen. Det er vigtigt at forstå teorien om hormonsystemet for at kunne forstå, hvordan BPA kan interagere med kroppens naturlige hormoner. Dette projekt fokuserer primært på østrogen og testosteron, da disse er blandt de mest omtalte i forbindelse med østrogenlignende effekter, men andre hormoner som progesteron kunne også være aktuelt. Til redegørelsen for hormonsystemet har vi primært benyttet fagbøger og videnskabelige artikler, som har faglig validitet. Vi har gennem arbejdet forholdt os kritisk til materialet og undersøgt validiteten ved blandt andet at læse teorien fra flere forskellige troværdige kilder.

For at forstå hvad BPA er, behandler vi dernæst, hvad hormonforstyrrende er, herunder betydningen af østrogenlignende effekt. Desuden arbejdes der med grænseværdier, dosis-respons effekt og kombinationseffekt. Dette er hele grundlaget for behandlingen af BPA og dets virkningsmekanismer, som er helt essentielt for at forstå, hvilke konsekvenser BPA mistænkes for at have. Til at undersøge hvilke konsekvenser BPA har hos mennesker, har vi brugt videnskabelige artikler, som er lavet på baggrund af forsøg, hvor dyr eller mennesker har været udsat for BPA. Vi

har benyttet flere forsøg med dyr, da der endnu er lavet flest forsøg på dyr til undersøgelse af konsekvenser ved BPA. På det seneste er der dog sket en stigning i epidemiologiske undersøgelser af BPA's effekt hos mennesker, hvor vi har valgt at benytte nogle af dem, som har mest relevans og faglig evidens. Som udgangspunkt var vores ide, at vi primært ville arbejde med konsekvenser i forbindelse med problemer med kønsdifferentiering og reproduktion. Igennem arbejdet har vi i materialesøgningen om kønsdifferentiering på blandt andet RUC-Summon og NCBI, hvor vi har søgt på ord som "BPA influence at sexual differentiation" og "Problems sexual differentiation BPA" haft svært ved at finde fyldestgørende undersøgelser og brugbart materiale om kønsdifferentiering. Af den grund har kønsdifferentiering en lille rolle i projektet. Derimod fandt vi ud af, at kræft i stedet var meget aktuelt, og vi fandt flere undersøgelser om dette. Vi har derfor valgt at fokusere på kræft, herunder bryst- og testikelkræft. En vigtig pointe i behandlingen af konsekvenser ved BPA er, at det endnu er sandsynliggjort, hvorvidt BPA rent faktisk har skadelige konsekvenser hos mennesker, da der ikke er tilstrækkelig evidens for dette. Vi har derfor gennem hele udarbejdelsen været meget opmærksomme på ikke at konkludere noget.

Hele forståelsen for hormoner og hormonforstyrrende stoffer leder op til projektets eksperimentelle del, hvor der laves YES-assay, som er en eksperimentel metode for påvisning af østrogenlignende virkning hos kemikalier. Parallelt til vores YES-assay har vi valgt at lave YAS-assay, da det er interessant at se, hvordan de to metoder virker parallelt. Desuden kan YAS-assay bruges til kontrol af YES-antagonist forsøget. Vi har valgt, at YES-assay har den primære rolle af de to assays i vores projekt. Vi fokuserer derfor langt hen ad vejen kun på YES-assay. Vi har dog lavet et kort afsnit under YES-assay, hvor der vil være en introduktion af YAS-assay. Yderligere vil vi vise vores data for YAS-assay, men vi vil ikke kommentere yderligere på dem. YES-assay spiller derimod en mere central rolle. YES benyttes som model til at illustrere den østrogenlignende effekt ved kemikalier, hvor vi har valgt at teste BPA. Forsøget er lavet sent i arbejdsprocessen, da det har været en omstændelig proces at få fundet laboranthjælp og midler til forsøget. Vores oprindelige ide med forsøget var at køre tre forsøgsrunder. Den første forsøgsomgang skulle være en test, hvor vi afprøvede metoder og koncentrationer. I anden omgang kunne vi korrigere for eventuelle fejlkilder og usikkerheder. I tredje runde ville vi have undersøgt forskellige BPA-holdige-fødevarer beholdere for at undersøge eventuelle østrogenlignende effekter ved prøver fra disse beholdere. I stedet køres en forsøgsrunde, hvor vi undersøger forskellige koncentration af rent BPA. For at være sikre på at benytte koncentrationer, som vil give udslag i vores forsøg, har vi læst forskellige forsøg med YES-

assay og BPA for at se, hvilke koncentrationer af BPA der skal til for at give effekt. For at forstå og udføre YES-assay har vi først beskrevet teorien om YES-assay generelt, herunder en kort introduktion til YAS-assay. Herefter introducerer vi deres rolle som eksperiment i vores projekt.

Slutteligt diskuterer vi vores forsøg og de resultater vi har fået, hvilket vi gør ud fra både kvantitative og kvalitative resultater. Desuden er det relevant at se på YES-assay som model – er det brugbart og hvilke fordele og ulemper er der? Desuden benytter tidligere omtalte dosis responssammenhænge og grænseværdier til at diskutere reguleringen af grænseværdier for BPA og lignende kemikalier ud fra monotone eller ikke-monotone dosis respons sammenhænge, hvor lavdosis kommer i spil. Afslutningsvis diskuteres substituering af BPA ud fra, hvilke egenskaber BPA har, og hvad et nyt stof kan kunne for at kunne erstatte BPA.

Hormoner

Komplekse organismer har to interne kommunikationssystemer; nervesystemet og hormonsystemet. Nervesystemet er specialiseret til hurtige og kortsigtede kontroller, som sker på korte afstande over eksempelvis synapsekløfter. Hormonsystemet, også kaldet det endokrine system, er målrettet til de mere længerevarende reguleringer og kontroller af kroppens funktioner, både korttids- og langtidsreguleringer af metaboliske processer (Bjerregaard, 2013, s. 167). Hormoner er små molekyler eller proteiner, der bruges til kommunikation i det endokrine system, hvor deres opgave er at integrere og koordinere metaboliske aktiviteter mellem organer og væv i forskellige dele af kroppen, hvor de på den måde optimerer tildelingen af brændstoffer til alle organer (Cox & Nelson, 2013, s. 929). Stort set alle processer i komplekse organismer er styret af hormoner. Det er alt lige fra blodtryk og elektrolytbalance til seksuel differentiering og reproduktion (Cox & Nelson, 2013, s. 929). Hormoners funktioner kan groft deles op i tre kategorier, men et hormon kan godt have flere af disse virkemåder (Ipsen & M.fl., 2014, s. 75):

- Kroppens bevægelse
- Omsætning af næringsstoffer i cellerne
- Kroppens vækst og udvikling af organer og væv.

Hormoner produceres i kroppens endokrine kirtler, som går under fællesbetegnelsen det endokrine system, hvor nogle af de vigtigste endokrine kirtler hos pattedyr er hypofysen, skjoldbruskirtlen og kønskirtlerne, herunder testikler og æggestokke (Bjerregaard, 2013, s. 167). Hormonerne er oplagret i de hormonproducerende celler, hvor de er koncentreret i sekretkorn, som er placeret lige under cellemembranen. Når hormonerne skal frigives, sker der en stimulering af hormoncellen, hvor sekretkornets membran smelter sammen med cellemembranen.

Transport af hormoner

Efter hormonerne frigives fra cellen eller kirtlen skal de transporteres ud til det pågældende væv eller organ, hvor de skal have en effekt. Hormonerne kan deles op efter, hvordan de efter frigivelse transporteres til deres målceller, som er de celler, hormonerne har til formål at ramme. Der findes tre forskellige slags; endokrine, parakrine og autokrine hormoner. Endokrine hormoner bliver frigivet til blod og transporteres via blodbanen, hvor de er bundet til transportproteiner (Cox & Nelson, 2013, s. 933-935). Dette er en transport over længere afstande, som kan være en meter eller mere, før de når deres målceller (Cox & Nelson, 2013, s. 930). Parakrine hormoner bevæger sig til de ekstracellulære rum og diffunderer til nærliggende målceller. Transporten er derfor ikke særlig

lang. Til sidst er der autokrine hormoner, hvilke påvirker den samme celle, som har frigivet dem. De binder sig til receptorer på den pågældende celled overflade. (Cox & Nelson, 2013, s. 935).

Hormoners virkning gennem cellulære receptorer

Efter transporten skal hormonet bindes til målcellen eller vævet, hvilket sker gennem receptorer. Alle hormoner agerer gennem specifikke receptorer på de hormonsensitive målceller, som har en affinitet for netop det pågældende hormon. Alle celletyper har deres egne kombinationer af receptorer, hvilket gør dem i stand til at binde nogle bestemte hormoner. Selvom to celler kan have samme receptorer, kan cellernes respons på hormonet være forskellig hos de to celler på grund af forskellige intracellulære mål for hormonets virkning. Hormonets specifikke virkning skyldes, at der findes en helt bestemt strukturel virkning mellem et hormon og dets receptor, da de har en komplementerende virkning. Dette samspil er selektivt, og derfor kan hormoner, som kemisk set er meget ens, have to vidt forskellige virkninger, hvis de fortrinsvis binder til forskellige receptorer. På grund af den høje affinitet mellem hormoner og tilhørende receptorer, så kan selv små koncentrationer af et hormon give respons på deres målceller (Cox & Nelson, 2013, s. 932).

Overordnet findes der to typer af receptorer; ekstracellulære receptorer på celleoverfladen og intracellulære receptorer. For ekstracellulære receptorer medfører bindingen af hormonet til receptoren en kaskade af intracellulære signalbeskeder, som regulerer cellens opførsel. For intracellulære receptorer må hormonet først passere gennem cellemembranen for at nå receptoren. Herefter bevæger hormonet og dets receptor sig til cellens nukleus, hvor det binder sig til DNA. På denne måde kan hormonet regulere ekspressionen af specifikke gener (Li, 2014). Af de intracellulære hormoner findes de nukleære hormonreceptorer (NHR) (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 75). NHR er en klasse af ligand-aktiveret proteiner, der kommer ind i nukleus og fungerer som transkriptionsfaktor, der aktiverer eller undertrykker genudtrykkelse. Denne ligand-inducerede genudtrykkelse forårsager ændringer i cellulære funktioner (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 74). Der findes tre klasser af NHR, hvor type 1 har størst relevans for dette projekt, da de er receptorer for steroidhormoner fx østrogenreceptor (ER) og androgen (AR), hvilket uddybes senere.

Når hormonerne binder sig, har cellen modtaget det signal, som hormonet bringer fra kirtlen, hvor det er produceret. Dette inducerer en ændring af receptorens form, hvilket udløser effekten af hormonet. Via receptorerne kan hormoner hermed påvirke og ændre cellulære aktiviteter hos modtagercellerne. (Vallero, 2004). Dette sker ved, at der sker en aktivering af receptorer, som leder

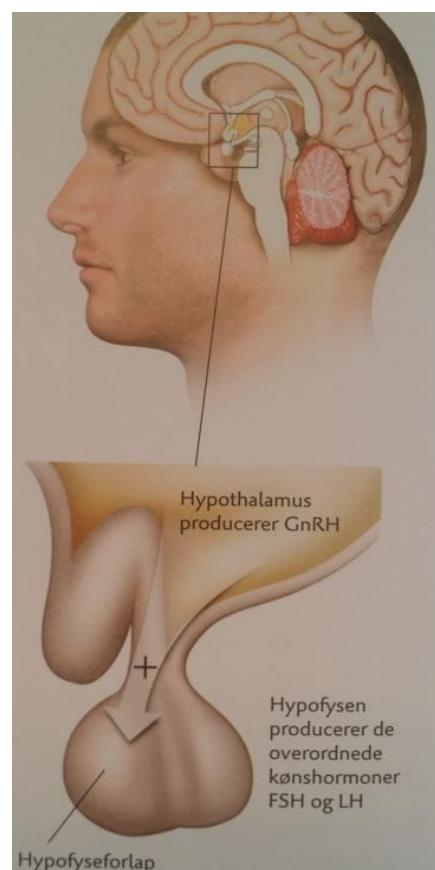
til bestemte respons i cellen. Disse kemiske signaler, som er blevet transmitteret fra det endokrine system, skal bruges til kroppens reproduktion, udvikling samt andre af kroppens processer (Vallero, 2004).

Regulering af hormonfrigivelse

Kroppen har reguleringsmekanismer, som kontrollerer frigivelse og dermed niveauet af hormoner. Dette er vigtigt for kroppen, da ændringer i niveauet af specifikke hormoner, regulerer specifikke cellulære processer. For at få forståelse for, hvordan denne hormonbalance reguleres, kigges der på hormonproducerende systemer, da hormonfrigivelse styres af et hierarki af neurologiske og hormonale signaler mellem hjernen og endokrine kirtler (Cox & Nelson, 2013, s. 938). Den overordnede kontrol af produktionen af hormoner i de endokrine kirtler sker i hjernen, hvor der sker en udskillelse af overordnede hormoner fra hypofysen se placering på figur 1 til højre. Hypofysen stimulerer andre væv til at danne mere specifikke hormoner.

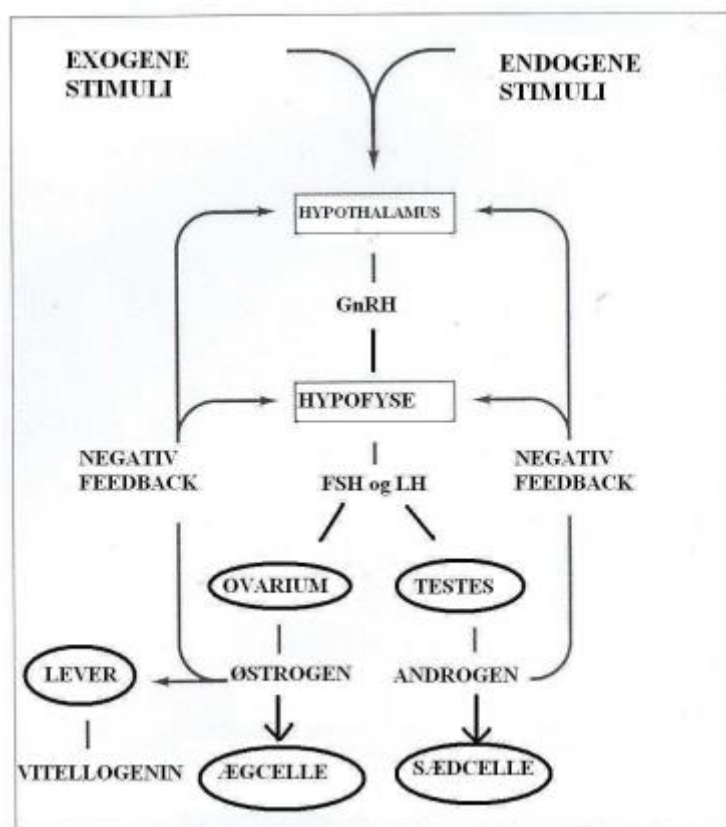
Hypofysen er anderledes end de andre hormonproducerende kirtler, fordi den blandt andet producerer flere forskellige hormoner og har en effekt på kroppens øvrige endokrine kirtler. Hypofysen består af en forlap og baglap. I baglappen produceres blandt andet hormonerne FSH, follikelstimulerende hormon, og det luteiniserende hormon, LH, som er hormoner, der stimulerer

andre endokrine kirtler. FSH og LH stimulerer aktiviteten hos både mænd og kvinders gonader, hvilket er testiklerne og æggestokkene. (Reece, Urry, & M.fl., 2011, s. 1035). Hypofysen er under overordnet kontrol af hypothalamus, som regulerer produktionen af de overordnede hormoner ud fra forskellige feedbackmekanismer. Hypothalamus er på den måde øverst i kommandokæden over hormonreguleringen. På bilag 1 ses en overordnet kommandovej over hormonreguleringen (Cox & Nelson, 2013, s. 936-937). Det er signaler, som hypothalamus modtager og integrerer fra centralnervesystemet (modtaget fra mange input fra mange interne og eksterne sensorer), hvilket stimulerer hypothalamus til at producere og udskille regulerende hormoner. Disse kan transporteres



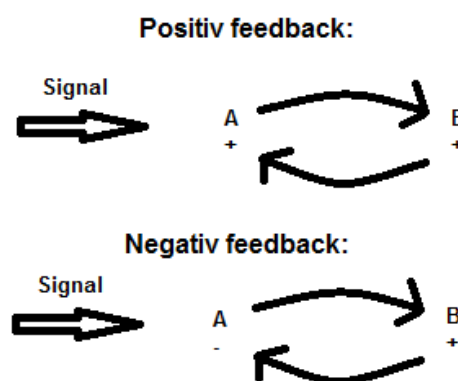
Figur 1: Hypothalamus og hypofysen, hvor hypothalamus stimulerer hypofysen med hormonet GnRH (Frøsig & M.fl., 2014, s. 134)

til hypofysens forlap via specielle blodkar og neuroner, som forbinder hypothalamus og hypofysen (Cox & Nelson, 2013, s. 937). Disse regulerende hormoner påvirker hypofysen til at udskille overordnede hormoner, som igangsætter næste rang af endokrine kirtler. Disse kirtler udskiller specifikke hormoner, som herefter transporteres til deres målvæv via blodbanen (Cox & Nelson, 2013, s. 937). Et eksempel på et regulerende hormon fra hypothalamus er GnRH, gonadotropinfrigivende hormon, som regulerer udskillelsen af både FSH og LH fra hypofysen (Reece, Urry, & M.fl., 2011, s. 1035). Dette kan ses på figur 2 nedenunder, hvor hormonet GnRH udskilles og stimulerer hypofysen til at danne FSH og LH, som transporteres til henholdsvis æggestokke for kvinder og testikler for mænd. For alle hormoner i hypofysens forlap, har hypothalamus hormoner med regulerende eller frigivende effekt, som hver især virker til hver deres type af hormoner, hvilket kaldes regulerende hormoner. På den måde er der tæt kontakt mellem hypofysen og hypothalamus (Cox & Nelson, 2013, s. 937).



Figur 2: Regulering af østrogen og testosteron. I hypothalamus produceres hormonet GnRH, som transporteres til hypofysen, som herefter danner de overordnede hormoner FSH og LH, som påvirker dannelsen af kønshormoner i æggestokkene og testiklerne. Produktionen er styret af negativ feedback (Rasmussen & M.fl., 2000).

Som tidligere nævnt er det feedbackmekanismer, som styrer niveauet af udskillelsen af hormoner, hvilket er positiv og negativ feedback. Dette er illustreret på figur 3 til højre. Ved positiv feedback fremmer hormon A udskillelsen af hormon B, som derefter stimulerer en yderligere frigivelse af hormon A. På den måde opnås der ved positiv feedback en høj koncentration af hormon A. Ved negativ feedback stimulerer hormon A udskillelsen af hormon B, som så hæmmer udskillelsen af hormon A. Således opnås et mere konstant niveau af både hormon A og B (Reece, Urry, & M.fl., 2011, s. 1028).



Figur 3: Øverst ses positiv feedback, hvor A fremmer B, som fremmer A. Nederst ses negativ feedback, hvor A fremmer B, som derefter hæmmer A (Udarbejdet selv)

Efter redegørelsen af den generelle virkning af hormoner, gås der i dybden med nogle mere specifikke hormoner, som har relevans i sammenhæng med de hormonforstyrrende stoffer, som behandles i dette projekt. Der lægges ud med en overordnet gennemgang af hormonundergrupper.

Undergrupper af hormoner

Hormoner, som stammer fra ekstrakter fra de endokrine kirtler, kan klassificeres i fire overordnede grupper (Li, 2014):

- 1) Aminosyrederivater
- 2) Proteiner, f.eks. Fra hypofysen
- 3) Peptider, eksempelvis insulin, glukagon
- 4) Steroider f.eks. østrogen og testosteron, hvilket uddybes nærmere.

Da steroider omfatter kønshormoner, som har en essentiel rolle i forbindelse med forståelsen for hormonforstyrrende stoffer virkning, så behandles steroider i næste afsnit for at give en baggrund for en senere forklaring af stoffer med østrogenlignende effekter.

Steroider

Steroider er lipider, som syntetiseres ud fra fedtsyren kolesterol. Steroider er karakteriseret som lipider på grund af deres fedtopløselige egenskaber, hvilket blandt andet gør dem i stand til at trænge gennem cellemembraner og binde sig til intracellulære receptorer. Nogle steroider fungerer som hormoner i kroppen og kontrollerer dermed en bred vifte af fysiologiske responser i kroppen

(Cox & Nelson, 2013, s. 935). Steroider har en grundlæggende fælles kemisk opbygning, hvilket består af en kondenseret fire-ring struktur, som består af tre ringe med seks karbonatomer og en ring med 5 karbonatomer. De forskellige typer af steroider har forskellige kemiske modifikationer af den fælles ringstruktur (Washington, 2014).

Steroider er den undergruppe af hormoner, som indeholder væksthormoner og kønshormoner. Blandt kønshormoner er blandt andet østrogener og testosteron. De påvirker seksuel udvikling og seksuel opførsel, desuden påvirker de også andre reproduktive eller ikke-reproduktive funktioner (Cox & Nelson, 2013, s. 935). Kønshormoner har betydninger for følgende (Bjerregaard, 2013, s. 169):

- 1) Kønbestemmelse, hvilket er måden, hvorpå kønnet bestemmes.
- 2) Kønssdifferentiering, hvilket er de processer, hvor det fastlagte køn omsættes, så der udvikles gonader.
- 3) Kønsvudvikling er de processer, hvor organer og væv udenfor gonaderne feminiseres eller maskuliniseres.

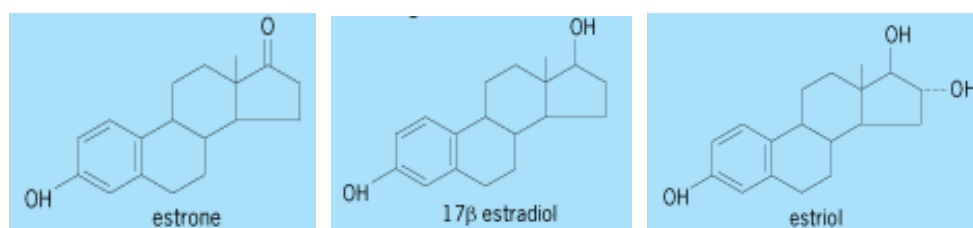
For at få en forståelse for hvordan hormonforstyrrende stoffer kan forstyrre reguleringen af kønshormoner, som er relevant i dette projekt, er det nødvendigt at undersøge kønshormonernes virkning og regulering, hvilket leder videre til to vigtige kønshormoner, østrogen for kvinder og testosteron for mænd.

Østrogen

Østrogener er gruppen af kvindelige kønshormoner og tilhører som nævnt tidligere steroidhormoner. Hos mennesket findes der primært tre naturlige forekomne former af østrogen; estrone (E1), estradiol (E2) og estriol(E3). Den kemiske struktur for disse østrogener ses på figur 4 nedenunder. Østrogener produceres i æggestokkene og under kvinders graviditet også i moderkagen, hvor østrogener dannes ud fra syntetisering af kolesterol, hvor androgener (mandlige kønshormoner) er et mellemprodukt. De er lipider ligesom de andre steroidhormoner, hvilket giver østrogener egenskaben til at trænge gennem cellemembraner og binde sig til intracellulære receptorer (Bjerregaard, 2013, s. 168-169). Østrogenreceptorerne befinder sig i cellens væske mellem cellekernen og den ydre membran, kaldes cytosolet. Når østrogen har bundet sig til receptoren, virker det som en transkriptionsfaktor, hvilket er et protein, som binder sig til DNA-sekvenser og på den måde er en forudsætning for at transkriptionen af gener i cellen kan

igangsættes. Det skyldes, at transkriptionen af genet enten hæmmes eller stimuleres af transkriptionsfaktoren (Reece, Urry, & M.fl., 2011, s. 1024).

Gennem pigers pubertet er østrogen ansvarlig for udviklingen og reguleringen af dannelsen af kvinders sekundære køns karakteristika og reproduktive systemer (Washington, 2014). Hos mænd har østrogen også vigtige funktioner, selvom niveauet af østrogen er lavere end hos kvinder. Østrogen regulerer reproduktive systemer hos mænd, hvor det er vigtigt i forbindelse med modningen af sæd.



Figur 4: Her ses den kemiske opbygning af de forskellige østrogener (Miller, 2014)

Reguleringen af østrogen sker gennem en række af responser, som starter i hypothalamus, hvor GnRH regulerer dannelsen af FSH og LH, som dermed regulerer produktionen af kvindeligt kønshormon i æggestokkene (Reece, Urry, & M.fl., 2011, s. 1037). Hos kvinder sørger FSH for væksten af celler, hvis opgave er at støtte og nære udviklende follikler. LH stimulerer produktionen af østrogen, primært estradiol, som igangsætter produktionen af reproduktive celler hos kvinder.

Østrogenreceptorer

Østrogenreceptorer, ER, betegnes som nukleære hormonreceptorer, som er bindingssted for østrogener. ER eksisterer i to subtyper i mennesker; ER- α og ER- β . ER findes i mange typer væv og organer. Forekomsten af de to receptortyper varierer fra væv til væv og fra organ til organ. Når begge typer receptorer er til stede i et organ, kan de komme uniformt til udtryk, eller en enkelt receptortype kan dominere, lige som både ER- α og ER- β kan være til stede i samme væv men i forskellige celler.

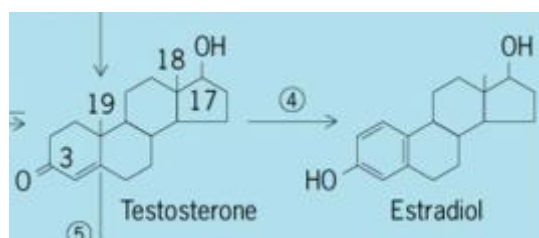
ER- α dominerer hovedsageligt i steder som livmoder, æggestokke, brystvæv, testikler, stroma i prostata, knogler, lever og dele af hjernen. ER- β udtrykkes derimod i bl.a. tarmen, prostata, testiklerne, æggestokke, spytkirtler og knoglemarv (Dahlman-Wright, Cavailles, & M.fl., 2006). ER's funktion er at regulere transskriptionsaktivitet i cellerne, når hormoner transporteres til cellen. Østrogener diffunderer ind og ud af celler, men østrogenreceptorerne, der er bindende proteiner,

gør, med sin høje affinitet, at østrogener bibeholdes i cellerne. Efter østrogen er bundet til ER, sker en konformationsændring. Denne ændring betyder, at receptoren er i stand til at iværksætte transskription af bestemte gener (Kuiper, Lemmen, & M.fl., 1998).

Testosteron

Testosteron tilhører klassen androgener, som er det mandlige kønshormon, der hører under steroidhormoner. Testosteron er derfor også et lipid, som er syntetiseret af kolesterol, hvilket gør testosteron fedtopløseligt. Testosteron produceres i testiklerne og spiller en vigtig rolle i udviklingen af mænds reproduktive funktioner, herunder kønsorganer som penis, pung og sædblærer (Schmidt, 2014). I puberteten stiger udskillelsen af androgener, herunder testosteron betragteligt, som er ansvarlige for blandt andet udviklingen af de maskuline sekundære karaktertræk; dyb stemme, skæg, kraftigere kropsbehåring, vækst af penis og pung samt øget muskelmasse. Desuden har testosteron en vigtig rolle at spille i mænds seksualdrift, hvor blandt andet vækst og funktion af prostata og spermatogenese (sædproduktion) er vigtig (Schmidt, 2014).

Testosteron kan omdannes til estradiol via et enzym, som indfører dobbeltbindinger i en af de aromatiske ringe i testosteron, hvilket kan ses på figur 5 nedenunder. Dette forekommer primært ved stimulation af et andet hypofysehormon, det follikelstimulerende hormon FSH. Selvom estradiol, der er karakteriseret som kvindeligt kønshormon, har det vigtige funktioner ved normale koncentrationer hos mænd. Det er eksempelvis påkrævet for spermatogenese og knogledensitet hos mænd. Den muskelopbyggende effekt er også den der kendes, når der tages steroider i forbindelse med træning (Reece, Urry, & M.fl., 2011, s. 1038). En overproduktion og dermed øget koncentration af kvindeligt kønshormon, herunder estradiol kan føre til øget feminisering fx forstørrelse af bryster.



Figur 5: Omdannelse af testosteron til det kvindelige kønshormon estradiol ved indførelse af en dobbeltbinding i ringstrukturen (Schmidt, 2014).

Hos mænd spiller hormonerne FSH og LH en rolle i produktionen af androgener og udviklingen af de tidligere nævnte køns karakteristika. Ligesom hos kvinder, så udskilles FSH og LH som respons

fra hormonet GnRH fra hypothalamus. For en velfungerende spermatogenese er både FSH og LH vigtigt, da de påvirker forskellige typer af celler i testiklerne. FSH giver anledning til aktivitet i Sertoli cellerne, hvilket er en celletype i testiklernes sædvr. De fungerer som støtteceller for sædcellerne under dannelsen af disse, hvor de forsyner sædcellerne med næringsstoffer. Desuden hjælper de også med at frigøre de modne sædceller i sædkanalerne. LH regulerer derimod Leydig celler, hvilke er de celler, som producerer det mandlige kønshormon testosteron og andre androgener, hvilket igangsætter produktionen af sæd (Reece, Urry, & M.fl., 2011, s. 1056-1057).

Kroppen regulerer nøje koncentrationen af testosteron i kroppen for at holde koncentrationen i balance, hvilket sker ved negativ feedback. Negativ feedback kan regulere dannelsen af androgener efter behov, og der findes to negativ-feedbacksystemer, som kontrollerer dette niveau. Det første er, at testosteron kan regulere niveauet af GnRH, FSH og LH gennem inhiberende effekter på hypothalamus og hypofysen. Det andet er en produktion af hormonet, inhibin, i Sertoli cellerne, som påvirker hypofysen til at reducere udskillelsen af FSH. Disse to negativ-feedbacksystemer sørger for et optimalt niveau af androgener (Reece, Urry, & M.fl., 2011, s. 1057). I tilfælde af en for høj koncentration af testosteron, vil der sendes et negativ feedback signal til hypothalamus, som så hæmmer produktionen af GnRH og dermed også dannelsen af LH i hypofysen. Dermed hæmmes testosteronproduktionen også, da testiklerne ikke får samme mængde signal om at danne testosteron. Efter testosteronniveauet er faldet til et bestemt niveau, vil hæmningen af produktionen af GnRH og LH svækkes, og dermed oprettes den normale produktion af GnRH og LH og dermed testosteron igen (Frøsig & M.fl., 2014, s. 135).

Hormonforstyrrende stoffer

Som nævnt tidligere styrer hormoner adskillige processer i kroppen, og det endokrine system er meget afgørende for kroppens normale udvikling og reproduktion. Hormonbalancen kan let påvirkes af forskellige stoffer, og selv små forstyrrelser i systemet og dets funktioner kan føre til langvarige og i nogle tilfælde uoprettelige skader. Kroppen kan være særlig følsom overfor udefrakommende påvirkninger af hormonsystemet i forskellige faser af livet, specielt under udvikling og vækst som i prænatal og pubertære perioder (Vallero, 2004). Xenohormoner er naturligt eller kunstigt fremstillede stoffer, som har hormonlignende egenskaber, og de stoffer som er i stand til at påvirke kroppens naturlige hormonbalance, kaldes i normal tale for hormonforstyrrende stoffer. Dette kan beskrives som *"Et udefrakommende stof, som ændrer den*

endokrine funktion og forårsager skadelige virkninger hos organismen, dens afkom og/eller (sub)population af organismer” (Bjerregaard, 2013, s. 169). Hormonforstyrrende stoffer er meget omdiskuteret i forbindelse med kønshormoner, men andre hormonsystemer i kroppen kan ligeledes påvirkes af hormonforstyrrende stoffer (Bjerregaard, 2013, s. 167).

Der er forskellige måder, hvorpå hormonforstyrrende stoffer kan forstyrre den naturlige hormonbalance. Der findes stoffer, der kaldes antagonist, som hæmmer kroppens naturlige hormoner i at binde sig til tilhørende receptorer. Antagonisterne påvirker derfor omsætningen af kroppens naturlige hormon, og de kan på den måde have den modsatte virkning af det naturlige hormon. Stoffer som virker antagonistisk kan dog stadig have en effekt. Effekten kan stadig være større end de enkelte bidrag alene, selvom der er antagonistisk effekt (Vallero, 2004). Andre stoffer, som kaldes agonister, virker ved at interagere med de naturlige hormonreceptorer i kroppen ved at binde sig til cellernes receptor. De efterligner dermed de naturlige hormoners virkning (Vallero, 2004). Dette medfører ubalance og forstyrrelser i kroppens hormonbalance. Der er forskellige niveauer, hvorpå hormonforstyrrende stoffer kan forstyrre hormonsystemet (Bjerregaard, 2013, s. 169):

- 1) Dannelsen af hormoner
- 2) Binding til transportproteiner i blodet
- 3) Vekselvirkning med hormonreceptorer i cellerne, hvilket både kan ske ved antagonisme eller agonisme.
- 4) Omsætning eller nedbrydning af hormonerne.

I 2007 lavede EU en prioriteringsliste over hormonforstyrrende stoffer, som inddelte stofferne i fire grupper efter stoffets toksicitet (Rapra, 2012, s. 7)

- Kategori 1: Påvist i dyreforsøg at have hormonforstyrrende effekt.
- Kategori 2: Potentielt hormonforstyrrende.
- Kategori 3a: Ingen hormonforstyrrende effekter i forsøg
- Kategori 3b: Ingen eller utilstrækkelig data til at udelukke hormonforstyrrende egenskaber.

Østrogenlignende effekt

Stoffer med østrogenlignende effekt er blandt de mest omtalte i forbindelse med hormonforstyrrende stoffer. Med østrogenlignende effekt menes der, at stofferne efterligner den effekt, som naturligt østrogen har både hos mænd og kvinder. Denne østrogenlignende aktivitet sker

primært gennem nukleære hormonreceptorer ER- α og ER- β , hvor forskellige stoffers effekt kan være væsentligt forskellige men stadig udløse østrogenlignende respons. Stofferne kan både have antagonistisk og agonistisk virkning (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 76 og 198).

Stoffer som vekselvirkede med kroppens østrogener var oprindeligt den primære bekymring, da hormonforstyrrende stoffer kom i fokus i forbindelse med reproduktive problemer. Efter talrige undersøgelser af stoffers østrogenlignende effekt kom der fokus på antiandrogener, som overordnet giver udslag som østrogener. Antiandrogener modvirker nemlig virkningen af mandlige kønshormoner, og dermed kan udsættelse for disse stoffer overordnet set minde om virkningerne som følge af udsættelse for østrogener eller østrogenlignende stoffer. Dette skyldes, at de hæmmer kroppens testosteronreceptorer eller hæmmer enzymer, som er med til at danne testosteron. Antiandrogener påvirker kun mandlige fostre, mens østrogenlignende effekt kan påvirke begge køns hormonbalance hele livet. Androgen-østrogen balancen er vigtig for normal udvikling (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 149).

Risikovurdering til fastsættelse af grænseværdier

I forbindelse med hormonforstyrrende stoffer laves der risikovurderinger. Her undersøges, hvilke konsekvenser stoffet kan have og ved hvilke koncentrationer. Risikovurdering bruges som et parameter for undersøgelse af hormonforstyrrende stoffers toksicitet. For at lave en risikovurdering af et kemikalie, ses der på flere faktorer, som laves ud fra toksikologiske og epidemiologiske undersøgelser:

1. Risikofaktorer
2. Dosis-responsammenhænge
3. Eksponering
4. Karakterisering af risikoen

Disse faktorer bruges til at fastlægge et regelsæt for brugen af kemikaliet, ikke blot for selve kemikaliet men også produkter, hvori kemikaliet indgår. Denne vurdering revideres løbende i takt med ny viden fra forskning om kemikaliet (Kamper-Jørgensen, Almind, & Bruun Jensen, 2009).

Der findes forskellige betegnelser til forskellige vurderinger af grænseværdier under risikovurderingerne. NOEL (No Observed Effect Adverse Level) er en betegnelse for, hvornår en organisme bliver mindst muligt skadet. Denne bruges til at finde DNEL (Derived No Effect Level). Hvis man i forvejen kender til eksponeringen af kemikaliet Exposure Level (EL), kan man opstille

en brøk $\frac{DNEL}{EL}$, som bruges som et kemikalies "Margin Of Safety" (MOS), hvilket er kemikaliets sikkerhedsmargin. Jo større brøken er, desto mere sikkert er kemikaliets (Rank, 2013). Udover forsøgsresultaterne tilføjer man også en sikkerhedsfaktor på mellem 1-1000 til grænseværdien, så man er helt sikker på, at stoffet ikke er skadeligt for mennesker, hvor der dog ikke tages højde for kombinationseffekt (Nørggard, Selck, & Syberg, 2012). I nogle bestemte stoffers tilfælde, findes der ingen NOEL-værdi, da kemikaliets er skadeligt ved dets blotte tilstedeværelse (Kamper-Jørgensen, Almind, & Bruun Jensen, 2009). NOEL kan bruges til fastsættelse af grænseværdier for hormonforstyrrende stoffer.

EU's vurdering og grænseværdier for toksiciteten af kemikalier er lavet ud fra prøver af de enkelte kemikalier. Men mennesker eksponeres dagligt for mange forskellige stoffer i kombination i hverdagen bl.a. fra fødevarer, vand, jord og luften, hvilke kan påvirke hinanden. Stoffernes påvirkning på hinandens effekter har derfor en vigtig rolle at spille, når deres toksicitet skal vurderes. I dag har EU har registreret mere end 50.000 kemikalier, og det er derfor et stort og omkostningsfuldt arbejde at teste kombinationseffekter for alle disse stoffer (Nørggard, Selck, & Syberg, 2012). Til trods for bekosteligt arbejde, så har kombinationseffekt unægtelig en vigtig rolle at spille i forbindelse med risikovurdering af stoffer toksicitet.

Kombinationseffekt (Cocktaileffekt)

Mennesker eksponeres for mange forskellige kemikalier i kombination i hverdagen, som alle kan bidrage til en hormonforstyrrende effekt. På den måde opstår kombinationseffekten, også kaldet cocktaileffekt. Kemikalierne findes bl.a. i fødevarer, vand, kosmetik, jord og i luften, og der produceres over 500 millioner tons kemikalier om året (Nørggard, Selck, & Syberg, 2012). Den store produktion kan medføre, at kemikaliernes effekter forandres til trods for, at nogle stoffer ikke nødvendigvis var skadelige før kombinationen af stofferne (Mikkelsen, 2013).

Kombinationseffekt inddeles i 3 grupper:

- Synergi: Eksponering af flere kemikalier kan forstærke kemikaliets hormonforstyrrende virkning på kroppen. Det kan dog være forskelligt fra krop til krop og fra kombination til kombination. Det er bl.a. derfor, at det er svært at udvikle en metode, som kan måle kombinationseffekten. Forskning viser desuden, at jo flere kemikalier kroppen udsættes for, desto værre påvirkning på kroppen vil stofferne have samlet (Vinggård, 2015). Det betyder endvidere, at emballage eller fødevarer, som indeholder hormonforstyrrende stoffer i

koncentrationer under de tilladte doser, kan være farlige og have en hormonforstyrrende effekt, hvis det er i kombination med et andet stof.

- Additiv effekt: Kemikaliernes effekt vil tilsammen ikke forandres.
- Antagonisme: I nogle tilfælde kan eksponering af flere forskellige kemikalier formindske effekten af kemikalierne (Rank, 2013, s. 183).

Det er en omstænding proces at undersøge alle stoffernes skadelige virkninger, når de kombineres, da der findes adskillige stoffer. En effektiv metode er endnu ikke udviklet, og det er derfor svært at vurdere skadeligheden af så mange stoffer. Dog har man indtil videre udviklet to metoder, man i dag vurderer ud fra:

- Koncentration addition (CA): Dette er en metode, hvor stofferne skal have samme virkningsmekanismer, hvilket kan være svært, da kemikalier kan have flere virkningsmekanismer (Nørggard, Selck, & Syberg, 2012). Med denne metode lægges alle stoffernes koncentrationer i kombinationen sammen for at estimere de samlede sundhedsskadelige effekter. Dette gøres med formlen: $\frac{d_1}{EC_{50}} + \frac{d_2}{EC_{50}}$, hvor d_1 og d_2 er den dosis, som giver EC_{50} . EC_{50} er den koncentration, der giver en mærkbar effekt på 50 % af forsøgsorganismerne. Her bliver svaret dog oftest, at det er farligere, end det egentlig er.
- Uafhængig Handling (IA): Her har stofferne samme sundhedsskadelige effekter og forskellige virkningsmekanismer. Med IA lægges effekterne sammen, men her bliver effekten dog oftest undervurderet i forhold til stoffets sundhedsmæssige problemer (Mikkelsen, 2013).

Dosis-respons

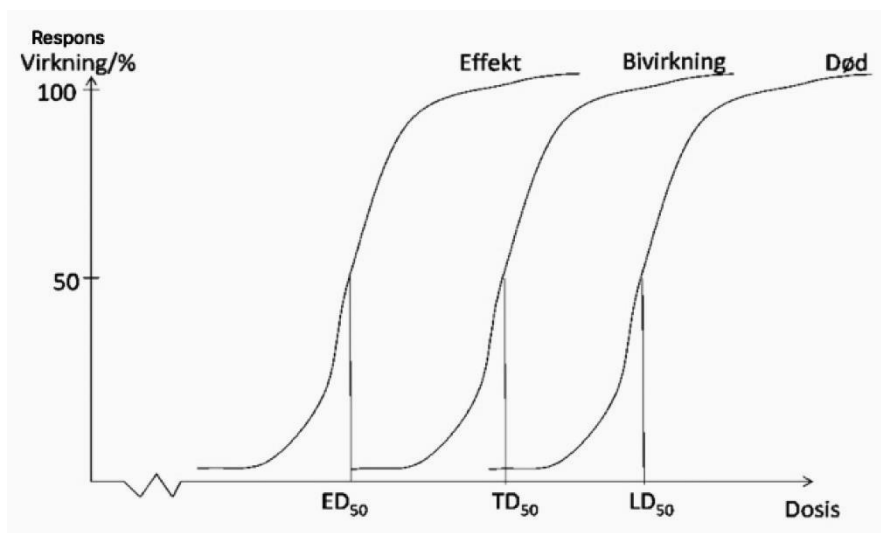
En risikovurdering af et kemikalie kan blandt andet laves på baggrund af kemikaliets dosis-respons sammenhænge. Dosis-respons er sammenhængen mellem den dosis af et givent kemikalie kroppen eksponeres for og virkningseffekten af kemikaliets. Dette måles i virkningsprocent. Ud fra disse data kan der laves en dosis-respons kurve, se figur 6, som laves ud fra forskellige parameter, som effekt, bivirkning eller død (Streibig & mf, 2008). Dosis-respons kurven er ofte sigmoidt, som betyder at den er s-formet, og er monotont voksende eller faldende.

Til kvantificering eller klassificering af et kemikalies sundhedsskadelige effekt, bruges dosis-responskurver som metode. Her benyttes forsøgsdata til at finde responsniveauer, som kan bruges

til at lave grænseværdier for kemikaliet (Olsen & Piilgaard Hallin, 2013). Responsniveauerne er eksempelvis;

- ED_{50} , som nævnt tidligere, beskriver ved hvilken dosis 50 % af forsøgspersonerne mærker en respons af kemikaliet.
- TD_{50} er en toksisk dosis, som markerer hvor 50 % af forsøgspersonerne mærker, at bivirkninger optræder. Her ses der på forandringer i både enkelte celler og hele organismen.
- LD_{50} , er den letale dosis, som findes ved forsøg på dyr for at finde ud af, hvor stor en dosis der skal til for at være dødelig for 50 % af forsøgsdyrene (Kamper-Jørgensen, Almind, & Bruun Jensen, 2009).

Ved nogle kemikalier er det også nødvendigt at finde ED_{10} , eller fx EC_{50} , hvor C'et står for koncentration og bruges på samme måde, hvor kemikalierne her undersøges i koncentrationer i stedet for i doser (Streibig & mf, 2008).



Figur 6: På figuren ses en dosis-responskurve, som viser respons som funktion af dosis. Grafen viser ved hvilken dosis 50 % af forsøgspersonerne i et forsøg med et kemikalie, får henholdsvis effekt, bivirkninger eller en letal virkning.

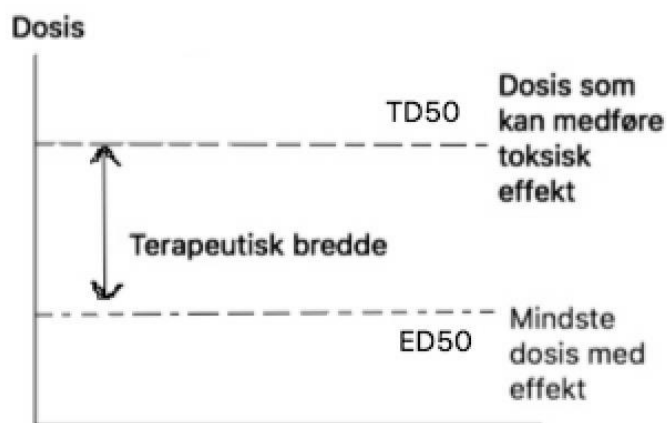
På dosis-responskurven på figur 6 ses, at der er forskel på virkningen ved samme dosis hos mennesker. Bestemte koncentrationer af et stof kan give forskellige responser (EKSEMPEL). Kurven er derfor heller ikke lineær men flader ud for enden.

I vurdering af dosisrespons undersøges parameter som eksempelvis størrelse af dosis, virkningseffektens indtræden, hvornår virkningseffekten er konstant og hvornår virkningen er

aftagende. Selvom disse parameter er forholdsvis lette at undersøge, er der ofte store individuelle forskelle på mennesker, og man kan derfor ikke gå ud fra, at forsøgsdata passer på alle. Især hos svækkede mennesker med fx dårlig lever vil kemikalier ofte have en anden effekt (Olsen & Piilgaard Hallin, 2013).

Terapeutisk indeks og bredde

Forholdet mellem den effektive dosis og den letale dosis kaldes terapeutisk indeks og måles med formelen $\frac{LD_{50}}{ED_{50}}$. Det terapeutiske indeks kan bruges som metode til at afgøre, hvor toksisk et kemikalie er eller bruges som sikkerhedsmargin for et kemikalie. Et højt terapeutisk indeks er, hvis der er stor forskel på LD og ED, altså $\frac{LD}{ED} = \text{højt}$. Her er risikoen for toksisk og letaleffekt minimal. Hvis det terapeutiske indeks er småt, skal man være mere opmærksom på overdosering, da det kan blive toksisk eller letalt. Ud fra dette kan man også konkludere, at jo større et kemikalies terapeutiske indeks er, des mere sikkert er kemikaliets (Olsen & Piilgaard Hallin, 2013). Udover terapeutisk indeks findes der også terapeutisk bredde, se figur 7 herunder, som bruges til at finde en dosis, hvor flest forsøgspersoner får effekt i et dosis-respons forsøg med et minimum af bivirkninger. Terapeutisk bredde udregnes med formelen $TD_{50}-ED_{50}$ (Olsen & Piilgaard Hallin, 2013).



Figur 7: Denne figur viser den terapeutiske bredde. Et rum, hvor flest forsøgspersonener i et dosis-respons forsøg for effekt, med minimale bivirkninger (Lavet i Paint).

Bisphenol A

BPA er et af de mest omtalte kemikalier i forbindelse med hormonforstyrrende stoffer. Hormonforstyrrende effekter af kemikalier som BPA kan påvirke det endokrine system i mennesker ved eksponering. Interessen for BPA er voksende i offentligheden og blandt forskere. Det har

placeret kemikaliet i centrum for debatten om de skadelige effekter af hormonforstyrrende stoffer, da det bl.a. kan have betydning for fosterudviklingen, reproduktionsevnen og karcinogenese (tumor- og kræftfremkaldende virkning) (Vaughn, 2011, s. 87).

Mistanken om sundhedsskadelige effekter ved eksponering for BPA bliver tydelig med henblik på de tilhørende faresætninger (H-sætninger) og sikkerhedssætninger (P-sætninger), som er en del af GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals). Dette er en måde at danne et sæt af standardiserede sætninger om farer- og sikkerhedsforanstaltninger for kemiske stoffer, hvilket reguleres på EU-plan. Sætningerne, som omhandler BPA, oplyser om eventuelle farer ved BPA, hvor man ud fra disse sætninger kan aflæse, at BPA mistænkes for at have sundhedsskadelige effekter, herunder skadelig effekt på fertilitet, skade ufødte børn, skader på organer, hvilket er uddybet i bilag 2 (National Center for Biotechnology Information). Det skal dog pointeres, at det endnu ikke er helt evident, hvorvidt BPA har sundhedsskadelige effekter. Men dette projekt tager udgangspunkt i den forskning, der beskriver BPA's hormonforstyrrende effekt, og hvilke konsekvenser det kan have (Vaughn, 2011, s. 87). Diskussionen af hvilke sundhedsmæssige konsekvenser BPA kan have, fokuserer på forringelse af reproduktionsevnen og udvikling af kræft. BPA kan nemlig virke som et reproduktionstoksisk stof, selvom der er usikkerhedsmomenter med hensyn til, hvor stor den faktiske sundhedsrisiko er for mennesker.

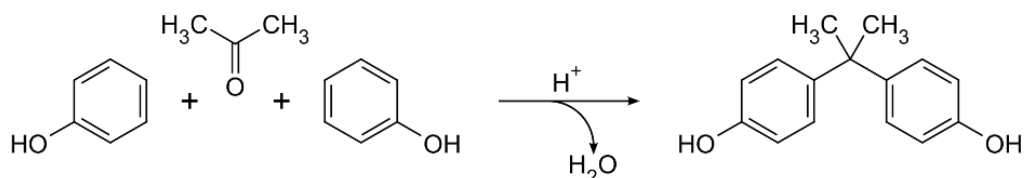
Hvad er BPA

BPA er et symmetrisk molekyle med to methylgrupper og to hydroxylerede phenylringe, der er samlet om et centralt kulstofatom, hvilket er afbilledet på figur 8, og dets fysiske egenskaber kan ses i bilag 3. BPA indgår i vigtige industrielle kemikalier, hvor det blandt andet er en molekulær byggesten i polycarbonat polymere og epoxyplast, der anvendes i mange henseender. I polycarbonat (PC) bruges BPA til binding, blødgøring og/eller hærkning af plastik, maling / lak og ”fyld i materialer”. BPA kan på den måde være med til at give PC en enestående kombination af nyttige egenskaber, hvor nogle af de primære er gennemsigtighed, splintremodstand og høj varmeresistens, hvilket gør BPA højest brugbart på mange forskellige anvendelsesområder (Vaughn, 2011, s. 92). PC bruges eksempelvis i kontaktlinser, medicinsk udstyr, vandflasker, fødevarebeholdere, digitale medier som cd'er / dvd'er, termisk papir og elektrisk udstyr.

Epoxyplast anvendes til industrielle gulvbelægninger, lim, industrielle beskyttende belægninger (Vaughn, 2011, s. 85). I fødevarebeholdere benyttes det f.eks. til at skabe en barriere mellem

fødevarer og metallet i en dåse, så fødevarer ikke kommer i direkte kontakt med metallet. Det hjælper også til at holde formen og styrken af plastik eller lak (Rank, 2013, s. 141).

På figur 8 ses syntetiseringen af BPA, som er en kondensationsreaktion mellem acetone og phenol. I det færdige produkt har begge benzenringe fået tilknyttet én hydroxygruppe, som befinder sig symmetrisk overfor hinanden.



Figur 8: På figuren ses processen ved dannelse af BPA ved kondensationsreaktion. Der sker en kondensation af phenol med acetone ved brug af en katalysator, hvilket danner BPA og H_2O , der er et biprodukt. Produktet til højre er BPA.

BPA blev første gang brugt som industrikemikalie i 1930, men siden da er der sket en enorm vækst i produktionen. I dag er BPA et af de kemikalier, der produceres mest af, og på verdensplan blev der i 2012 produceret over 4,6 mio. tons (EuropeanCommission, 2015) an. BPA er almindelig i produkter og industriaffald, der både forurener mennesker, vand og luft (Vaughn, 2011, s. 87). Hvis et produkt indeholder eller er lavet af polycarbonat, vil produktet være mærket med en genbrugstrekanthjørne med et syvtal inden i, samt PC stående under trekanten, som det ses på figur 9 (Rank, 2013, s. 142).



Figur 9: Symbolet viser, at der er polycarbonat i et produkt (Rank, 2013, s. 142)

BPA's hormonforstyrrende effekt ved binding til receptorer

BPA blev syntetiseret for første gang i 1891. I 1930'erne forsøgte Edward Charles Dodds fra University of London at finde et syntetisk østrogen, og i den forbindelse identificerede han BPA's østrogene egenskaber. BPA blev dog aldrig taget i brug som et syntetisk østrogen, men begyndte i stedet at blive anvendt i epoxy i 1950'erne. I 1957 opdagede kemikere fra General Electric, at BPA kunne bruges til at lave hård plastik, polycarbonat, der var både var stærkt og klart. Disse opdagelser satte skub i brugen af BPA, da plastikindustrien i årtierne efter var i vækst (Vogel, 2009).

Med begyndelsen som en mulig syntetisk østrogen, har østrogen effekt af BPA været kendt fra starten. Men spørgsmålet er, hvordan den østrogene effekt kommer til udtryk på et kemisk og biologisk niveau. BPA er i stand til at binde sig til hormonreceptorer i mennesker, og forklaringen på den østrogenlignende evne kredser derfor om østrogenreceptorerne ER. Evnen til at binde sig til hormonreceptorer hænger sammen med BPA's kemiske struktur, som skaber muligheden for, at kemikaliet kan påvirke det endokrine system. Det betyder, at kemikaliet kan have en effekt, der interferer med hormonsystemet, altså have en hormonforstyrrende effekt, og derfor betegnes BPA som en endokrin forstyrrer. Evnen til at efterligne virkningen af endogene østrogener (østrogener der er produceret i kroppen), bevirker at BPA endvidere betegnes som en xenoøstrogen.

Den mest elementære grund til BPA's evne til at binde sig til ER, kan findes ved at belyse kemikaliets strukturelle, kemiske sammensætning. Det kan beskrives med henblik på hvilke strukturelle elementer et molekyle generelt skal udgøres af, før det besidder evnen til at binde sig til ER. Minimumkravene for den strukturelle sammensætning af et stof, for at det kan have østrogenlignende effekter, ser ud til at være en hydroxylgruppe på 4 carbon i A-phenylringen, samt en hydroxylgruppe på samme placering på B-phenylringen (Kitamura, Suzuki, & M.fl., 2005). Denne strukturelle opbygning har ligheder med østrogen, og BPA udgøres netop af bl.a. to benzenringe og to (4,4')-OH-grupper i paraposition. Den strukturelle ikke-homologe (altså analoge; dvs. at de har samme funktion, men ikke samme udviklingsmæssige oprindelse) lighed mellem BPA og østrogen gør det muligt for BPA at passe ind i den ER-bindende lomme på østrogenreceptorerne. Den kemiske struktur af BPA, er derfor den grundlæggende årsag til at kemikaliet kan have en hormonlignende effekt, og det gør f.eks. at BPA kan forstyrre signaleringen mellem østrogen og hjernen, hvilket har en afgørende rolle i seksuel differentiering.

De kemiske ligheder danner grundlaget for, hvordan BPA kan fungere som et østrogen, men det forklarer ikke, hvordan det udmønter sig til hormonlignende effekt på et cellulært niveau, og det er først inden for de to seneste årtier, at man har dokumenteret BPA's hormonlignende effekt. BPA kan formentligt interagere med flere typer østrogenreceptorer, men især kemikaliets evne til at binde sig til de nukleare østrogenreceptorer ER- α og ER- β er veldokumenteret. BPA binder sig i større grad til ER- α og i mindre grad til ER- β , hvilket er vist både in vitro og in vivo forsøg. Disse receptorer er desuden også til stede i rotter og mus, hvoraf det ofte er disse dyr, der udføres forsøg på, når ønsket er at undersøge østrogenlignende effekter (Kuiper, Lemmen, & M.fl., 1998).

Gennem biokemiske assays har man undersøgt BPA's evne til at binde sig til ER. Undersøgelser af BPA's virkning på ER viste, at der på både ER- α og ER- β findes et enkelt bindingssted for estradiol, og at BPA (og alle andre østrogenlignende kemikalier) konkurrerer med estradiol for at binde sig til de to typer receptorer i lige høj grad og med samme tilbøjelighed. Dog bindes BPA med langt mindre affinitet end estradiol til receptorerne. BPA fremmer desuden transskriptionsaktiviteten hos begge receptorsubtyper ved koncentrationer på 100-1000 nM, svarende til 0,0228-0,2283 mg/L. BPA kan altså både have en østrogenlignende effekt ved at binde sig til ER, samt en østrogenlignende virkningsmekanisme, der kan øge transskriptionsaktiviteten (Gould, Leonard, & M.fl., 1998).

Forskning tyder på, at mens BPA kun udøver en agonistisk effekt for ER- β , og dermed igangsætter en østrogen effekt, kan BPA både fungere som agonist og antagonist af østrogen for ER- α . Altså kan det både have en fremmende eller hæmmende effekt. Dermed bliver den hormonforstyrrende effekt af BPA receptorsubtype-specifik (Hiroi & M.fl., 1999). I et stort studie fra 1999 undersøgte man østrogene effekter af 20 forskellige kemikalier med 5 forskellige assay-metoder. Alle testmetoderne resulterede i kraftige østrogene reaktioner for bl.a. estradiol og 17 β -estradiol. Mere opsigtsvækkende fandt man, at BPA frembragte en østrogen effekt i alle assays (Andersen, Andersson, & M.fl., 1999).

Ligesom for de endogene østrogener har affiniteten stor betydning for, i hvor høj grad østrogener eller østrogenlignende kemikalier kan bibeholdes i cellerne, og dermed hvor stor en effekt de kan have for det endokrine system. Affiniteten af BPA har altså afgørende betydning for, hvor stor en effekt det kan have i det humane legeme. BPA's affinitet er relativt lav, set i forhold til affiniteten for 17 β -estradiol. Mere præcist er affiniteten 10.000 til 100.000 gange mindre i nogle tilfælde, og det har givet anledning til at angive BPA som en svag miljømæssig østrogen (Andersen, Andersson, & M.fl., 1999). Det er desuden den lave affinitet, der kan give anledning til at antage, at BPA ikke kan forårsage en mærkbar effekt i mennesker. Men de fleste østrogener, der produceres endogent, som f.eks. 17 β -estradiol, er bundet til plasmaproteiner, så kun en mindre andel er i stand til at aktivere ER i cellerne. Det giver BPA (og andre østrogenlignende stoffer) en fordel, da de har en langt mindre affinitet for plasmaproteinerne end de endogene østrogener. Derfor findes det i højere grad frit i blodet og er i højere grad tilgængeligt til at aktivere ER. I den forbindelse bliver det vigtigt at pointere, at et fravær af plasmaproteiner i assays kan betyde, at BPA's evner set ift. estradiols undervurderes in vitro, på trods af at BPA's affinitet for ER er langt mindre end estradiols

(Nagel, Saal, & M.fl., 1997). Desuden kan BPA modvirke estradiols virkning ved at fungere som en selektiv østrogenreceptormodulator. Ved høje koncentrationer kan BPA binde sig til AR-receptorer og derigennem hæmme aktiviteten af androgen. (Hejmej & M.fl., 2011)

I talrige undersøgelser har man altså fundet, at BPA kan være i stand til at binde sig til østrogenreceptorer, og derved have en hormonforstyrrende effekt. Hvilken betydning det kan have for det humane endokrine system og human sundhed, er dog langt mere kompliceret og uafklaret. Derfor undersøges og diskuteres BPA's hormonforstyrrende effekt til stadighed. De undersøgelser af sundhedsmæssige konsekvenser, der allerede er foretaget, tyder dog på, at BPA kan have en lang række følgevirkninger. De mest fremtrædende af disse er centreret om fertilitet, kønsdifferentiering og karcinogenese, som tidligere nævnt. Derfor beskrives sundhedsrelaterede konsekvenser i det følgende afsnit.

Konsekvenser ved eksponering af BPA

Konsekvenserne af en hormonforstyrrende effekt som følge af eksponering for BPA over kritiske koncentrationer er mange, og er til stadig diskussion og et stort stridspunkt, både imellem forskere, lovgivende myndigheder og producenter, der anvender BPA. Der er lavet et utal af forskningsprojekter, der undersøger alle dele af BPA's virkning og konsekvenser. Mest essentielt undersøges størrelsen af koncentrationen, der skal til for at eksponeringen af BPA resulterer i store sundhedsmæssige konsekvenser, og hvordan disse konsekvenser manifesterer sig ud fra et sygdomsmæssigt udgangspunkt. Der er en lang række sygdomme og lidelser, der menes at kunne udvikles som konsekvens af eksponering med BPA. I eksperimentelle studier har BPA vist at påvirke reproduktive dele så som æggestokke, livmoder, vagina vægt, formen af æg, befrugtningsevne, afstand mellem kønsdele og anus (det indikerer maskulinisering eller feminisering af ydre kønsorganer), tid for vaginal åbning (start pubertet). Dette antyder, at eksponering af BPA har en påvirkning på kroppen og potentielt kan skade menneskets forplantningsevne (Segni, Mallozzi, & M.fl., 2014, s. 1-2).

På baggrund af gennemgang foretaget af WHO af al den viden man har om hormonforstyrrende stoffer, står der på Fødevarestyrelsens hjemmeside, at der på nuværende tidspunkt ikke er bevis for, at der er anselige sundhedsfarer forbundet med kontakt med hormonforstyrrende stoffer, herunder BPA. Men det understreges samtidig, at hvis mistanken om, at hormonforstyrrende stoffer har en negativ indvirkning på menneskers forplantningsevner, holder vand, kan det have anselige

konsekvenser (Fødevarestyrelsen, 2015). Derfor tages BPA meget alvorligt. En lang række epidemiologiske og kliniske undersøgelser har nemlig vist en sammenhæng mellem eksponering af BPA og negative virkninger på mange menneskelige systemer (Mohd, Ejaz, & M.fl., 2015).

Herunder er eksempler på sammenhænge mellem eksponering for BPA og forskellige lidelser (WHO, 2015, s. 3, Chap 1).

- Forskellige kræftformer, herunder bryst- og testikelkræft
- Tidlig pubertet
- Reproduktionsmæssige konsekvenser
- Fejl på kønsorganer

I følgende afsnit uddybes de primære sundhedsskader, som BPA mistænkes at have hos henholdsvis kvinder og mænd.

Konsekvenser hos hunkønnet

Eksperimentelle undersøgelser har vist flere resultater, som tyder på, at BPA har skadelige virkninger hos hunkønnet. Hos kvinder er højere niveauer af BPA forbundet med fejl på kvindelige kønsorganer, infertilitet, hormonel ubalance, spontane aborter, brystkræft, tidlig pubertet og for tidlige fødsler. (Mohd, Ejaz, & M.fl., 2015). Der er i dag forskellige forskningsresultater, som i nogle tilfælde er modstridende, vedrørende BPA's påvirkning på tidlig pubertet og livmoderens udvikling. Eksperimentelle data fra dyremodeller for menneskets pubertet har vist, at flere miljømæssige kemikalier, som findes overalt i vores hverdag, herunder BPA, kan have skadelige virkninger på kvindelige reproduktion (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 122). Det er for nyligt observeret, at kvinder, som har koncentrationer af BPA i kroppen over detektionsgrænsen, var betydeligt mere repræsenteret i infertile (ufrivillig barnløse) grupper end for fertile folk (Segni, Mallozzi, & M.fl., 2014, s. 2). For at nævne et eksempel fra den virkelige verden, kunne Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø i 2009 berette, at kvinder, der arbejder i plastindustrien, 20 % oftere får behandling for ufrivillig barnløshed. Forskerne havde ingen definitiv forklaring på tendensen, men påpegede at det bl.a. kunne skyldes, at kvinderne i højere grad var eksponeret for kemikalier i arbejdsmiljøet, der kunne have en hormonforstyrrende effekt. Det er i al fald påfaldende, at man i dette tilfælde tilsyneladende fandt en lavere fertilitet blandt de kvindelige medarbejdere, når det netop er i plastindustrien, at f.eks. BPA anvendes. (Politiken, 2009)

De forløbende eksperimentelle undersøgelser antyder, at BPA's virkning på det kvindelige reproduktive system skyldes, at BPA kan have agonistisk effekt med østrogenreceptorer i celler. Dette kan give problemer i forbindelse med reproduktion, da reproduktive processer kræver omhyggelig koordinering af hormoner frigivet fra hypothalamus, hypofysen og kønsdelene (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 177). Trods omfattende undersøgelser og litteratur om eksperimentelle dyre- og mekaniske forsøg er der endnu ikke nogen bedømmelser, som sammenfatter de toksikologiske undersøgelser af BPA's effekt på det kvindelige reproduktive system (Segni, Mallozzi, & M.fl., 2014). Til trods for disse usikkerheder og huller i viden omfattende BPA's påvirkning, så er der så meget foreliggende dokumentation, at der i dag træffes valg i henseende med at forebygge eksponering for BPA (Segni, Mallozzi, & M.fl., 2014, s. 1).

Reproduktive skader

I en undersøgelse, som undersøger sammenhængen mellem eksponering af BPA og infertilitet hos kvinder, ses en direkte effekt af BPA's påvirkning på modningen af æg hos mennesker. Undersøgelsen, som blev ledet af Dr. Catherine Racowsky, direktør for "Assisted Reproductive Technologies Laboratory" gennemførte studiet ved tilfældigt at tage 352 kasserede æg fra 121 patienter, som havde været igennem in vitro fertilisering. Æggene blev udsat for forskellige koncentrationer af BPA, men ét æg fra hver patient undgik eksponering, da det skulle bruges til kontrol (Machtinger, Combelles, & M.fl., 2013). Efter æggene havde været udsat for BPA, sås følgende resultater:

- Fald i procentdel af æg, som var modnet
- Procentdel af æg der undergik spontan aktivering steg, hvilket er en unormal proces, hvor et ubefrugtet æg agerer som hvis det var befrugtet.

Desuden var der fejl ved nogle af de modnede æg. Forskerne så, at de modnede æg havde en tendens til ikke at have bipolære spindler og afstemte kromosomer, som upåvirkede æg har. Dr. Racowsky siger om resultaterne "*Our data show that BPA exposure can dramatically inhibit egg maturation and adds to a growing body of evidence about the impact of BPA on human health. I would encourage further research to gain a greater understanding of the role BPA plays in infertility*" (Ellis, 2013). Denne undersøgelse viser, at der kan være en sammenhæng, men forskeren siger endvidere, at der skal langt mere forskning til før, man kan sandsynliggøre det.

Tidlig pubertet

En af mistankerne om BPA's skadelige effekter er tidlig menstruation hos piger. Siden slutningen af 1800-tallet er der observeret et fald i alderen af pubertetsudvikling. Eksempelvis i Danmark er menstruationsalderen faldet fra 17 år til ca. 13 år i dag over de sidste 100 år (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 118). Endvidere er hyppigheden for unormal tidligt pubertet helt ned til 6 år forøget (Bjerregaard, 2013, s. 175). Gener kan ikke redegøre for disse sekulære ændringer i timingen af pubertetsbegyndelse, da ændringerne er sket over de sidste få årtier, og derfor er det mest sandsynligt, at der er miljømæssige faktorer, som spiller en rolle her (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 118).

Der er flere teoretiske mekanismer ved BPA, som mistænkes for at kunne inducere tidlig pubertet, hvilket kan ses nedenunder (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 122):

- 1) Hurtig modning af hypotalamus / hypofyse-aksen. Det er nemlig herfra hormonerne LH og FSH udsendes og er medvirkende i igangsættelsen af puberteten.
- 2) En perifer påvirkning på hormonniveauer i æggestokkene eller brystet. Flere laboratorieforsøg tyder nemlig på, at prænatal eksponering af naturlige eller syntetiske østrogener kan være med til at fremskyde puberteten. I forsøg med gnavere har en vaginal åbning, som er det tidligste synlige tegn på pubertet, fremkommet som respons ved eksponering af forhøjede niveau af østrogener og østrogenlignende stoffer, herunder ved udsættelse for BPA. (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 122)

Brystkræft

BPA mistænkes yderligere for at kunne være en medvirkende faktor i udviklingen af brystkræft. Frekvensen af brystkræfttilfælde har generelt været stigende gennem de senere år, og risikoen for at dø af en konstateret brystkræft er tilmed steget i takt med eksponering af stoffer med østrogenlignende effekter (Bjerregaard, 2013, s. 175). Der ses en mulig sammenhæng mellem brystkræft og eksponering af hormonforstyrrende kemikalier med østrogenlignende effekt så som BPA. Østrogen er ikke i sig selv et kræftfremkaldende stof, men østrogener kan fremme væksten af tumorer, hvis de allerede er begyndt at udvikle sig (Bjerregaard, 2013, s. 175). Forholdet mellem BPA eksponering og udvikling af brystkræft er endnu ikke prøvet på mennesker, men dyremodeller er brugt. Disse tyder på, at fosterets udviklingsmæssige periode kan være den mest følsomme periode over for BPA eksponering. Det skyldes omprogrammering i brystet, som øger kræftmodtageligheden. Fra en undersøgelse med mus, hvor man så på udviklingen af brystkræft

som følge af BPA eksponering udtaler Hugh Taylor, MD, fra Yale University School of Medicine in New Haven, Conn., til Medical News Today; *“BPA is a weak estrogen and DES is a strong estrogen, yet our study shows both have a profound effect on gene expression in the mammary gland (breast) throughout life”* (James, 2010). Med dette påstår han, at hans undersøgelser viser, at BPA kan have en indvirkning på genekspressionen i mælkekirtlerne. Yderligere tilføjer han, at selv svage østrogenlignende stoffer, altså med lav affinitet for østrogenreceptorer, kan ændre udviklingen af brystet i følge undersøgelsen. Dette betyder, at eksponeringen for BPA selv prænatalt kan placere voksne kvinder i risikogruppen for udvikling af brystkræft (James, 2010). En dybere forståelse af omprogrammeringen er endnu ikke klarlagt.

Konsekvenser hos hankønnet

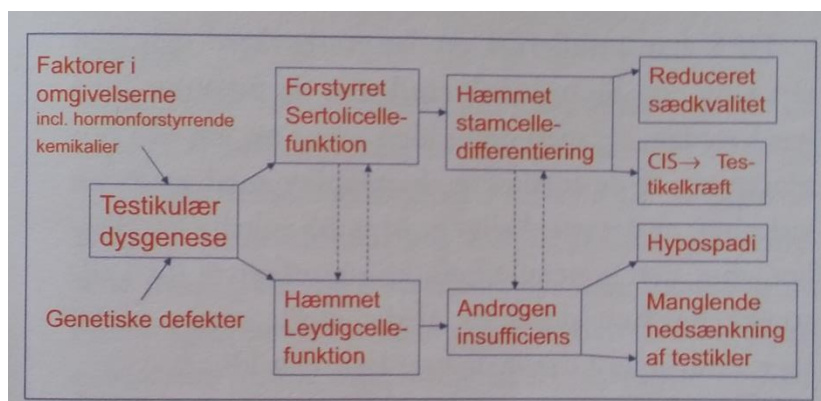
BPA mistænkes også for at have forskellige skadelige virkninger hos hankønnet. Hos mænd har højere niveauer af BPA været forbundet med blandt andet seksuel dysfunktion, dårligere sædkvalitet og hormonal ubalance. Hos drengebørn ses lavere fødselsvægt og misdannelser på kønsdele. Desuden ses en hormonal ubalance i forbindelse med BPA eksponering eller udsættelse for forurenede miljøer med BPA (Mohd, Ejaz, & M.fl., 2015). Toksikologiske undersøgelser af BPA's effekt hos mus, rotter og andre dyremodeller har vist, at BPA kan have skadelige virkninger på mænds reproduktionsfunktioner, ligesom det er vist for kvinder. In vitro forsøg med rotter og kulturer fra humane føtale testikler viste, at BPA havde dosisafhængige anti-androgene virkninger. I 1997 blev forsøg udført med drægtige mus. Forsøgene viste, at ved doser på 2 µg/kg/dag BPA, var den resulterende effekt forstørret prostata hos afkommet af hankøn. Til sammenligning angives det, at denne dosis er ækvivalent til en dosis på 50 µg pr. dag for et barn på 25 kg eller en dosis på 150 µg pr. dag for en voksen på 75 kg (Nagel, Saal, & M.fl., 1997)

Skader på reproduktive funktioner

Der er de senere år sket en stigning i forekomst af følgende biologiske skader hos mænd (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 145+148):

- Testikelkræft
- Nedgang på sædtal
- Frekvens af kryptorkisme (mangelfuld nedsynkning af testikler)
- Hypospadi (ufuldstændig dannelse af mandlige kønsorganer)

De seneste års forskning har vist, at dette er fire forskellige udtryk for den samme grundlæggende forstyrrelse i kønsudviklingen, og det ses nu som et sammenhængende syndrom, som kaldes testikulær dysgenese syndrom (TDS) (Bjerregaard, 2013, s. 172). På figur 10 nedenfor ses en årsagssammenhæng, hvor TDS kan føre til reduceret sædkvalitet, testikelkræft på grund af forstyrrelser i sertolicellefunktionen, som så fører til hæmmet stamcelle differentiering. Desuden ses der også en sammenhæng mellem hæmning af leydigcellefunktion, utilstrækkelig androgen, som kan føre til hypospadi og manglende nedsækning af testikler.



Figur 10: På figuren ses en række virkningsmekanismer forårsaget af testikulært dysgenese syndrom. Øverst ses at en forstyrrelse i sertolicellefunktionen kan føre til hæmning af stamcellers evne til differentiering, som så kan føre til reduceret sædkvalitet og testikelkræft. Nederst ses en virkningsmekanisme hvor der sker en hæmning af leydigcellefunktionen, hvilket fører til androgen utilstrækkelighed dvs. mangel på mandligt kønshormon, som kan føre til hypospadi og manglende nedsækning af testikler. Desuden ses det, at der kan ske en vekselvirkning mellem forstyrrelser i sertolicellefunktion og hæmning af leydigcellefunktion, hvilket også er tilfældet med hæmning af stamcelledifferentiering og mangel på mandligt kønshormon (Bjerregaard, 2013, s. 173).

Undersøgelser viser, at mænd som udvikler testikelkræft generelt set har haft lavere fertilitet inden sygdommens udbrud end mænd med højere fertilitet. Desuden har drengebørn, som fødes med kryptorkisme eller hypospadi, forøget risiko for udvikling af testikelkræft (Bjerregaard, 2013, s. 173). Det betyder, at fosterskader af mandlige kønsorganer (kryptorkisme og hypospadi), ændringer i mandlige reproduktive hormoner, dårlig sædkvalitet og testikelkræft har en negativ indvirkning på mænds reproduktive sundhed, hvilket i værste fald kan føre til infertilitet (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 145).

Da forøgelsen af disse tilfælde er gået stærkt og er sket inden for få årtier, så slår man ideen væk om, at det kan skyldes genetiske ændringer. I dag er der indført en såkaldt ano-genital afstand hos drengebørn med TDS, hvilket er en sensitiv markør, som viser afstanden mellem anus og kønsdelene. Afstanden mellem anus og de ydre kønsdele er kortere hos hunkøn end hankøn (Bjerregaard, 2013, s. 173). Nedsat påvirkning af androgener hos drengefostre mistænkes derfor for at kunne forkorte ano-genitalafstanden hos drenge udsat for hormonforstyrrende stoffer med østrogenlignende effekt. Den forkortede afstand korrigeres ikke senere i livet. Ano-genital afstanden bruges derfor som indeks til at måle på androgen virkning i et nyfødt barn (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 148)

Der kan være forskellige ændringer i kvinders liv, som kan have ført til forandring i fosterets østrogenpåvirkning, hvilket med stor sandsynlighed tyder på, at det skyldes hormonforstyrrende stoffer med østrogenlignende effekt. Det er endnu ikke vist en sammenhæng med BPA's virkning og denne forekomst. Men diethylstilbestrol (DES) som er en derivat af BPA blev i 1940-1970 givet til mange gravide, og i denne periode var der en markant stigning i tilfælde af hypospadi, kryptorkisme og lavt sædtal, hvilket kunne vise en sammenhæng mellem stoffer med østrogenlignende effekt og udvikling af TDS (Bjerregaard, 2013, s. 174). Endvidere kan undersøgelser tyde på, at en del af forklaringen på disse sundhedsmæssige problemer skyldes, at eksponeringen af hormonforstyrrende stoffer som BPA under mandens reproduktive udvikling kan forstyrre bindingen af androgener til receptorer. Dette kan permanent skade mandelige reproduktive systemer (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 76). Forstyrrelser i bindingen af androgener til receptorer anses at være koblet sammen med agonistisk og antagonistisk vekselvirkning med kroppens naturlige steroidhormoner i udviklingen og funktionen af de reproduktive systemer. Disse vekselvirkninger kan ske via forskellige veje som eksempelvis binding til steroidreceptorer eller binding til steroidbindende proteiner. Binding af BPA til blandt andet androgenreceptorer, AR, i kroppen udgør en potentiel metode til at blande sig i kroppens hormonbalance, og dermed føre til skadelige virkninger på steroid målorganer, hvilket er de organer, som stimuleres af steroidhormoner (Mohd, Ejaz, & M.fl., 2015). Selvom flere undersøgelser tyder på denne sammenhæng siger WHO (World Health Organization) *"Temporal increases in the frequency of development abnormalities of the male reproductive tract, particularly cryptorchidism and hypospadias, have been reported, but the role of exposure to EDCs (endocrine disrupters chemical)*

is unclear. Experimental data show that a number of chemicals can disrupt development of the male reproductive tract via endocrine mechanisms” (WHO, 2015, s. 3, Chap 1).

Mænds reproduktive funktioner såsom sædkvalitet tænkes også at kunne påvirkes senere i livet ved eksponering af BPA. En femårig undersøgelse af fabriksarbejdere i Kina har linket eksponering af BPA og dårlig sædkvalitet sammen. Studiet er foretaget af forskere fra forskningsafdelingen i Kaiser Permanente, og det omhandler 514 medarbejdere. Studiet viste, at arbejdere, som havde et højt niveau af BPA i urinen havde to til fire gange større risiko for dårlig sædkvalitet, herunder lav sædtal, lav fertilitet (evne til at flytte sig), vitalitet og koncentration sammenlignet med de arbejdere, som havde lavere koncentrationer af BPA i urinen. Dette kan tyde på, at BPA også kan have kortsigtede konsekvenser og ikke kun længerevarende som ellers er i fokus. For at gøre testresultaterne så valide som muligt blev testpersonerne stillet flere livsstilsrelaterede spørgsmål for at udelukke andre årsager til dårlig sædkvalitet. Herunder var der spørgsmål om rygning, alkoholforbrug, kroniske sygdomme, udsættelse for andre kemikalier, varmepåvirkning af testikler. Forskerne udtaler således om forsøgsresultaterne ” *Even though the sample size of the men who were exposed to low levels of BPA was not high, the inverse link between increased urine BPA and decreased sperm concentration and total sperm count remained statistically significant, said the researchers” (Paddock, 2010).*

Det skal dog pointeres, at der endnu ikke er evidens for at sandsynliggøre og dermed konkludere noget i forbindelse med sundhedsmæssige skader af BPA, men undersøgelser tyder på, at der kan være en sammenhæng. Sundhedsorganisationer siger således om sammenhængen mellem forringelse af sædkvalitet og hormonforstyrrende stoffer ”*Even if there has been deterioration in semen quality, this would not necessarily be due to endocrine disruption” (WHO, 2015, s. 3, Chap 1).*

Hvordan eksponeres vi for BPA

For at vi mennesker kan blive påvirket af BPA, skal vi eksponeres for det, og de vigtigste kilder til, hvordan vi mennesker eksponeres for BPA er sandsynligvis gennem mad og drikkevarer, som har været opbevaret i BPA-holdige materialer såsom plastisk af PC eller dåser beklædt med epoxyplast. Undersøgelser tyder nemlig på, at BPA frigives fra materialer til fødevarer, drikke, spildevand og luft, og dermed kan vi mennesker nemt udsættes for BPA. Endvidere tyder nogle undersøgelser på,

at hudkontakt med materialer med BPA kan bidrage til yderligere eksponering for BPA (Lanlan, Qianqian, & M.fl., 2015).

Overførsel af BPA til madvarer

BPA findes som sagt mange steder i vores hverdag, da BPA er en af byggestenene for bestemte typer plastik. Typisk kan man finde BPA på indersiden af dåser i form af lak eller et lag epoxyplastik, som fungerer som en beskyttende membran. Denne tynde membran kan afgive BPA, som derefter kan optages i dåsens indhold eksempelvis fødevarer. Dette skyldes, at BPA er monomer i PC eller epoxyplast, hvor det er en del af en polymer, hvor der kan være restmonomere tilbage af BPA, som kan overføres fra materialet til fødevarer og derefter til mennesker via oralt indtag (Rank, 2013, s. 141-144).

Frigivelsen af BPA kan fremprovokeres under bestemte forudsætninger såsom varme, hvilket eksempelvis kan være tilfældet, når forældre varmer mælk i sutteflasken til deres børn. Dermed kan overførslen af BPA være forøget (Rank, 2013, s. 141-144). Hertil kan pH-værdien på indholdet i dåserne, plastikflaskerne og lignende beholdere have en indflydelse på frigivelsen af BPA, som absorberes i deres indhold. Desuden har kontakttiden mellem beholder og fødevarer en vigtig rolle at spille, idet jo længere tid fødevaren er i kontakt med PC eller epoxyplasten, desto mere BPA bliver der overført (Pedersen & m.fl., 2015). I (Nam, 2010) undersøges det om genbrug af polycarbonatflasker kan være årsag til en forøget afgivelse af BPA, som migrerer til flaskens indhold. Resultater fra studiet viste, at koncentrationen af BPA i nyproducerede og genbrugte flasker (6 måneder gamle) ved bestemte temperaturer (40°C og 95°C) havde en nævneværdig forskel i koncentrationen af BPA, hvilket kan indikere, at man ikke bør genbruge polycarbonatflasker, da det kan afgive BPA. En undersøgelse viste, at en forøgelse af temperaturen afgav BPA. Ved 100°C, som oftest benyttes ved pasteurisering, afgav polymeren i en dåse 18 gange mere BPA (Nam, 2010).

I (Torres & Ramirez, 2014) redegøres for forskellige typer plastik til brug i indpakningen af fødevarer. Bestemte fysiske egenskaber hos de forskellige typer plastik kan gøre enkelte typer mere favorable at bruge med henblik på, at plastikken skal være gennemsigtig, blød, hård etc. Der nævnes polycarbonat, polyethylen, polypropylen, og styrene, som hver stammer fra forskellige polymere. Til flere af disse typer plastik kan producenten tilsætte bestemte stoffer, som gør

plastikken mere resistent over for sol, kulde, samt forøgelse af fleksibiliteten i plastikken. Disse egenskaber kan være eftertragtede af madproducenter, som benytter plastikken som emballage. I (Torres & Ramirez, 2014) påpeges, at de komponenter som indgår i plastikken, samt tilsætningsstoffer, kan ligge til grund for BPA's indtrængen i fødevarer. Derudover redegøres for de konsekvenser BPA kan have på fødevarer, som er i kontakt med polymeren. Det understreges, at især polycarbonat er en eftertragtet type plastik, da den er hårdfør, gennemsigtig og varmeresistent, hvilket gør den eftertragtet til opbevaring af mange typer fødevarer. Det konkluderes tilmed, at den primære grund til migreringen af BPA til fødevarer skyldes diffusion og hydrolyse. Diffusion skyldes, at der kan forekomme en koncentrationsforskel af BPA i fødevarer og tilhørende beholder, hvor partikler bevæger sig fra høj til lav koncentration mellem fødevaren og materialet fødevaren opbevares i. Dette gør, at komponenter i eksempelvis polycarbonat, herunder BPA, kan blive frigjort og trænge ind i fødevaren. Dertil kan varme fremskynde denne proces, da molekylerne får større bevægelse. Hydrolyse kan forekomme, når plastikken kommer i kontakt med vand, som kan forårsage nedbrydning af polymeren i overfladen på plastikken, hvilket kan resultere i en øget afgivelse af BPA. Dette kan ske, når plastikken kommer i kontakt med vandige fødevarer, som kan være en polycarbonatbeholder, som indeholder drikkevand eller lignende.

Absorbering af BPA til huden

De fleste mennesker er til daglig i fysisk kontakt med produkter indeholdende BPA, såsom bestemte typer papir herunder termisk papir, som blandt andet benyttes i boner. Flere forskellige studier er foretaget på baggrund af denne problemstilling. I (Demierre & M.fl., 2012) undersøges absorbering af BPA ved dermal kontakt, hvor det konkluderes, at eksponering af BPA på huden udgør en lille faktor på baggrund af kroppens allerede samlede belastning af BPA-eksponering fra oralt indtag. Et andet studie (Biedermann & M.fl., 2010) underbygger denne konklusion. I dette studie benyttes en anden metode end (Demierre & M.fl., 2012), hvor penetreringen af BPA studeres efter tilførsel af væske på termisk papir med BPA. Dette viste højere absorbering i huden baseret på, hvor meget BPA der kunne ekstraheres fra huden. Konklusionen på (Biedermann & M.fl., 2010) lyder, at BPA-absorbering på huden afhænger af eksponeringstid og hudtilstand. Dertil hvilken form BPA var i, idet undersøgelsen blandt andet påviste, at en opløsning af BPA i ethanol efter 60-90 minutter ikke længere eller kun delvist kunne ekstraheres fra huden. Derimod kunne dermaleksponering med termisk papir med BPA i 120 minutter stort set ekstraheres helt fra huden. Dermed kunne (Biedermann & M.fl., 2010) ikke påvise, at BPA bliver optaget i metabolismen i

kroppen, men kun at der var en sandsynlighed for dette. Der argumenteres for, at BPA kan være trængt så langt ind i huden, at det ikke kan ekstraheres eller vaskes af.

I hvor høj grad er vi eksponeret for BPA?

Den omfangsrige produktion af plast indeholdende BPA har bevirket, at mennesker i stigende omfang omgives af BPA i hverdagen, hvor mange mennesker jævnligt indtager BPA. Derfor antages det, at BPA findes i væv og kropsvæsker i hovedparten af verdens befolkning.

I USA og Canada anslås det, at over 90 % af befolkningen har målbare niveauer af BPA i urinen (Arbuckle, Marro, & M.fl., 2014). I en anden undersøgelse fra USA fandt man BPA i navlestrengen fra alle fostre, der blev testet (Gerona, Woodruff, & M.fl., 2013). Fra 2006 til 2012 undersøgte man BPA-niveauer i urinen fra mere end 3600 danske børn, unge, yngre mænd og gravide kvinder. Forskerne bag undersøgelsen konkluderede, at BPA er at finde i størstedelen af danskeres urin (Frederiksen, Jensen, & M.fl., 2014). Hvis det viser sig, at forekomsten af BPA i det humane legeme kan udgøre en sundhedsrisiko, betyder det, at de befolkningsgrupper, som hormonforstyrrende effekt kan have størst konsekvenser for, har kemikaliet i kroppen. Det kan betyde, at BPA allerede kan have haft konsekvenser for deres sundhed. Det gælder primært børn, yngre voksne og gravide kvinder og dermed deres fostre.

Grænseværdier for BPA i produkter

Da BPA har hormonforstyrrende effekter fastsættes der grænseværdier, som er den højeste koncentration af BPA, som ikke har vist toksiske effekter i dyreforsøg. For at fastsætte grænseværdier for BPA laves der med baggrund i dyreforsøg en NOEL og LOEC. NOEL er tidligere beskrevet som grænsen for, hvornår der sker ændringer i en organisme. LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) er den koncentration, hvor der er fundet lavest observerede biologiske ændringer, på 0,050 mg/kg kropsvægt pr. dag for BPA. EU har i 2002 bestemt, at dette skulle være TDI (Tolerabelt Daglig Indtag). I februar 2015 blev en midlertidig TDI på 4 µg/kg/dag indført (Meister, 2016). Desuden har EU fastlagt en migrationsværdi på 0,6 mg BPA/ kg. Der må altså ikke sive mere end 0,6 mg BPA/kg ud i produktet, hvilket vil sige, at der skal indtages en del mad med BPA, før man vil kunne se en hormonforstyrrende effekt ifølge disse maksværdier (Rank, 2013, s. 143-151).

Et eksempel med et menneske på 80 kg, som må indtage

$$0,0040 \text{ mg/kg pr dag} \cdot 80 \text{ kg} = 0,32 \text{ mg BPA pr. dag.}$$

Hvis fødevaren må indeholde 0,6 mg BPA/kg fødevare ($\frac{0,32}{0,6} = 0,533 \text{ kg}$), skal personen på 80 kg indtage 0,54 kg fødevarer med BPA pr. dag, for at få en effekt af BPA.

YES-assay

YES-assay (YES) tilhører en in vitro metode, som hører under kategorien bioassay, og det kan benyttes til påvisning af østrogenlignende stoffer i eksempelvis kemiske opløsninger. YES er, blandt flere metoder til påvisning af østrogenlignende stoffer, en forholdsvis enkel metode. Der er flere fordele ved YES som eksempelvis, at reaktionen forekommer hurtigt, reagerer forholdsvis nemt og det kræver ikke dyre og komplicerede faciliteter. I det anvendte YES i projektet benyttes gærceller. Man kan dog i stedet for gærceller benytte celler fra pattedyr, men disse er mere komplicerede at arbejde med, da de nemmere påvirkes af udefrakommende faktorer, herunder tungmetaller og toksiske bakterier. Disse kan være fejlkilder ved analyse for påvisning af østrogenlignende stoffers tilstedeværelse. Ved analyse af en prøve taget fra et bestemt miljø, hvor der kan forekomme forurening, er YES derfor egnet til påvisning af østrogenlignende stoffer (Clemens, 2012).

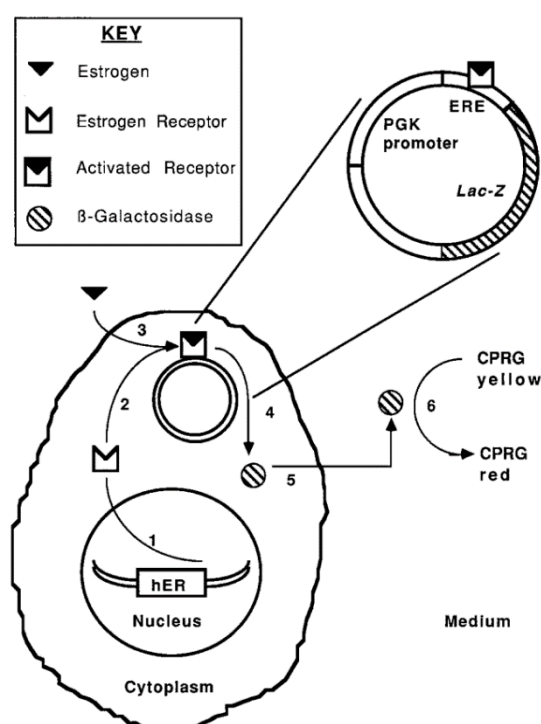
YES-assay som model

I (Routhledge & Sumpter, 1996) beskrives en del af teorien bag YES, samt den eksperimentelle gennemgang, hvor dette studie undersøger overflademateriale fra vand og karakteriserer disse materials østrogenlignende effekt.

Dette afsnit vil udelukkende tage udgangspunkt i (Routhledge & Sumpter, 1996), hvor sammensætningen af YES in vitro beskrives samt sammenspillet mellem afgørende komponenter i assayet. Formålet med YES er at indikere stoffer med østrogenlignende effekts tilstedeværelse. Tilstedeværelsen af østrogenlignende stoffer i YES kan både påvises kvalitativt eller kvantitativt, hvilket gør denne metode oplagt at benytte til påvisning af østrogenlignende effekt. Udelukkende ved et farveskift fra gul til rød, som bør kunne ses med det blotte øje, kan man kvalitativt konstatere østrogenerns tilstedeværelse i den pågældende opløsning.

En vigtig bestanddel i YES er gær, som eksponeres for teststofferne, men da gær normalt ikke indeholder østrogenreceptorer, integreres DNA-sekvenser i gærcellernes genom (se figur 11 trin 1),

som koder for humane østrogenreceptorer (hER). hER bliver udtrykt i en form, som kan binde til østrogensekvenser. Tilmed er der bestemte plasmider til stede i gæren, som bærer et bestemt gen, kaldt lac-Z, som koder for enzymet, β -galactosidase. Ved tilstedeværelsen af østrogenlignende stoffer som binder sig til aktive ligander, vil lac-Z blive udtrykt, og β -galactosidase blive syntetiseret. β -galactosidase katalyserer reaktion fra substrat til produkt, dertil vil der forekomme et farveskift fra gul til rød, som kvalitativt indikerer østrogenlignende stoffers tilstedeværelse. Den gule farve skyldes β -galactosidase. Den røde farve vil forekomme når β -galactosidase kommer i kontakt med østrogenlignende stoffer og skyldes, at β -galactosidase omdanner red-D-galactosidase (CPRG) (typisk en gul farve) til en rød farve (se figur 11 trin 6).



Figur 11: [1] Humane østrogenreceptorer integreres i gærcellernes genom vha. humane DNA sekvenser. [2] Østrogenreceptorer som kan binde sig til østrogen. [3] Østrogen aktiverer receptorer. [4] Når østrogen aktiverer receptorer udtrykkes transporter-genet Lac-Z, [5] som syntetiserer β -galactosidase og tilføres vækstmediet. [6] metabolisering af CPRG fra et gult til et rødt produkt (Routhledge & Sumpter, 1996).

I (Routhledge & Sumpter, 1996) undersøges tilmed, hvor små koncentrationer af østrogen der skal til for at opnå et målbart resultat i YES. Til påvisning af nøjagtigheden af YES blev et forsøg med 17β -Estradiol benyttet, som ved en koncentration på 2 ng/L gav et målbart resultat, som kunne påvise, at syntetiseringen af β -galactosidase fandt sted. På baggrund af dette vurderes det af

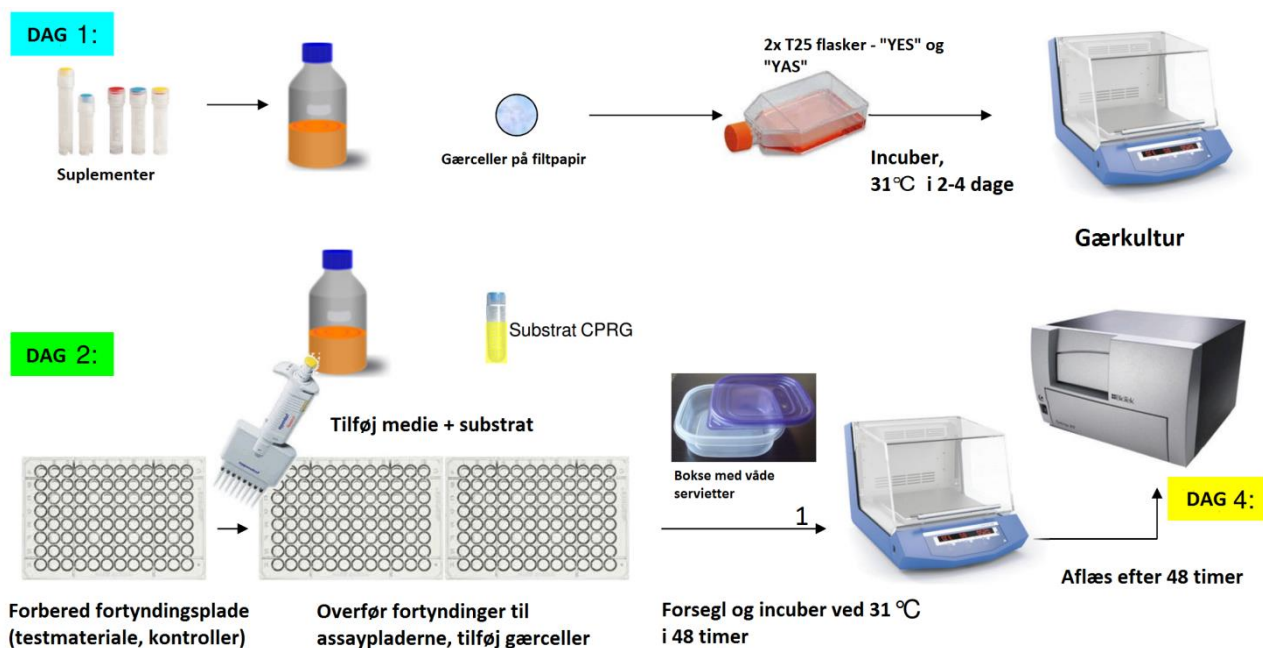
forskerne bag, at deres metode har vist sig at være reproducerbar. Rapporten giver udtryk for, at resultaterne ikke nødvendigvis stemmer overens in vivo, hvilket begrundes med arters individuelle modtagelighed over for østrogen, samt forskellige hormonelle systemer der måtte finde sted. Det konkluderes af forskerne (Routhledge & Sumpter, 1996), at deres metode til påvisning af østrogen er brugbar taget i betragtning af nøjagtigheden af deres forsøg og data. Metoden og forskerne er citeret i flere ovennævnte tekster fra afsnittet *YES-assay*; (Clemens, 2012), (Kinnberg, 2003) og (Nakama & Funasaka, 2007)

YAS-assay

YAS-assay (YAS) står for Yeast Androgen Screen, som er et bioassay, der udføres på samme måde som et YES-assay. YAS er et androgent assay, som undersøger tilstedeværelsen af androgenlignende effekt. I YAS benyttes der, som i YES, genmodificerede gærceller til at identificere stoffer, som kan interagere med hormonreceptorer (Fic, Zegura, & M.fl., 2014). For YAS indsættes androgenreceptoren, hAR, for human testosteronreceptor i gærcellernes genom. Ved tilstedeværelse af androgenlignende stoffer syntetiserer β -galactosidase, som konverterer det gule substrat CPRG til rødt produkt, som på den måde indikerer tilstedeværelsen af androgenlignende aktivitet (XENOMETRIX - Swiss Commitment for Bioassays 3.03, 2015).

Eksperimentel del – XenoScreen YES/YAS

Dette afsnit tager udgangspunkt i forsøgsproceduren, som følger med kittet *XenoScreen YES/YAS* (XENOMETRIX - Swiss Commitment for Bioassays 3.03, 2015) og har til formål at skitsere udførelsen af forsøget i projektet. Proceduren illustreres på figur 12 nedenunder. Punktvis ses alle trin for protokollen. XENOMETRIX har bl.a. på baggrund af denne kilde, produceret deres eget kit med de nødvendige komponenter til udførelsen af YES/YAS assay.



Figur 12: Figuren viser et overordnet flow chart over vores forsøgsmetode, som er illustreret over fire dage. Dag 1: Gærcellerne kommer i vækstmedie og inkuberes i 6 dage. Dag 3: Laves assaypladerne med gærceller, assay-mediet og kemikalier. Dag 4: Aflæses resultaterne vha. absorbansmåling.

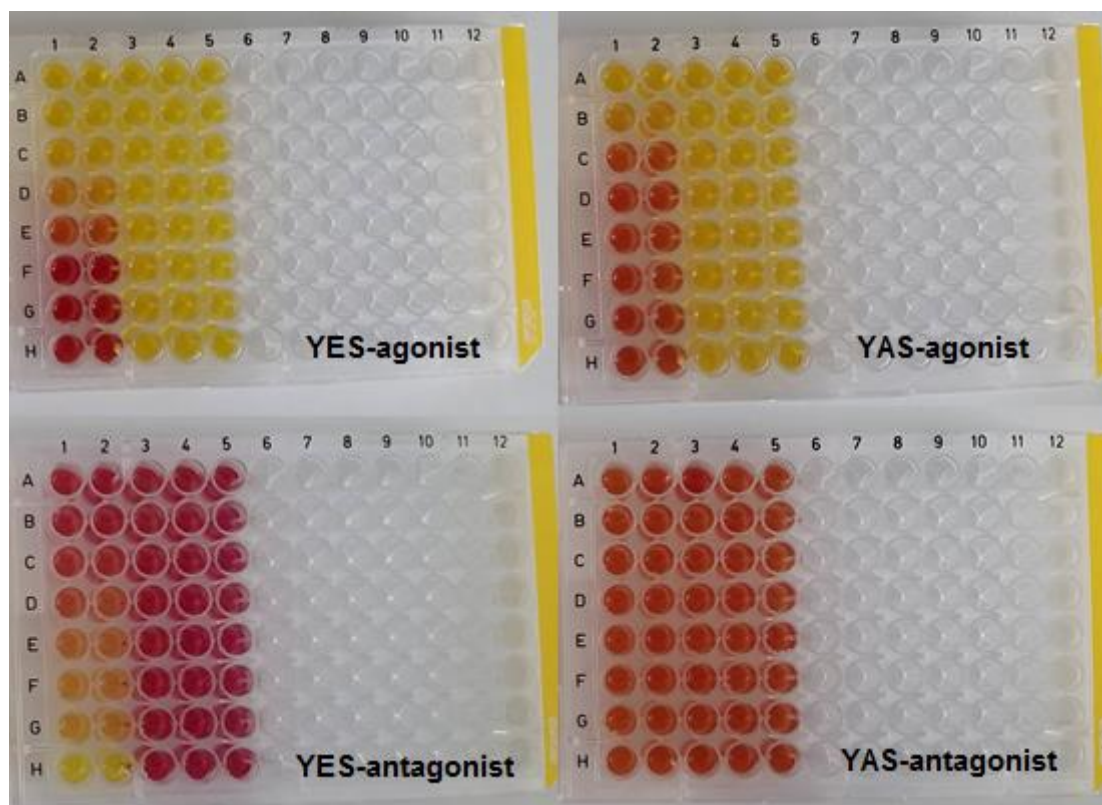
Grundprincippet bag YES er beskrevet i forsøgsvejledningen, der følger med kittet, hvor der i bilag 5 findes en detaljeret journal for fremgangsmåden, diverse informationer fra forsøgsvejledningen og de rå data fra forsøget.

På dag 1 indsættes de genmodificerede gærceller via filterpapir til vækstmediet i T25-flaskerne. Derefter inkuberes "YES" og "YAS" flaskerne ved 31°C i 6 dage ved konstant bevægelse. Ved dag 2 klargøres fortyndingspladen, hvortil bestemte koncentrationer af kemikalierne medfølgende kittet, samt testmaterialet (BPA), indsættes i assay-plader, og der tilføjes substratet, CPRG. Når et østrogenlignende stof har bundet sig til en receptor, vil der ske en korrespondance til plasmider i gæren, som modulerer lac-Z reportergen. Hertil vil syntetiseringen af β -galactosidase, som lac-Z koder for, finde sted. En konvertering af CPRG, som har en gul farve, bliver transformeret til et rødt produkt, som ved hjælp af spektrofotometri, kan kvantificeres ved 570 nm (se dag 4, sidste trin). Derudover er kittet konstrueret således, at ved en måling på OD₆₉₀, kan det fastslås, hvorvidt cytotoxiske effekter er tilstede i de pågældende assays. En måling af OD₆₉₀ foretages både efter dag 2 og 4 for at sikre, at undersøgelsen kan fortsætte. Gærcellerne, som enten er transformeret med hER α eller hAR, udsættes for seriefortyndinger af testmaterialet (BPA). Derudover benyttes positiv-

kontrollkemikalier til senere at kunne sammenligne med resultaterne opnået ved tilsætning af BPA. Cellerne inkuberes i sammenlagt 48 timer (se dag 4, sidste trin) ved konstant temperatur (31°C). Ved udtrykkelse β -galactosidase betyder det, at enten en aktivering (agonistisk) eller hæmning (antagonistisk) har fundet sted. Dette vil lede til konverteringen af CPRG (substrat) til et rødt produkt. Antagonisterne bestemmes med korresponderende referenceagonister i bestemte koncentrationer, hvor resultatet af antagonisten måles på den inhiberende aktivitet, som vil forekomme ved en reduktion af det røde produkt. Modsat antagonisterne, benyttes ikke et referencekemikalie til agonisterne.

Databehandling fra XenoScreen YES/YAS

I dette afsnit behandles data fra forsøget med YES og YAS, hvor fokus, som nævnt, vil ligge på YES, men resultaterne fra YAS er illustreret, da de har en betydning for tolkningen af resultaterne fra YES. På figur 13 nedenunder ses resultaterne fra de fire forskellige assays, som blev aflæst 20/05-2016.



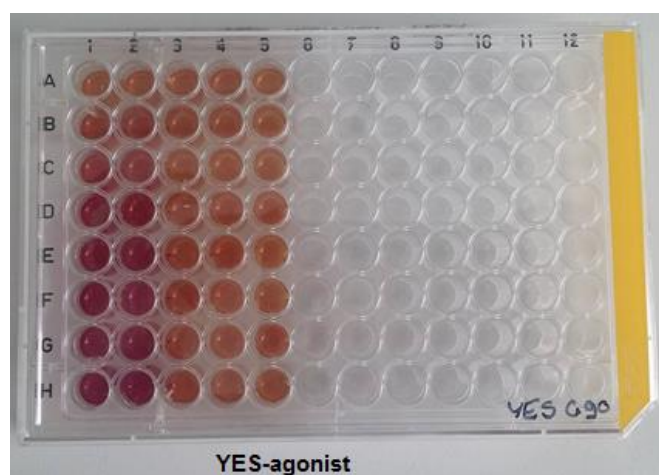
Figur 13: Resultater fra forsøget (aflæst 20/05-2016). Øverst til venstre ses YES agonist, hvor kontrollen med E2 har vist gradvis østrogenaktivitet. YES antagonist ses nederst til venstre, hvor både kontrollen og test med BPA har ændret farve. Øverst til højre ses resultatet af YAS agonist,

hvor kontrollerne har ført til farveskift. Nederst til højre ses resultaterne fra YAS antagonist, hvor der er sket farveskift for alle prøverne.

Kvalitativ behandling af data fra YES agonist og YES antagonist

YES agonist: Række A-H;1-2, se rækkeopdeling figur 13, er kontrol, hvor der er målt på E2. Resultatet viser, at jo højere koncentration af E2, desto mere mørkerød blev prøverne, hvilket indikerer, at jo højere koncentration af E2 er, des større østrogen aktivitet er der. Intensiteten i farvestyrken aftager pænt, som forventet for hver brønd, E2 er fortyndet. Det viser, at YES klart at responderet på østrogeneffekt.

Række A-H;3-5 er test af BPA. Fredag (20/05-2016) er prøverne stadig primært gule, men de er blevet en anelse mørkere end onsdag og torsdag. Ud fra dette resultat ser det ud til, at BPA ikke har haft særlig stor agonistisk effekt. Prøverne inkuberede til mandag (23/05-2016) for at se, om prøverne skulle have længere reaktionstid. Om mandagen havde alle brøndene med BPA skiftet farve til rød, hvilket kan ses på figur 14 nedenunder. Dette indikerer, at BPA har udvist østrogenlignende agonistisk effekt i YES. Under optimale forhold skulle der ses til prøverne lørdag (21/05-2016), hvor der kunne tænkes at have været større variation i farvestyrkerne. Kontrolrækkerne med E2 er derimod færdige og kan ikke bruges, da de har skiftet til lilla, som indikerer for høj koncentration, som ikke kan måles. I forsøgsbeskrivelsen under bilag 5 ligger et billede, som viser alle pladerne fra mandag. Men disse har alle skiftet farve til lilla, og derfor har de ikke relevans for databehandlingen.



Figur 14: Resultat fra YES agonist mandag 23/05-2016, hvor der er sket en ændring. Kontrollerne med E2 er blevet lilla, hvilket betyder, at koncentrationen er blevet for høj og forsøget er slut.

Prøverne med BPA har reageret og givet en klar rød farve, hvilket indikerer, at BPA har haft østrogenlignende agonistisk effekt.

YES antagonist: Række A-H; 1-2 er kontrol, hvor der er en fast koncentration af E2 og varierende koncentration af HT. Antagonisten er den hæmmende effekt, og der ses den modsatte virkning i forhold til YES agonist, hvilket stemmer godt overens, da de har modsættende effekter. Derfor ses, at jo lavere koncentration af HT, desto større aktivitet har E2, hvilket ses som den røde farve. Dette skyldes, at HT hæmmer effekten af E2. Kontrollen ser derfor ud som forventet.

Række A-H; 3-5 er prøverne med BPA i forskellige koncentrationer. Her er alle rækkerne blevet røde, hvilket kunne tyde på, at BPA har vist antagonistisk østrogenlignende effekt. Der kommer ikke en glidende overgang, som der gør for kontrollen E2.

Kvantitativ behandling af data fra YES agonist og YES antagonist

I dette afsnit er graferne for YES indtegnet, hvor absorbans ses som funktion af koncentration af henholdsvis kontrolkemikalier og BPA. Graferne er lavet ud fra absorbansværdierne og koncentrationerne, hvilket er indskrevet under journalen i bilag 5 i afsnittet ”Koncentration af BPA og kontrolkemikalier og tilhørende absorbanser”. For illustration er tabellen indsat for den første graf, som er for YES agonist kontrol.

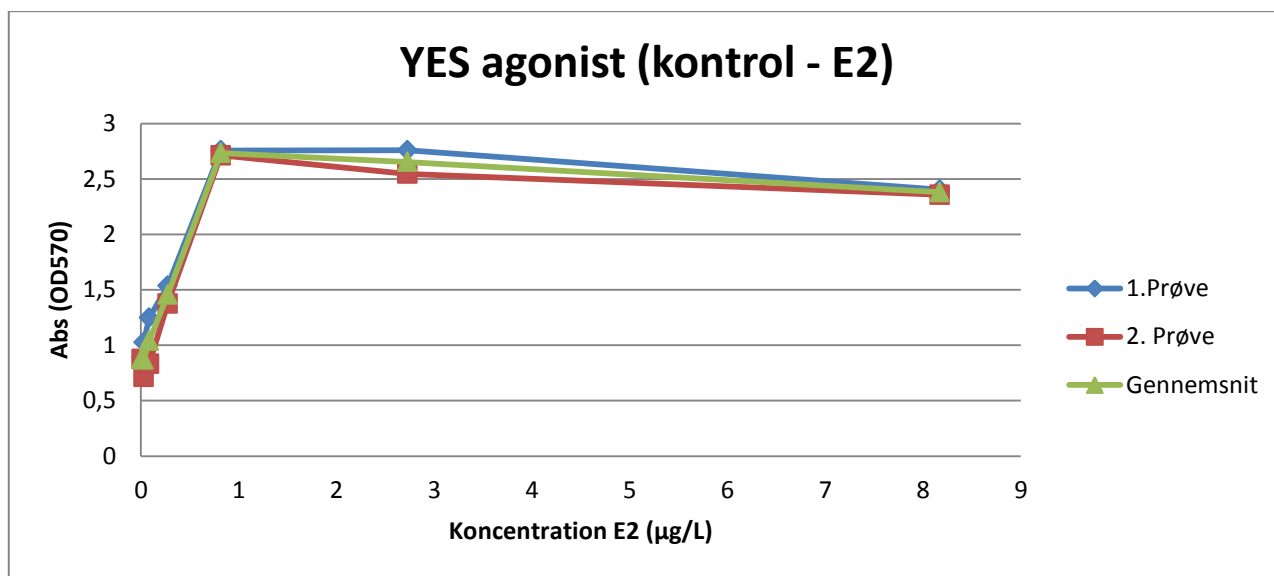
YES agonist kontrol for E2:

I tabel 1 nedenunder ses koncentrationerne af kontrolkemikaliets E2, hvor enheden er omskrevet fra mol/L til µg/L, så enhederne er de samme som for koncentrationerne af BPA.

Række	Koncentration E2 (mol/L)	Koncentration E2 (µg/L)	Abs OD ₅₇₀	Abs OD ₅₇₀
A	SC	SC	0,787	0,832
B	$1 \cdot 10^{-11}$	0,0082	0,887	0,874
C	$3 \cdot 10^{-11}$	0,027	1,024	0,713
D	$1 \cdot 10^{-10}$	0,082	1,247	0,831
E	$3 \cdot 10^{-10}$	0,272	1,536	1,375
F	$1 \cdot 10^{-9}$	0,817	2,757	2,712
G	$3 \cdot 10^{-9}$	2,724	2,759	2,547
H	$1 \cdot 10^{-8}$	8,171	2,403	2,357

Tabel 1: Koncentrationer for kontrolkemikaliets E2 til Yes agonist. Koncentrationen står først i mol/L og derefter i µg/L, da det svarer til enheden for koncentrationen af BPA. Til sidst ses de to forskellige absorbanser, som er for række A-H;1-2. SC står for solvent kontrol, hvor der ikke er E2 i.

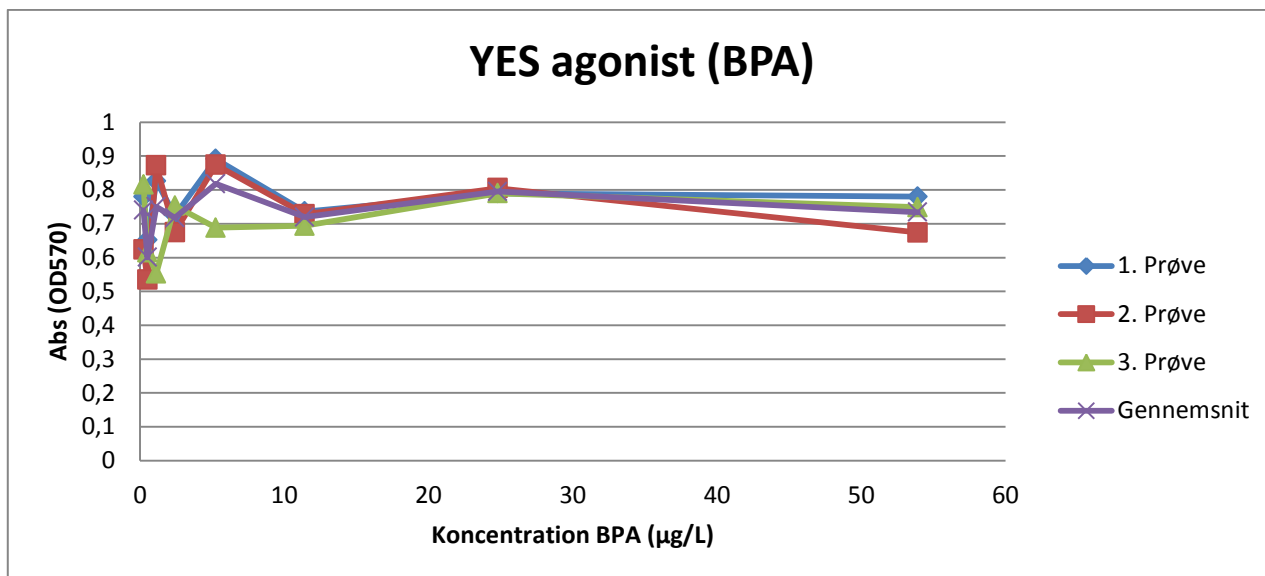
Tabellens data er benyttet til at lave grafen i figur 15 nedenunder, hvor koncentrationen af E2 i $\mu\text{g/L}$ er på X-aksen og absorbansen, som er målt ved 570 nm, er op ad Y-aksen. Den blå og røde graf viser absorbansværdierne for de to prøver med E2 i rækkerne B-G;1-2. Det ses, at jo højere koncentration af E2, desto højere østrogenaktivitet og dermed en større omdannelse af substrat til produkt. Farveovergangene i rækkerne B-G;1-2 giver en fin overgang, hvor H-E giver en rød farve og D-B er mere gullige. Dette viser, at YES kan bruges til påvisning af østrogenaktivitet.



Figur 15: Graf for YES agonist, hvor absorbansen er som funktion af koncentrationen af ES ($\mu\text{g/L}$). Den blå og røde graf viser absorbansværdierne for de to prøver med E2 i rækkerne B-G;1-2. Det ses, at når koncentrationen af E2 stiger, så stiger absorbansen ligeledes. Det er mest markant i starten, og derefter flader kurven ud.

YES agonist for BPA:

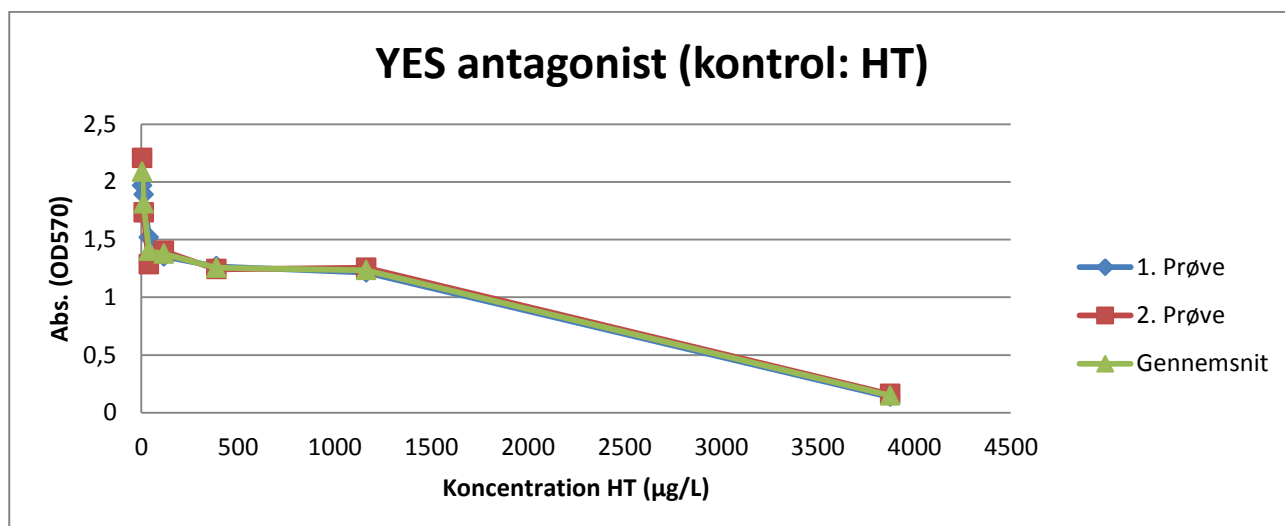
På figur 16 nedenunder ses grafen for YES agonist for prøven med BPA, hvor absorbansen ses som funktion af koncentrationen af BPA i $\mu\text{g/L}$. Det er data fra d. 20/05-2016, som er benyttet til at lave grafen. Resultaterne fra d. 23/05-2016 kan ikke benyttes til kvantitativ brug, da de andre prøver, som skal bruges til sammenligning, er kørt færdige. Det vil derfor være forkert at sammenligne data fra to forskellige dage. Kurverne er ret flade, hvilket viser, at absorbansværdierne er ret ens. Dette stemmer overens med, at prøverne stadig var meget gule i alle rækkerne for BPA. Der ses derfor ikke dosisrespons effekt.



Figur 16: Graf over YES agonist med BPA, hvor absorbans er funktion af koncentrationen af BPA (µg/L). Den blå, røde og grønne graf er absorbans for de tre prøver med BPA i rækkerne A-H;3-5. Den lilla graf er gennemsnittet af absorbansværdierne for de tre prøver. Absorbansværdierne er relativt stabile trods stigende koncentrationer af BPA, hvilket stemmer overens med den gule farve, som kunne ses fredag 20/05-2016.

YES antagonist kontrol E2 ($1 \cdot 10^{-9}$ M) og HT:

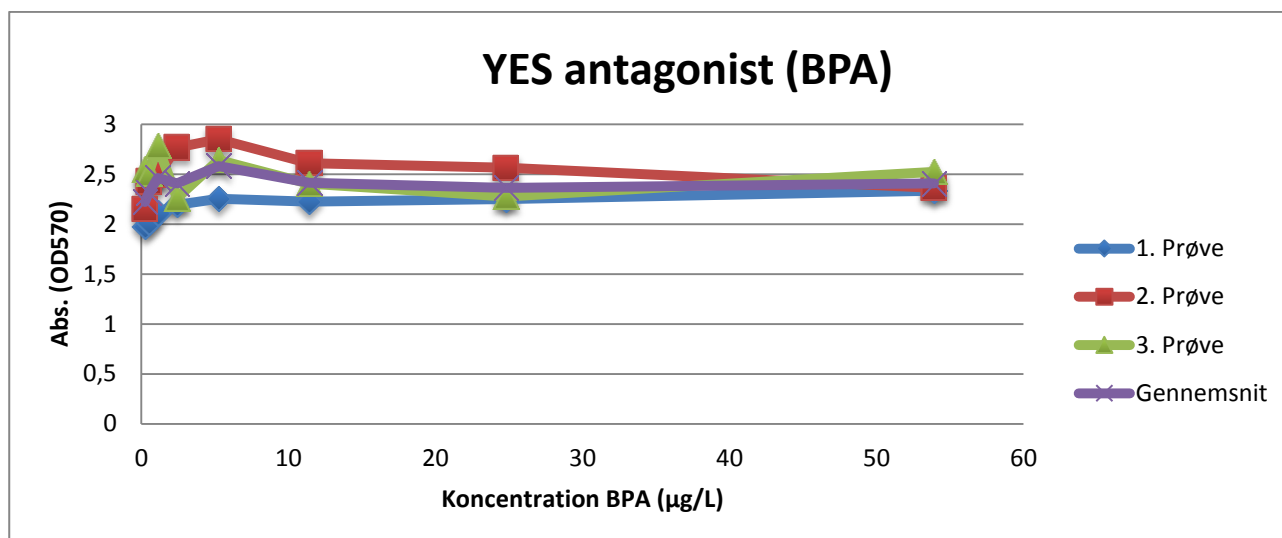
Grafen nedenfor på figur 17 viser sammenhørende absorbansværdier og koncentrationer for HT (µg/L), hvor absorbans er funktion af koncentrationerne. Den blå og røde graf viser absorbansværdierne for prøverne med HT i række B-H;1-2. Den grønne graf viser gennemsnittet af værdierne. Ud fra graferne kan det ses, at ved lave koncentrationer af HT, har E2 en høj aktivitet, hvilket kan ses på den høje absorbans, hvor der er omdannet gult substrat til rødt produkt. Efterhånden som koncentrationen af HT stiger, sker der en større hæmning af E2's aktivitet, og dermed omdannes der trinvist mindre substrat til produkt, hvilket ses i faldet af absorbans, som nærmer sig 0 ved den højeste koncentration af HT.



Figur 17: Graf for YES antagonist, hvor absorbans er funktion af koncentration af HT ($\mu\text{g/L}$). Den blå og røde graf viser absorbansværdierne for prøverne med HT i række B-H;1-2. Den grønne graf viser gennemsnittet af værdierne. Grafen viser, at ved lavere koncentrationer af HT, har E2 høj effekt. I takt med stigning af koncentration af HT, falder absorbansen, da E2's effekt hæmmes af HT, og derfor omdannes der mindre substrat til produkt.

YES antagonist for BPA:

Graferne i figur 18 nedenfor viser sammenhængende værdier for absorbans og koncentration af BPA ($\mu\text{g/L}$). Den blå, røde og grønne graf er absorbansværdierne for prøverne med BPA i række A-H;3-5. Den lilla graf er gennemsnittet af værdierne. Værdierne er relativt ens, hvilket stemmer overens med, at brøndene havde en meget ens farve hele vejen igennem, hvilket ikke var tilfældet for antagonist-kontrollen. Det er dog en lille tendens, hvilket især kan ses på den røde graf for prøve 2, hvor lavere koncentrationer af BPA giver en smule højere absorbans end ved højere koncentrationer af BPA.



Figur 18: Graf for YES antagonist med BPA, hvor absorbans er som funktion af koncentrationen af BPA ($\mu\text{g/L}$). Den blå, røde og grønne graf er absorbansværdierne for prøverne med BPA i række A-H;3-5. Den lilla graf er gennemsnittet af værdierne. Der er en lille tendens, hvor der ved lave koncentrationer af BPA er der højere absorbans end ved høje koncentrationer af BPA.

Diskussion

BPA er et eksempel på de mange kemikalier, der mistænkes for at kunne have sundhedsmæssige konsekvenser i mennesker som følge af hormonforstyrrende effekter. Litteraturen om BPA er omfattende, men realiteten af eksponeringskonsekvenserne er endnu uafklaret. Kombinationen af udførlig, videnskabelig dokumentation og store usikkerheder gør BPA til et oplagt udgangspunkt, til en bredere diskussion af reguleringen af kemikalier. BPA bliver ikke mindre relevant i forhold til, at BPA-eksponeringskilder er allestedsværende, og at human eksponering er uundgåelig og udbredt. Det er konklusionen, man kan drage ud fra adskillige faktorer, såsom omfanget af BPA-produktionen, alsidigheden af anvendelsesområderne, og de mange studier, der indikerer, at BPA er i kroppen hos stort set alle mennesker. Den omfattende eksponering og påvisning af, at eksponeringen fører til BPA-niveauer i mennesker, rejser det kritiske spørgsmål om, hvorvidt det har konsekvenser for den humane sundhed.

Mens det er alment accepteret i både forskningsverdenen, industrien og myndighederne, at BPA kan yde en hormonforstyrrende effekt, indtræffer kontroverserne ved vurderingen af, hvilken betydning effekten har i mennesker. For mens der i nogle forskningskredse, såsom organisationen the American Endocrine Society, er bred enighed om, at BPA udgør en sundhedsrisiko for mennesker, går WHO og den danske fødevarestyrelse mere forsigtigt til værks. Efter deres vurdering er det

endnu udokumenteret at BPA udgør en sundhedsrisiko for mennesker ved det nuværende eksponeringsniveau. Årsagen til at der eksisterer kontroverser om realiteten af eksponeringskonsekvenserne for mennesker, er tæt forbundet med, hvor pålidelige undersøgelserne på området anses for at være, og om deres resultater kan anvendes til at underbygge belæg for hypotesen om, at mennesker tager skade af BPA-eksponering.

Inden diskussionen sundhedskonsekvenser påbegyndes, er det dog nødvendigt at danne grundlæggende belæg for, at kemikalier med mistænkt hormonforstyrrende effekt har fundamentale hormonforstyrrende virkningsmekanismer. Belægget kan dannes ud fra metoder, der undersøger om kemikaliet besidder disse virkningsmekanismer, og en sådan metode er YES-assayet. Det kan danne evidensgrundlag for at videreundersøge en mulig østrogenlignende effekt.

Til diskussionen om anvendeligheden af YES-assayet som metode og model for en østrogenlignende effekt af BPA, hører en bredere drøftelse af svagheder og styrker af undersøgelsesmetoder, der har til formål at afklare, hvilken og hvor stor en risiko kemikaliet udgør. Disse undersøgelsesmetoder anvender ofte dyr som modeller for en hormonforstyrrende effekt i mennesker. Diskussionen af pålideligheden af undersøgelsesmetoder er nødvendig af en praktisk årsag; for at fastslå om de kan anvendes som lovgivningsmæssigt evidens, der kan være udgangspunktet for reguleringen af BPA og lignende kemikalier. For at sikre minimale sundhedskonsekvenser af BPA-eksponering er det af afgørende betydning at fastsætte korrekte grænseværdier. Når grænseværdier skal fastsættes for BPA som et hormonforstyrrende stof, opstår en række udfordringer. Først og fremmest indtræder den vigtige diskussion om toksicitet set i forhold til hormonforstyrrende effekt. Dernæst kommer toksikologiens dosis-responsammenhænge i centrum, da de spiller en central rolle for vurderingen af, hvor stor en risiko et kemikalie udgør.

Det leder frem til, hvorvidt der eksisterer lavdosismekanismer af BPA; altså om BPA kan udgøre en sundhedsrisiko ved koncentrationer der ligger under grænseværdierne, på trods af at ingen biologiske effekter burde kunne observeres ved eksponering for doser under disse værdier. Slutteligt er det interessant at undersøge, hvilke alternativer der er til brugen af BPA. For hvis lavdosismekanismer påvises, skabes et akut behov for at nedbringe eksponeringsgraden. Diskussionens fokuspunkter kredser om et fælles mål; at sikre minimale konsekvenser af human eksponering for BPA.

Forsøgsresultater fra YES

YES-assay er anvendt til at illustrere en østrogenlignende effekt af BPA, og i forlængelse af anvendelsen af YES, er det afgørende at diskutere YES som metode og model.

I undersøgelsen af BPA som agonist giver kontrolrækkerne med E2 nogle flotte data, som ser ud, som forventet. Resultaterne for BPA er dog mere usikre. Fredag 20/05 var alle prøverne med BPA gule til trods for, at der var sket en ændring i kontrolrækkerne. Reaktionen i kontrolrækkerne er en indikator for, at udførelsen af projektet ellers er gået planmæssigt. På den måde kan nogle fejlkilder udelukkes såsom, at vækst- og assay-mediet er lavet forkert, eller at gærcellerne er døde. Den lineære graf for absorbansen viser ikke den klassiske dosisresponskurve. Det skyldes først og fremmest, at der ikke er sket nogen videre reaktion på dette tidspunkt. Der ses heller ikke forskel i farvenuancerne i de røde farver i BPA-prøverne mandag d. 23/05, som var tilfældet for kontrolrækkerne med E2 om fredag 20/05. Der ses derfor heller ikke en dosisresponsammenhæng her. Af den grund er det ikke muligt at sammenligne koncentrationerne for effekten af BPA og E2, hvilket kunne have været interessant at se, hvilket forhold der var mellem virkningseffekten af BPA og E2. Resultaterne kan skyldes flere ting. På den ene side, at BPA-koncentrationen har været for høj i alle brøndene, og dermed har der ikke været forskel i aktiviteten. Omvendt ser det ud til, at der er sket en markant fortynding af BPA, hvor intervallet i koncentrationen 5500 µg/L til 23,97 µg/L (se bilag 5, ”koncentrationer af BPA”). Ifølge (Bistan, Podgorelec, & M.fl., 2011, s. 430) bør dække det koncentrationsspektrum, som BPA viser effekt inden for. Men det kan være, at koncentrationen har været for høj til den mængde, som har været i brøndene. På den anden side kan det være, at prøverne har stået for længe, og derfor har disse reageret ens. Det er sket for de andre assay-plader, som alle er blevet lilla. Det kunne være optimalt at se til prøverne lørdag for at se, hvorvidt der var en mere nuanceret farvebalance. Endvidere er der problematikker i forbindelse med hormonforstyrrende stoffer såsom BPA og klassiske dosisresponsammenhænge, hvilket diskuteres senere.

I tilfælde af, at der havde været længere tid, kunne vi have kørt flere forsøgsrunder, så vi kunne tilpasse forsøget. I vores forsøg blev gærcellerne fortyndet tirsdag 17/05, da mandag var helligdag. Onsdag 18/5 blev gærcellerne eksponeret for BPA. Fredag blev absorbansværdierne aflæst. Til en anden gang ville det have været optimalt at fortynde mandag, eksponere tirsdag og aflæse torsdag og fredag i tilfælde af, at reaktionen i brøndene ville kræve mere end 48 timer.

For YES antagonist giver kontrollen, ligesom for agonist, pæne og forventede resultater. Det ser dog anderledes ud for BPA prøverne, da alle prøverne er røde, og dermed differentieres deres ikke i farverne efter koncentrationerne, hvilket kan skyldes flere ting. Det kan på den ene side kan det tyde på, at BPA har haft østrogenlignende effekt, men at koncentrationerne har været for høje til, at der kan have været et varieret farveskifte. Det kan være, at hvis der var tjekket til dem i løbet af natten mellem torsdag og fredag, at der kunne ses en forskel. På den anden side kan det også skyldes andre effekter. Det kan være, at der er en falsk positiv, da inhibitoreffekter også kan skyldes ikke-specifikke effekter, hvilket leder til en reduktion af responset, som er induceret af en fast koncentration af E2 og DHT. Parallel inhibition i YES og YAS, kan være en indikator for en sådan ikke-specifik inhibition, hvilket ikke er en sand østrogen eller androgen antagonistisk effekt (XENOMETRIX s. 20). Det kan være tilfældet i dette forsøg, da både BPA-prøverne i YES og YAS antagonist alle er røde i samme farvestyrke i alle rækkerne. Af den grund kan det være, at det røde resultat ikke afspejler østrogenlignende aktivitet, men i stedet en anden ikke-specifik effekt. I tilfældet af, at der havde været tid til at lave en ny forsøgsrunde, kunne det have været spændende at forsøge med andre koncentrationer og evt. kigge til prøverne efter halvandet døgn efter eksponering for at se, om det ville gøre en forskel.

YES-assay som metode

I dette projekt omtales YES i stor grad, og det benyttes som model for påvisning af østrogenlignende effekt, hvor projektet tester BPA's effekt. Men hvor brugbar er YES egentlig som metode til undersøgelse og påvisning af østrogenlignende effekt hos stoffer som eksempelvis BPA?

Der er som nævnt tidligere mange fordele ved at benytte in vitro metoden YES til påvisning af østrogenlignende effekt hos forskellige kemikalier, hvor forsøget udføres på gær. Det er både en økonomisk fordelagtig og mindre omfattende end ved brug af dyreceller. Desuden undgås brugen af forsøgsdyr. Endvidere er YES fordelagtig, da man i større grad end i in vivo forsøg selv kan styre kombinationseffekten, da man selv vælger, hvilke kemikalier som tilsættes. På den måde overses andre stoffer med østrogenlignende effekt ikke, og dermed undgås uønsket kombinationseffekt. Selvfølgelig kan der ved en fejl kommer andre stoffer i prøverne, som kan forstyrre prøven og give kombinationseffekt. Det kan dog langt hen ad vejen undgås ved at arbejde under sterile forhold og dække en prøve til, så de ikke kontamineres med stoffer udefra, som kan give uønsket kombinationseffekt (Kinnberg, 2003, s. 13). I tilfælde af undersøgelse af stoffer fra miljø eller materialer, eksempelvis fødevarer, vil det være dyrt at undersøge alle stoffer med potentiel

østrogenlignende aktivitet, og derfor kan YES være en god kombination med kemiske analyser af prøver fra miljøet, da man ved hjælp af YES får et mål for den østrogene aktivitet i en prøve, samt i nogen grad at identificere de stoffer, som giver årsag til den østrogenlignende aktivitet (Kinnberg, 2003, s. 13). Det kan være en essentiel standardmetode og et vigtigt redskab til at påbegynde studier af kemikalier med mistænkt østrogenlignende effekter. YES og lignende metoder kan formentligt fremme processen med at identificere kemikalier mistænkt for at have hormonforstyrrende effekter, og i (Fang, Tong, & M.fl., 2000) vurderes det, at en god korrelation mellem to assays med gærceller tyder på reproducerbarhed af resultater fra gærcele-assays.

Selvom der er mange fordele ved in vitro undersøgelser som YES, opstår der dog også problematikker i forbindelse med brugen af dem til forudsigelsen af østrogenlignende effekt. YES er som nævnt godt til bestemmelse af hormonaktivitet ved enkelte stoffer, men det virker ikke til at måle kombinationseffekt, men det kan bruges som indledende screening til undersøgelse af forskellige stoffer. Endvidere er YES ikke altid pålidelig i dets forudsigelse af udfaldet i in vivo assays, og det er derfor ikke sikkert, at samme resultater vil være gældende in vivo. Det er nemlig svært at vurdere, hvordan resultater, som er opnået ved YES, kan overføres til forudsigelse af effekter på en hel organisme. Dette kan blandt andet forklares ved, at in vitro ofte har minimale metaboliske effekter, hvilket større organismer besidder, og det kan have en indflydelse på virkningen af stoffernes effekt. Overførsel af resultater fra in vitro til in vivo kan derfor give forkerte resultater for stoffet i mere komplekse organismer, da in vitro ikke afspejler interaktion mellem biologiske systemer, biotilgængelighed (bioakkumulation), binding af proteiner, transport og fordeling og udskillelse af stoffer, som har en vigtig rolle at spille i in vivo. Endvidere er det ikke alle østrogene effekter, som er relateret til receptorbindinger. Effekterne kan også forekomme ved vekselvirkninger mellem hormonsyntese og hormonmetabolisme i organismer, hvilket der ikke tages hensyn til i receptorgenassays, som YES er (Kinnberg, 2003, s. 13). En anden ulempe ved YES er, at gærceller, modsat animalske celler, er omgivet af en cellevæg og aktive transportmekanismer, der kan have en påvirkning på aktiviteten hos nogle testkomponenter (Kinnberg, 2003, s. 18).

Da gærceller er væsentlig anderledes end dyreceller, kunne man fristes til at tænke, at dyreceller i reporter-gen-assay ville være en fordel. Dette kan det også være i nogle henseender, da disse celler blandt andet minder mere om menneskeceller og dermed kunne tænkes at give mere forudsigelige resultater ved overførsel til in vivo. Omvendt er dyreceller vanskeligere at arbejde med, dyrere at

dyrke og tilmed mere sårbar over for cytotoxiske effekter. Desuden er YES mere simpel, da aflæsningen af resultatet ikke kræver cellelysis, idet produktet frigives til mediet og aflæses ved måling af absorbans. YES kan derimod være usikker til registrering af anti-østrogeneffekt, hvor det registrerer dette som agonistisk. Desuden kan gærcellerne være mindre følsomme overfor kemikalier med østrogenlignende effekt end dyreceller kan være (Kinnberg, 2003, s. 12). Dette kan både ses som en fordel og ulempe alt efter, hvad man undersøger for, og hvad man skal bruge resultaterne til. I tilfældet af interesse for at registrere stoffer, som kan vekselvirke med østrogenreceptorer og udvise respons med hormonelle forstyrrende egenskaber. I dette tilfælde kan pattedyr-baserede reportegenassays i nogle tilfælde underestimere stoffets østrogene potentiale (Kinnberg, 2003, s. 12).

Som opsamling på denne diskussion af YES som metode kan man sagtens se YES som en metode for at identificere østrogenlignende effekt hos forskellige kemikalier, hvor YES kan anvendes som det første trin til at identificere hormonforstyrrende stoffer i prøver. Dog skal man være opmærksom på, at de givne resultater ikke uden videre kan overføres til dyr og mennesker, da det ikke er pålideligt i forhold til dets udfald i in vivo. De bør af den grund derfor ikke stå alene ved vurdering af potentielt skadelige østrogene effekter (Kinnberg, 2003, s. 13). Så det endelige valg af gærceller eller dyreceller afhænger af, hvor vigtigt detektionsgrænsen er i forhold til simpel udførelse og lave omkostninger. I tilfældet af vores forsøg hvor YES bruges som model for påvisning af BPA's østrogenlignende effekt, der er YES tilstrækkeligt, da vi ønsker at se dens effekt på østrogenreceptorer, men i tilfældet af et andet fokus kunne det være, at YES ikke var så oplagt. Som sidste detalje er det vigtigt at pointere, at til trods for påvisning af hormonforstyrrende effekter, så påviser ingen af disse metoder konsekvenser af den hormonforstyrrende effekt. Til disse påvisninger skal der langt mere omfattende undersøgelser af både dyr og mennesker til, hvilket er behandlet tidligere.

Modelanvendelse og god videnskab inden for hormonforstyrrende stoffer

Mens YES kan give den første indikation på hormonforstyrrende effekter af et kemikalie, og derefter kan in vivo studier undersøge sundhedsmæssige konsekvenser.

At udføre studier, der bevidst eksponerer mennesker for BPA for at undersøge, hvilken betydning kemikalien har for fertilitet, karcinogenese, m.fl., er af åbenlyse grunde særdeles uhensigtsmæssigt

og etisk ukorrekt. I fraværet af muligheden for at undersøge, hvilken effekt BPA har i det humane legeme, bliver dyreforsøg essentielle.

Dyr er i mange henseender yderst egnede som modeller for en hormonlignende effekt i menneske. Til undersøgelse af hormonforstyrrende stoffer er især gnavere velegnede forsøgsobjekter. Som tidligere beskrevet findes de humane østrogenreceptorer ER i mus og rotter. Denne endokrine fællesnævner for arterne, gør det oplagt at undersøge østrogen effekt af kemikalier som BPA. Dyrene anvendes på den måde som modeller for det endokrine system i mennesker.

Når forsøgsresultater med dyr som modeller omsættes til et udtryk for effekterne i mennesker, skaber fysiologiske forskelle åbenlyst udfordringer. Herunder nævnes eksempler på betydningsfulde forskelle mellem mennesker og mus og rotter.

- Maskuliniseringen af hypothalamus: I mennesker faciliteres denne proces tilsyneladende af androgener, mens østrogener spiller den afgørende rolle for maskuliniseringen i gnavere.
- Generelle forskelle i hormonniveauerne i hhv. mennesker og gnavere.
- Metaboliske forskelle: Der hersker uenigheder om den metaboliske nedbrydning af BPA i mennesker, men der er uagtet forskel på metabolismen af BPA i mennesker og gnavere.

Forsøg med modeller in vivo er mere letpåvirkelige end eksempelvis gærceller in vitro. Derfor er det vigtigt at undersøge, hvilke faktorer der kan have indvirkning på forsøgsresultaterne og fortolkningen af dem. Herunder er tre signifikante eksempler:

- Fraværet af en positiv kontrol: Det er nødvendigt at inkludere en positiv kontrol, hvor man anvender et kemikalie, som har kendte østrogene effekter, som eksempelvis estradiol. I fraværet af en positiv kontrol er det ikke muligt at afgøre om årsagen til eventuelle negative resultater er inaktivitet af kemikaliets, lav sensitivitet af dyremodellen, fodertypen, etc.
- Sensitiviteten af forskellige typer forsøgsdyr: Sensitiviteten af den anvendte dyremodel bør undersøges ved at bruge en positiv kontrol. Man har eksempelvis observeret en 100-400 gange lavere sensitivitet over for estradiol i CD-SD-rotten (afart af rotter) set i forhold til sensitiviteten i kvinder. Omvendt har man observeret hanmusfostre, der var mellem 25.000 og 100.000 gange mere sensitive over for estradiol end CD-SD-rotterne.
- Østrogen aktivitet af fodertypen: (Thigpen & M.fl., 2003) berettede om varierende østrogenaktivitet af en fodertype, der er ofte anvendes i toksikologiske undersøgelser. Især for forsøg, der undersøger østrogenaktivitet ved lave doser er det vigtigt at have en standard

fodertype, da ukendt østrogenaktivitet af foderet kan bidrage til unøjagtige resultater (Saal & Hughes, 2005).

De ovennævnte faktorer, der har indvirkning på in vivo studier, er også afgørende for, om et forsøg anses for at være god videnskab. Desuden er det særligt vigtigt at have fokus på disse faktorer, når lavdosis effekter undersøges.

På trods af signifikante forskelle på gnavere og mennesker og at en række faktorer kan påvirke forsøgsresultaterne, kan der argumenteres for, at det bl.a. er almindelig praksis at anvende dyremodeller til undersøgelse af lægemidler o.l. Fra et evolutionært perspektiv er der en relativ stor fysiologisk lighed mellem pattedyrsarter. Farmakologiske forhold lader til at være relativt ens i mennesker, primater som aber og gnavere, derfor er forsøg med andre primater også en mulighed. Gnavere er dog lettere at arbejde med. De er mindre, og billigere at avle og indkøbe, og det er derfor muligt at lave studier med et større antal dyr. De har desuden en kortere livslængde, hvilket gør det derfor muligt at undersøge effekterne af eksponering for hormonforstyrrende stoffer fra fosterstadiet til død (Myers & M.fl., 2011, s. 425). Amerikanske, regulative myndigheder har konkluderet, at gnavere er velegnede som modeller for effekterne af kemikalier med mistænkt hormonforstyrrende effekter i mennesker. Man må derfor kunne antage, at resultater fra dyreforsøg indikerer, hvilken effekt hormonforstyrrende stoffer kan have i mennesker (Myers & M.fl., 2011).

Toksicitet og hormonforstyrrende effekt

Eksponering for et kemikalie som BPA ved høje doser, kan på den korte bane have mere akutte, toksiske konsekvenser. Lave doser af hormonforstyrrende stoffer er sjældent toksisk i den forstand, at det kan føre til spontane aborter eller død, men hormonforstyrrende effekt kan komme til udtryk som permanente effekter lang tid efter eksponeringen.

Derfor er tidshorisonten, man vurderer kemikaliets over, en essentiel faktor, når toksicitet sammenholdes med hormonforstyrrende effekt. Særligt hvis eksponeringen finder sted i kønsudviklingsmæssige perioder såsom i fostre, nyfødte og pubertære børn (Myers & M.fl., 2011, s. 423). Hos et barn, der har været eksponeret for kemikalier med hormonforstyrrende effekt kontinuerligt igennem en årrække, vil man ikke umiddelbart finde nogle bemærkelsesværdige konsekvenser af eksponeringen, men i voksenlivet kan det manifestere sig ved nedsat fertilitet eller neurologiske forringelser.

Den østrogenlignende effekt af BPA har været kendt fra starten. Men dets anvendelse i plastikindustrien, gav historisk set anledning til at vurdere sikkerheden ved brug af BPA ud fra dets toksiske egenskaber frem for dets hormonforstyrrende effekter. Det hænger sammen med, at regulative myndigheder har udfordringer med at nå til enighed omkring, hvordan undersøgelser af kemikalier med hormonforstyrrende effekter skal standardiseres, og hvilke parametre der skal tages højde for (Vogel, 2009). Eksposering i udviklingsfasen kan desuden føre til effekter år efter eksponeringen, og disse effekter tages der ikke højde for, når et kemikalie som BPA vurderes alene ud fra dets toksiske egenskaber, når BPA undersøges over en kortere tidshorisont.

Toksikologiske undersøgelser tager udgangspunkt i dosisresponsammenhænge, og undersøgelser af disse for BPA bidrager derfor til at afklare om toksikologien er sufficient til at afdække sundhedsrisikoen ved eksponering for BPA. Hvis ikke-monotone dosisresponsammenhænge sandsynliggøres for BPA og anerkendes som kendetegn for BPA's virkningsmekanismer, gør det op med alle tidligere sikkerhedsvurderinger af BPA, da dets effekter ved lave doser, i så fald ikke kan estimeres ud fra effekterne ved høje koncentrationer.

Dosis-responsammenhænge som toksikologisk vurderingsmetode ift. BPA

Diskussionen om hvorvidt hormonforstyrrende effekt som følge af BPA-eksponering kan have sundhedskonsekvenser for mennesker pågår stadig. Men hvis man bevæger sig ud over denne diskussion og i stedet vedtager, at en biologisk effekt af BPA-eksponeringer er konstateret i studier, både in vivo, in vitro og epidemiologiske studier, bliver det presserende at fastlægge grænseværdier for den humane eksponering, der minimere risikoen for signifikante, sundhedsmæssige konsekvenser. I EU er grænseværdien LOEC på 0,050 mg/kg kropsvægt pr. dag for BPA. Men grænseværdien er fastsat ud fra toksikologiske vurderingsmetoder, metoder der er problematiske med henblik på, at toksicitet og hormonforstyrrende effekt ikke er synonyme til hinanden. Dette kan være en årsag til sænkelsen af grænseværdien, TDI, i februar 2015.

Når det handler om at vurdere de mulige konsekvenser af hormonforstyrrende stoffer, har grundtanken for toksikologien været, at jo højere dosis, jo større biologiske konsekvenser. Men når det kommer til hormonforstyrrende stoffer, giver det anledning til stridighedspunkter, da forskning tyder på, at sammenhængen mellem dosis og respons for disse kemikalier ikke er monoton. Ikke-monotone sammenhænge fraviger fra den klassiske, toksikologiske grundtanke, og sikkerhedsvurderingen af kemikalier med hormonforstyrrende effekter har derfor længe udfordret

toksikologien. Udfordringerne bunder i, at hormonforstyrrende stoffer ofte kan have effekter ved lave doser, der ikke kan forudsiges ud fra højdosis effekter. Det betyder, at de afviger fra det klassiske toksikologiske doktrin, der dikterer, at jo højere dosis, desto større resulterende biologiske følgevirkninger. Hypotesen om, at lavdosis effekter kan forudsiges ud fra højdosis effekter, sandsynliggøres af antagelsen af, at dosisresponskurverne for et givent kemikalie vil være monotone. Denne antagelse er højst sandsynlig fejlagtig for kemikalier med hormonforstyrrende effekter. Blandt andet verdenssundhedsorganisationen (WHO) vurderede i 2013, at det skal forventes, at karakteristika for kemikalier med hormonforstyrrende effekter, såsom BPA, er evnen til at producere ikke-monotone dosisresponskurver.

Ikke-monotone dosisresponskurver kan defineres matematisk som en ændring i fortegnet på kurvens hældning. Altså at fortegnet på hældningen ændrer sig fra plus til minus eller omvendt inden for intervallet af de undersøgte doser (Vandenberg, 2014). Mekanismerne der ligger til grund for forekomsten af ikke-monotone dosis-responskurver er mange. Blandt dem er:

- Cytotoksicitet: Når et kemikalie resulterer i en hormonel effekt, men samtidig er toksisk.
- Effekten af koncentrationen på antallet af receptorer: Når en stigende koncentration resulterer i, at flere receptorer nedbrydes end produceres, og at effekten dermed falder efterhånden som dosen stiger.
- Reduktion i receptorsensitivitet ved højere doser: Receptorinaktivering som følge af øgede koncentrationer.
- Varierende effekt af samme hormon i forskellige celletyper: Hvilke receptortyper der bliver udtrykt kan være forskellig alt efter celletypen.

(Vandenberg, 2014) (Myers & M.fl., 2011, s. 408)

På trods af, at ikke-monotone dosisresponskurver er forventelige for stoffer med hormonelle virkningsmekanismer, er den generelle antagelse ved regulering af kemikalier, at der er en monoton sammenhæng mellem størrelsen af dosen og de biologiske effekter. Ud fra denne antagelse fastsættes LD₅₀, LOEC og NOAEL. Sikkerhedsfaktorer tillægges NOAEL, og denne dosis antages for at være sikker for dyr og mennesker, altså burde ingen biologiske effekter kunne observeres under NOAEL. Antagelsen af en monoton sammenhæng mellem dosis og respons danner teoretisk grundlag for sikkerhedsvurderingen, og derfor kan sikkerhedsundersøgelserne af kemikalier som BPA være fejlbehæftede, i tilfælde af, at ikke-monotone dosisrespons sammenhænge påvises. Det kan betyde, at grænseværdierne, på trods af deres formål, ikke er garanti for, hvornår en dosis er

sikker. Både i celler, dyr og epidemiologiske undersøgelser har man observeret ikke-monotone dosisresponsammenhænge:

- Cellestudier: Flere hundrede ikke-monotone dosis-responskurver er observeret i forsøg med cellekulturer for mange forskellige kemikalier. Ikke-monotone dosisresponskurver er også almindelige for endogene hormoner. Dette indikerer, at ikke-monotone dosisresponskurver kan være en grundlæggende funktion af hormoner og hormonaktivitet.
- Dyrestudier: Ikke-monotone dosisresponskurver er observeret i dyr, både ved undersøgelse af endogene hormoner og kemikalier med hormonforstyrrende effekt, både ved anvendelse af forskellige dyremodeller, undersøgelse af forskellige kemikalier og ved varierende endepunkter (såsom ændring i organvægt, adfærdsmæssige effekter og ekspressionen af gener).
- Epidemiologiske studier: Epidemiologien har observeret ikke-monotone dosis-responskurver af endogene hormoner i populationer af mennesker. Dette er plausibelt ud fra formodningen om, at ikke-monotone dosisresponskurver er fundamentale for hormonaktivitet i både celler og dyr.

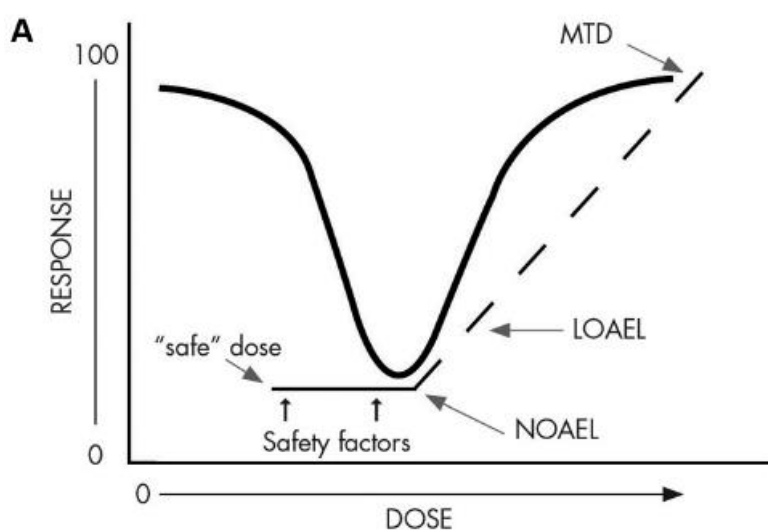
På tværs af forskelligartede undersøgelsesemner (celler, dyr, humane studier) der varierer i biologisk kompleksitet, er der indikationer på, at ikke-monotone dosisresponskurver eksisterer via beslægtede mekanismer.

Hvorvidt en ikke-monoton dosisresponsammenhæng eksisterer for BPA, diskuteres blandt forskere. Men en gennemgang fra 2014 af studier der undersøgte BPA-dosisresponskurver in vitro, fandt Laura Vandenberg (Vandenberg, 2014), at der i 23,1 % af studierne blev fundet en ikke-monoton dosis-responsammenhæng. Derfor konkluderes det, at ikke-monotone dosis-responskurver er udbredte i denne type studier. Det konkluderes desuden, at undersøgelser der berettede om monotone dosisresponskurver gennemsnitligt inkluderede færre doser end undersøgelserne der fandt ikke-monotone dosisresponskurver. Derfor kan nogle observerede monotone dosisresponsammenhænge være fejlbehæftede (Vandenberg, 2014).

(Vandenberg, 2014) og (Myers & M.fl., 2011) konkluderer efter gennemgang af litteraturen på området for ikke-monotone dosisresponskurver, at det ikke er muligt at forudsige effekter ved lave doser ud fra effekter, der er observeret ved høje doser.

Studier der har observeret biologiske effekter ved lave doser men ikke høje, hvilket indikerer, at en ikke-monoton dosisresponsammenhæng eksisterer. Et sådan studie er (Angle, Do, & M.fl., 2013), hvor svangre mus blev eksponeret for BPA ved doser fra 10 gange under den amerikanske NOAEL, der er tillagt sikkerhedsfaktorer, så værdien er 0,05 mg/kg/dag, og til 10 gange over NOAEL på 50 mg/kg/dag. Forskerne observerede bemærkelsesværdige effekter ved doser under 0,05 mg/kg/dag, men den højeste undersøgte dosis resulterede ikke i nævneværdige effekter. Denne undersøgelse danner dermed også belæg for eksistensen af lavdosis effekter, der diskuteres senere.

Reguleringspraksissen hvor monotone dosisresponsammenhænge anses for at være en selvfølge, og grænseværdier for dosisstørrelser fastsættes med afsæt i en sådan sammenhæng som naturgiven sandhed, virker i stigende grad fejlbehæftet, når undersøgelsesemnet er BPA og lignende kemikalier. Figur 19 nedenfor illustrerer, hvordan antagelsen af en monoton sammenhæng kan give anledning til at ukorrekte grænseværdier fastsættes, og hvordan biologiske effekter ved lave doser kan overses, da doser under grænseværdierne anses for at være sikre, uden at de efterprøves eksperimentelt. Når undersøgelser af dosis-responsammenhænge for BPA sammenholdes, kan en tendens til ikke-monotone dosisresponskurver observeres. Derfor bør studier af BPA, der beretter om ikke-monotone dosisresponskurver være indikative, og give præsidens for at revidere tilgangen til sikkerhedsundersøgelser af kemikalier med mistænkt hormonforstyrrende effekt. Diskussionen om monoton eller ikke-monoton sammenhæng for BPA bidrager derved til at underbygge evidensgrundlaget for at argumentere for en revidering af grænseværdierne. Diskussionen bidrager til at optimere og revidere reguleringspraksissen for kemikalier med hormonforstyrrende effekter, og det kan have en positiv indvirkning på den humane sundhed.



Figur 19: Figuren illustrerer en ikke-monoton dosisresponskurve, der kan identificeres ved at kurvens hældning ændrer fortegn. NOAEL og LOAEL er fastsat ud fra antagelsen af en monoton sammenhæng, og en sikker dosis er estimeret ud fra disse værdier. Den sikre dosis efterprøves ofte ikke, hvilket er problematisk, hvis ikke-monoton sammenhæng er gældende. Lave doser af et kemikalie som BPA kan derfor have signifikante biologiske effekter, der ikke undersøges, da antagelsen af en monoton sammenhæng betyder, at effekterne ved lave doser estimeres ud fra effekterne ved høje (Myers & M.fl., 2011, s. 407).

Studier, der specifikt undersøger biologiske effekter af BPA-doser under værdier, der anses for at være sikre, kan ligeledes bidrage til at sikre korrekte grænseværdier. Disse effekter benævnes lavdosis effekter og kan i nogen grad efterprøve grænseværdierne, da ingen biologisk ændring burde kunne observeres ved eksponeringsniveauer under denne grænse. Med BPA-litteraturen som udgangspunkt berøres lavdosis effekter og deres betydning i følgende afsnit.

Lavdosismekanismer

Lavdosis effekter er ikke direkte forbundet til ikke-monotone dosisresponskurver, men støder sammen med toksikologiens reguleringspraksis. Det skyldes, at biologiske ændringer er observeret i lavdosis studier. Grænseværdier, der fastsættes ud fra antagelsen af at dosisresponskurver, altid er monotone og bidrager til den fejlagtige antagelse, at lave doser af hormonelt aktive stoffer ikke resulterer i nævneværdige biologiske effekter (Myers & M.fl., 2011, s. 405).

Afvigelser fra monotone sammenhænge indikerer at grænseværdierne er ukorrekte, og det er derfor interessant, at et stigende antal studier observerer lavdosis effekter. Sandsynliggørelse af lavdosis effekter fjerner spot til skade og underbygger belægget for at kunne konkludere, at de nuværende grænseværdier er insufficiante. Påvisning af lavdosis effekter kan betyde, at BPA ved lave doser kan have effekter, der er ligeligt signifikante eller tilmed større, end effekterne ved høje doser. Lavdosis effekter bør være grund til særlig stor bekymring, da de, i modsætning til de akutte toksiske følgevirkninger af BPA ved høje doser, gør sig gældende ved værdier, der er relevante set i forhold til størrelsen af den humane eksponering og EU-regulativerne.

Før det er muligt at diskutere eksistensen af lavdosis effekter, er det nødvendigt at definere begrebet ”lavdosis” for BPA. Lavdosis kan defineres på flere måder. Lavdosisdefinitionerne, som anvendes i

videnskabelige artikler om lavdosiseffekt af BPA, er udformet af the National Toxicology Program, der er en afdeling under de amerikanske sundhedsmyndigheder. De definerer ”lavadosis” som:

1. En dosis af en størrelsesorden, der ligger inden for det typiske humane eksponeringsniveau, som fører til biologiske ændringer.
2. Doser der er lavere end de doser der testes i standart toksikologiske risikovurderinger.

En tredje tilgang definerer lavdosis som en dosis, der resulterer i koncentrationer i blodet hos forsøgsdyret, som korrelerer til koncentrationer målt i blodet hos mennesker (Myers & M.fl., 2011). Hver definition giver anledning til, at lavdosisværdien afgrænses forskelligt. Efter den første definition vil alle resultater fra epidemiologiske undersøgelser af det humane eksponeringsniveau møde kriteriet. Den anden definition placerer afgrænsningen for lavdosis BPA på 50 mg/kg/dag. Denne grænse er desuden den amerikanske NOAEL, hvorunder ingen bemærkelsesværdige effekter burde kunne observeres (Ehrlich & M.fl., 2013). Rapporterne, som diskussionen tager udgangspunkt i, er udført af forskere i USA, og derfor er der taget udgangspunkt i amerikanske grænseværdier. Farmakologiske undersøgelser har estimeret, at en eksponering på 400 µg/kg/dag resulterer i frie koncentrationer i blodet inden for koncentrationerne, der er observeret i blodet i mennesker, og at doser på 400 µg/kg/dag derfor kan defineres som lavdosis. (Myers & M.fl., 2011, s. 395) For forsøg med cellekulturer fastsatte (Ehrlich & M.fl., 2013) lavdosisgrænsen på $1 \cdot 10^{-7}$ M BPA.

Hvis man betragter hypotesen om store effekter ved lave doser af hormonforstyrrende stoffer med henblik på, hvordan det endokrine system fungerer, virker hypotesen om lavdosiseffekter plausibel. For at det er muligt, at et stort antal hormonmolekyler kan eksistere i cirkulation i det endokrine system, er det finindstillet til at reagere på lave hormonkoncentrationer. For estradiol kan en fri (altså ikke-plasmabundet) koncentration i cellerne på 0,1 til 9 pg/mL resultere i en østrogen effekt. Dette illustrerer, at en meget lav koncentration kan være hormonelt udslagsgivende.

En anden faktor, der har betydning for størrelsen af den hormonelle effekt, er, hvor stor en andel af receptorerne der er bundet, set i forhold til koncentrationen. I nogle tilfælde kan en ti-dobling af en hormonkoncentration ved en høj dosis resultere i at 1,1 gange flere receptorer bindes, mens en tidoblet koncentration ved lav dosis kan føre til en ni-dobling af bundne receptorer. Altså kan en forøgelse af en relativt lav dosis betyde en markant stigning i bundne receptorer, mens en forøgelse ved en højere dosis ikke nødvendigvis ville resultere i en lignende stigning i bundne receptorer

(Welshons, et al., 2003) (Myers & M.fl., 2011). Det er foreslået, at hormonforstyrrende stoffer kan have effekter ved lave doser på lige fod med endogene hormoner. Som det formuleres i (Myers & M.fl., 2011), kan hormonforstyrrende stoffer "udnytte" det endokrine systems høje sensitivitet og resultere i effekter ved lave doser. For at sikre validiteten af studier, der ikke finder effekter ved lave doser, skal tre kriterier opfyldes (Myers & M.fl., 2011):

- Negative kontroller: Negative kontroller er vigtige for alle forsøg, men særligt når hormonforstyrrende stoffer undersøges. Negative kontrolforsøg sikrer, at de anvendte dyr, celler, m.v. ikke er blevet kontamineret. I studier af hormonforstyrrende stoffer, kan kilder til kontamination være udsivning af kemikalier fra bure eller materialer samt østrogen aktivitet af foder. Desuden bør anvendte opløsningsmidler undersøges i en negativ kontrol, for at forhindre et falsk-positivt resultat.
- Positive kontroller: Positive kontroller er særligt nødvendige i tilfælde af, at ingen effekter observeres ved lave doser af et kemikalie. Positive kontroller, der fungerer via de samme mekanismer, som kemikaliets undersøges for, bekræfter, at systemet er i stand til at påvise lavdosis-effekter. Når en positiv kontrol anvendes, er det desuden nødvendigt at tage hensyn til styrken af kontrollen i relation til det testede kemikalie og revidere dosen, således at de to korrelerer. Uden både en positiv og negativ kontrol, bør studier der ikke finder en lavdosis-effekt lades ude af betragtning.
- Anvendelsen af relevante modeller: Den anvendte model (både in vitro og in vivo) kan variere i østrogensensitivitet. Som tidligere beskrevet, varierer sensitiviteten over for hormoner mellem afarter af gnavere. En række studier, der ikke fandt lavdosis-effekter af BPA, anvendte CD-SD-rotter. Dette er problematisk, da denne type rotter besidder en lavere østrogensensitivitet.

Disse punkter er generelle retningslinjer for at sikre gode videnskabelige undersøgelser og er vigtige for at kunne argumentere for validiteten af forsøgsresultater. Eksempelvis manglede mange studier, der ingen lavdosis-effekter fandt, en positiv kontrol, og de er derfor problematiske at inddrage i en samlet evaluering af eksistensen af lavdosis-effekter (Ehrlich & M.fl., 2013). Herunder nævnes eksempler på studier der har observeret signifikante lavdosis-effekter in vitro, ved forsøg med pattedyr og ved epidemiologiske undersøgelser:

- In vitro: (Ehrlich & M.fl., 2013) beretter, at over 100 studier in vitro undersøgte doser på eller under 1×10^{-7} M. Disse studier undersøgte indvirkningen af lave doser BPA på bl.a.

hormonproduktionen i prostatacancer-, humane æggestokke- og brystkræftceller. Lavdosis effekter blev observeret i mange af disse cellestudier.

- Studier med pattedyr som modeller: Studier, der har undersøgt effekterne af eksponering for BPA ved lave doser i udviklingsmæssige faser, fandt signifikante konsekvenser for det kvindelige forplantningssystem. Karcinogene lavdosis effekter er observeret i brystkirtlen. Lavdosis BPA i udviklingsfaser kan betyde en øget risiko for kromosomalt unormale æg i voksenlivet.
- Epidemiologiske undersøgelser i menneskepopulationer: Forhøjet BPA-koncentration i urinen er sammenkædet med bl.a. fedme og type 2 diabetes. Sammenhængen mellem BPA og human fertilitet er desuden undersøgt. Undersøgelser af kvinder, der undergår reagensglasbefrugtning, konkluderer, at BPA-eksponeringen kan sammenkædes med en forringet kvalitet af embryoer.

Bevisbyrden, der sandsynliggør skadelige effekter på det humane helbred som følge af lave doser hormonforstyrrende stoffer, er betydelig. Lavdosisstudierne tyder på at hormonforstyrrende stoffer, heriblandt BPA, har vidtrækkende og diverse effekter for den menneskelige population. Pålidelige lavdosisundersøgelser viser, at BPA kan have betydelige effekter ved doser, der er 1-4 gange lavere end den amerikanske NOAEL på 50 mg/kg/dag (Ehrlich & M.fl., 2013, s. 12). Et stort dyrestudie fra DTU undersøgte de biologiske effekter i rotter ved eksponering for både lave doser, svarende til størrelsen af den humane eksponering, og høje doser af BPA. Forskerne observerede størst effekt ved lave doser BPA på en række sundhedsområder. De konkluderede, at den midlertidige TDI i EU på 4 µg/kg/dag er insuffICIENT og burde sænkes til 0,7 µg/kg/dag (Hass, Christiansen, & M.fl., 2016) (Mandrup, Boberg, & M.fl., 2015). Studiet fra DTU viser, at BPA sandsynligvis har effekter ved markant lavere doser end tidligere antaget, og at EU-reguleringen af BPA muligvis ikke sikrer minimale sundhedskonsekvenser.

Lavdosis effekter og ikke-monotone dosisresponskurver for BPA bidrager til bevisbyrden, der sandsynliggør, at de nuværende grænseværdier for BPA er utilstrækkelige. De nuværende eksponeringsniveauer kan derfor potentielt udgøre en sundhedsrisiko for mennesker. I kraft af denne mistanke, bliver det presserende at nedbringe niveauet af BPA-eksponering. Anvendelsen af epoxyplastik og polycarbonat bliver højst sandsynligt ikke mindre i de kommende år. Derfor er industriens mulighed for at substituere BPA et afgørende middel, der kan medvirke til at nedbringe den humane BPA-eksponeringsgrad. Muligheden for BPA-substituering drøftes i følgende afsnit.

Substituering af BPA med andre stoffer

Når BPA forstyrrer vores endokrine system og mistænkes for at have diverse sundhedsskadelige effekter på menneskets krop, så kunne man fristes til at tænke: ”Hvorfor substituerer vi det ikke bare med et andet stof, som ikke har hormonforstyrrende effekter?” Umiddelbart kunne det se ud til, at det bare handler om at finde et stof med tilsvarende egenskaber, men det er mere komplekst end som så, da flere faktorer spiller en rolle.

BPA har mange fordelagtige egenskaber, hvilket er beskrevet tidligere, hvor det blandt andet giver plastik en blødgørende, varmebestandig effekt, samtidig med at det bliver gennemsigtigt. Det kan derfor være svært at finde stoffer, som har de samme fordelagtige egenskaber, der tilmed ikke har hormonforstyrrende og sundhedsskadelige virkninger også, da ideen ved at substituere BPA med et andet stof forsvinder. Stoffer, som er undersøgt og brugt til substituering af BPA i nogle produkter, har i nogle undersøgelser vist effekter svarende de sundhedsskadelige virkninger, som BPA mistænkes at have. Et af disse stoffer er bisphenol S (BPS). I en undersøgelse fra David Geffen School of Medicine at UCLA siger professor Nancy Wayne om deres forsøgsresultater: *”Exposure to low levels of BPA had a significant impact on the embryos’ development of brain cells that control reproduction, and the genes that control reproduction later in life. We saw many of these same effects with BPS found in BPA-free products. BPS is not harmless”* (NewsRx, 2016). Det viser, at BPS langt fra er et godt alternativ til BPA, selvom dets egenskaber er egnede. I bilag 4 kan man se en figur, som sammenligner sundhedskonsekvenserne af BPA og BPS, hvor det kan ses, at de begge mistænkes for at påvirke reproduktionen i samme grad.

Det viser derfor, at selvom produkter såsom drikkedunke er BPA-fri, så betyder det ikke nødvendigvis ikke, at de er bedre, set i et sundhedsmæssigt perspektiv. Dette udtaler Wayne også i forbindelse med deres undersøgelse *”Our study shows that making plastic products with BPA alternatives does not necessarily leave them safer”* (NewsRx, 2016). Det er derfor svært at finde egnede stoffer til erstatning af BPA, da de både skal have de rette egenskaber samt ikke være sundhedsskadelige.

Endvidere er der også problematikker i forhold til producenterne. Da BPA som nævnt tidligere er et af de stoffer, som der produceres mest af på verdensbasis, vil det have omkostninger at substituere det med andre stoffer. Det vil kræve mange ressourcer og penge for at ændre produktionsforholdene, og derfor skal der højst sandsynligt noget drastisk til, før industrien vælger

at omlægge produktionen. Et dissideret forbud mod BPA kunne være en mulighed, men dette kræver yderligere forsøg, hvilket er ressourcekrævende, og det er tunge processer at lave forbud med så udbredt et stof, da det skal besluttet på verdensplan. EU er ikke tilstrækkeligt, da en stor del af BPA produceres uden for EU, blandt andet i USA. Nogle lande har dog valgt at forbyde BPA i produkter. I Danmark må det ikke findes i produkter til børn under 3 år. De franske myndigheder har gået hele vejen og har forbudt det helt (Ministeret for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, 2014, s. 2). Af den grund kan det tænkes, at der virkelig er en reel grund til at forbyde BPA helt. Omvendt er der stadig ingen garanti for, at alternativerne er mere sikre.

Dertil skal det også pointeres, at det endnu ikke er helt bekræftet, hvorvidt BPA er så sundhedsskadeligt, som det mistænkes for at være. Dette gør det svært at tage beslutninger vedr. forbud, fordi der endnu ikke er tilstrækkeligt evidens til at bekræfte, at BPA er sundhedsskadeligt for os mennesker. Omvendt kan man sige, at mange undersøgelser – både med dyr og mennesker – viser, at BPA har sundhedsskadende effekter, og at der derfor kunne handles ud fra det.

Det er også forskelligt for forskellige materialer, hvor vigtige BPA's egenskaber er. Nogle materialer kan i større grad end andre gå på kompromis med nogle af egenskaberne. I Danmark må man ikke bruge BPA i materialer, som er beregnet til børn under tre år, herunder sutter, sutteflasker og legetøj. Producenterne er derfor nødt til at ændre produktionen for at forblive på markedet, og de tvinges til at lave det bedste alternativ, så kvaliteten bibeholdes bedst muligt. I forhold til produkter til børn, kan det være nemmere at finde et alternativ til BPA i eksempelvis legetøj, da det ikke har brug for at være klare og gennemsigtige og kunne klare opvarmning såsom i mikroovn. Desuden er meget legetøj hårdt, og derfor behøves BPA's blødgørende effekter ikke. Langt de fleste bokse til fødevarer, som vi har i vores køkkener er ikke gennemsigtige, men ofte hvide eller materet. Omvendt er vi tit afhængige af, at de kan opvarmes, så derfor er det vigtigt, at BPA substitueres med et stof, som bibeholder materialets varmeresistens.

Andre materialer, hvor det umiddelbart kunne være sværere at finde alternativer til BPA, er til flasker eller andre emballage til fødevarer som nævnt før, da det er vigtigt, at indholdet ser delikat og tillokkende ud. Pålæg eller vand ser mest indbydende ud, når det er i klart materiale. Tilmed er det vigtigt, at materialet er fleksibelt og medgørligt, når indpakninger skal åbnes og lukkes. Så kunne man argumentere for, hvorfor glas ikke benyttes til opbevaring i stedet? Dette er en mulighed i flere henseender, og glas bruges allerede til en del opbevaring. Dog skal man være opmærksom

på, at BPA også findes i epoxyplast i lågene. Det vides endnu ikke med sikkerhed, hvor meget BPA, som kan frigives til fødevarer i tilfælde af, at glasset ligger ned, og maden på den måde kommer i kontakt med epoxyplast. Desuden er glas dyrere og mere sårbart. Endvidere går glas nemmere i stykker, og det kræver derfor mere forsigtighed at arbejde med glas. Desuden er der plast, som er meget afhængige af mange af BPA's egenskaber. Kontaktlinser er afhængige af både at være glasklare og bevægelige, så derfor er man afhængig af at finde alternativer til BPA med samme effekter, hvis BPA skal substitueres fra sådanne materialer.

Konklusion

BPA er et kendt hormonforstyrrende stof, som vekselvirker ved kroppens østrogenreceptorer. Denne østrogenlignende effekt skyldes, at BPA kan binde sig til de humane østrogenreceptorer ER- α og ER- β , da BPA-molekylets kemiske struktur gør det i stand til at passe ind i den ER-bindende lomme på receptorerne. Desuden har BPA, i lighed med det kvindelige kønshormon estradiol, en affinitet for receptorerne, som bevirker, at BPA bibeholdes i cellerne, og derved kan binde sig til ER. Når BPA binder sig til ER, igangsætter det en østrogeneffekt, der minder om den endogene østrogen bevirker, og det kan forstyrre hormonbalancen. Den østrogenlignende og dermed hormonforstyrrende effekt af BPA kan sandsynligvis føre til en lang række sundhedsmæssige konsekvenser i mennesker, hvoraf de mest bekymrende er nedsat fertilitet hos både mænd og kvinder samt øget incidens for kræfttyper som bryst- og prostatakraft. Disse mulige sundhedsmæssige konsekvenser er problematiske set i lyset af det store omfang af BPA-produktionen, og at det bl.a. anvendes til fødevarerbeholdere.

Det er BPA's evne til at binde sig til ER- α , der udnyttes i YES-assay-metoden, hvor DNA-sekvenser for hER α er integreret i kromosomet hos gærceller. BPA's evne til at binde sig til ER- α bevirker, at kemikaliet kan binde sig til gærcellernes østrogenreceptorer, når det tilsættes mediet. ER- α -bindingen igangsætter syntesen af β -galactosidase, som katalyserer reaktionen af gult substrat (CPRG) til rødt produkt, hvilket indikerer østrogenlignende effekt. Ud fra projektets eksperimentelle YES-assay kan det konkluderes, at YES egner sig til påvisning af østrogenlignende aktivitet. Dette var i særdeleshed tydeligt i kontrolforsøgene, hvor der var en klar sammenhæng mellem koncentrationen og aktiviteten af kontrolkemikalierne. Endvidere påviste YES, at BPA har en østrogenlignende aktivitet. På den måde er gærcellerne med humane østrogenreceptorer anvendt som en model, der illustrerer den østrogenlignende effekt af BPA.

YES egner sig til at påvise østrogenlignende virkningsmekanismer og kan derfor sandsynligvis anvendes som en standardmetode til påvisning af østrogenlignende effekt af kemikalier med mistænkt hormonforstyrrende effekt. Til videreundersøgelse af sundhedskonsekvenserne af eksponering for et kemikalie med østrogenlignende effekt er in vivo forsøg hensigtsmæssige at anvende. In vivo er eksempelvis rotter og mus højest egnede at anvende som modeller for de biologiske effekter af kemikaliet i mennesker, da østrogenreceptorer, tilsvarende de humane ER, er at finde i det endokrine system i disse typer gnavere.

En toksisk dosis af BPA kan have mere akutte konsekvenser, mens sundhedskonsekvenserne af hormonforstyrrende stoffer kan have konsekvenser mange år efter eksponering har fundet sted. Derfor er det problematisk, at sikkerhedsvurderingen af BPA foretages ud fra dets toksiske effekter frem for dets hormonforstyrrende. Den toksikologiske tilgang til BPA betyder, at det antages, at dosisresponskurven er monoton. En monoton kurve retfærdiggør, at toksikologiske teorier anvendes, og at regulative myndigheder ud fra disse teorier estimerer de biologiske effekter ved lave doser ud fra de observerede effekter ved høje doser. (Vandenberg, 2014) fandt, at en ikke-monoton dosis-responskurve var observeret i 23,1 % af BPA-studier, der inkluderede dosis-responssammenhænge. Det korrelerer med, at ikke-monotone sammenhænge er forventelige for hormoner og hormonforstyrrende stoffer. Ikke-monotone dosis-responssammenhænge for BPA indikerer, at reguleringspraksissen for kemikalier med hormonforstyrrende effekter er fejlbehæftet. Det kan betyde, at grænseværdierne er ukorrekte og at eksponering for doser under grænsen, der anses for at være sikre, kan have konsekvenser for den humane sundhed. Et stigende antal studier har observeret biologiske effekter i forsøg med lave doser, der anses for at være sikre. Det underbygger hypotesen om, at de nuværende grænseværdier for BPA er utilstrækkelige.

Perspektivering: Relevansen af BPA som casestudie og BPA's rolle i debatten om sikkerhedsvurderingen af hormonforstyrrende stoffer

Fortællingen om BPA's hormonforstyrrende effekter er interessant nok i sig selv. Men hvordan fortællingen passer ind i en større sammenhæng, kan måske umiddelbart være sværere at få øje på og kræver en udførlig forklaring.

BPA er først og fremmest et velegnet kemikalie at tage udgangspunkt i, da der findes omfattende litteratur om emnet. Det er f.eks. veldokumenteret at BPA kan have en østrogenlignende effekt, og et utal af studier beretter om biologiske ændringer *in vivo* såvel som *in vitro*. I 2011 berettede (Myers & M.fl., 2011, s. 394), at der eksisterede mere end 200 publicerede dyrestudier, og at BPA er et af de mest udførligt undersøgte hormonforstyrrende stoffer. Desuden er diskussionen om BPA en central del af et større paradigmeskifte inden for miljømæssig sundhedsvidenskab, kemikaliesikkerhed og toksikologiske studier (Vogel, 2009). Der sættes spørgsmålstejn ved validiteten af sikkerhedsvurderingerne af BPA, og dermed ved validiteten af toksikologiens metoder og teorier (såsom dosis-respons og NOAEL m.fl.), når de anvendes til at undersøge kemikalier, der mistænkes for at have hormonforstyrrende effekter.

At diskutere toksikologi i forhold til hormonforstyrrende stoffer kan virke nicheagtigt og teknisk, men vigtigheden af det kan ikke understreges nok. Hvis toksikologens metoder og teorier er utilstrækkelige, kan det betyde, at sikkerhedsvurderingerne af hormonforstyrrende stoffer er utilstrækkelige. Det kan betyde, at sikkerhedsforanstaltningerne giver en falsk trykthed, at eksponeringsniveauer, der anses for sikre, ikke er det, og det kan have store sundhedsmæssige konsekvenser for mennesker. Det er især studier, der omhandler, hvorvidt en lavdosis-effekt af BPA eksisterer, som har spillet en afgørende rolle for at iværksætte diskussionen af den klassiske toksikologis anvendelighed. Stadig flere hormonforstyrrende stoffer mistænkes for at have lavdosis-effekter. Det er åbenlyst problematisk, hvis doser der er klassificeret som ufarlige, kan have konsekvenser for den humane sundhed, men der er fortsat stor uenighed omkring, hvorvidt der eksisterer lavdosis-effekter ved BPA. På trods af at intet konsensus er nået, begynder eksistensen af lavdosis-effekter efterhånden at blive accepteret. Konsensus er ej, så har alene indikationerne på, at lavdosis-effekter eksisterer, iværksat debatten om, i hvor høj grad, sikkerhedsvurderingerne er valide.

Grænseværdierne, der fastsættes ud fra formodningen om en monoton dosis-respons-sammenhæng godtages ofte af regulative myndigheder uden krav om, at den efterprøves eksperimentelt. Det betyder, at monoton dosis-respons-sammenhæng og grænseværdierne antages for at være korrekte, da monoton sammenhæng giver anledning til at estimere effekter ved lave doser ud fra observerede effekter ved høje doser. Når disse antagelser efterprøves for BPA og viser markant anderledes resultater, end hvad der fra en toksikologisk synsvinkel forventes, illustreres reguleringsmetodens udfordringer og faldgrupper (Saal & Hughes, 2005). BPA-forskning bidrager dermed ikke kun til at afdække risikoen ved dette enkelte kemikalie, men BPA er med til at reformere grundlaget for hvordan kemikaliesikkerhed defineres. Det kan i sidste ende betyde, at grænseværdier revideres, og det kan have positiv indvirkning på den humane sundhed.

Med udgangspunkt i diskussionen om dosis-respons, lavdosis og modelanvendelse i forhold til BPA, bør der regulativt tages udgangspunkt i, at ikke-monotone dosis-respons-sammenhænge er observeret for BPA, og at det forventes, at tendensen kan observeres for mange hormonforstyrrende stoffer. BPA er et tydeligt eksempel på et hormonforstyrrende stof, hvor ikke-monotone dosis-responskurver hyppigt kan observeres. Det bør regulativt tages til efterretning, at:

- En monoton dosis-respons-sammenhæng ikke automatisk skal antages; men efterprøves for det specifikke kemikalie. Hvis ikke-monotone sammenhænge gør sig gældende, bør standardiserede toksikologiske undersøgelsesmetoder og teorier granskes og alternativer anvendes.
- I stedet for undersøgelser af høje doser som indikator på effekterne ved lave doser, bør doser af størrelsesorden inden for NOAEL og humane eksponeringsniveauer undersøges, for at afdække om det humane eksponeringsniveau kan føre til biologiske ændringer og derved udgøre en sundhedsrisiko.
- Fastsatte grænse værdier bør regelmæssigt reevalueres; værdier der anses for at være ”sikre” bør periodisk undersøges, for at fortsætte arbejdet med at afdække, hvilke mulige konsekvenser de kan have for den humane sundhed.
- For BPA specifikt er en ny risikovurdering nødvendig; tendensen til ikke-monotone dosis-responskurver danner belæg for at genoverveje regulativt fastsatte værdier, med henblik på at undersøge om nuværende grænseværdier er sufficente, og sikrer minimale sundhedskonsekvenser af den allestedsværende BPA-eksponering.
- Nye tilgange til sikkerhedsvurderingen af hormonforstyrrende stoffer skal baseres på endokrinologiske principper (Myers & M.fl., 2011, s. 424).

Litteraturliste

- Andersen, H. R., Andersson, A.-M., & M.fl. (1999). *Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals*. Hentede 7. 4 2016 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1566352/>
- Angle, B. M., Do, R. P., & M.fl. (2013). *Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation*. Hentede 23. 5 2016 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3886819/>
- Arbuckle, T. E., Marro, L., & M.fl. (2014). *Exposure to Free and Conjugated Forms of Bisphenol A and Triclosan among Pregnant Women in the MIREC Cohort*. *Environ Health Perspect.* Hentede 12. 5 2016 fra <http://ehp.niehs.nih.gov/1408187/#r7>
- Aster, N. (14. 4 2014). *Global BPA Production to Exceed 5.4 Mln Tonnes by 2015, According to In-demand Report by Merchant Research & Consulting*. Hentede 29. 4 2016 fra PRWEB: <http://www.prweb.com/releases/2014/04/prweb11761146.htm>
- Bendix, H. (2015). *Forskere slår alarm: Også alternativet til bisphenol A er skadeligt*. Hentede 04. 05 2016 fra Ingeniøren: <https://ing.dk/artikel/forskere-slaar-alarm-ogsaa-alternativet-til-bisphenol-er-skadeligt-173455>
- Biedermann, S., & M.fl. (2010). *Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin*. Springer-Verlag 2010.
- Bistan, M., Podgorelec, M., & M.fl. (2011). *Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in water Bodies*.
- Bjerregaard, P. (2013). *Økotoksikologi* (5 udg.). GYLDENDAL.
- CAMEO Chemicals version 2.5 rev. (u.d.). *cameochemicals*. Hentet fra CAMEO Chemicals: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/8331>
- Chemexper. (2016). *Chemexper*. Hentet fra Chemexper: <http://www.chemexper.com/>
- Clemens, D. J. (2012). *The YES assay as a tool to analyse endocrine disruptors in different matrices in Vietnam*. Bonn: Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES).
- Cox, M. M., & Nelson, D. L. (2013). *Lehninger - Principles of Biochemistry* (7 udg.). Macmillan Higher Education.
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., & M.fl. (12 2006). Estrogen Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), s. 773-781. Hentede 7. 4 2016 fra <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/58/4/773>
- Danmarks Statistik. (2014). *Laveste fertilitet i 24 år*. Hentede 30. 4 2016 fra <http://www.dst.dk/pukora/epub/Nyt/2014/NR078.pdf>
- Demierre, A.-L., & M.fl. (2012). *Dermal penetration of bisphenol A in human skin contributes marginally to total exposure*. Berne: Elsevier.
- Ebdруб, N. (14. 10 2014). *Hormonforstyrrende stoffer får mænds anus til at kravle frem mod penis*. Hentede 30. 4 2016 fra Videnskab: <http://videnskab.dk/krop-sundhed/hormonforstyrrende-stoffer-far-maends-anus-til-kravle-frem-mod-penis>
- Ehrlich, S., & M.fl. (8. 9 2013). *Low Dose Effects of bisphenol A, An integrated review of in vitro, laboratory animal, and epidemiology studies*. Hentede 15. 5 2016
- Ellis, M. (2013). *BPA may be linked to infertility in women*. Hentede 27. 04 2016 fra MNT: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/264158.php>
- EuropeanCommission. (2015). *Proposal for a new measure on bisphenol A (BPA) in food contact materials*. EU. Hentede 4. 4 2016
- Fang, H., Tong, W., & M.fl. (2000). *Quantitative Comparisons of in Vitro Assays for Estrogenic Activities*. National Center for Toxicological Research. Hentede 23. 5 2016

- Fic, A., Zegura, B., & M.fl. (2014). *Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay*. Hentede 2016. 05 16 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048928>
- Fødevarestyrelsen. (24. 11 2015). *Hormonforstyrrende stoffer i fødevarer*. Hentede 4. 4 2016 fra Fødevarestyrelsen: <http://www.foedevarestyrelsen.dk/Leksikon/Sider/Hormonforstyrrende-stoffer-i-f%C3%B8devarer-.aspx>
- Frederiksen, H., Jensen, T. K., & M.fl. (2014). *Human urinary excretion of non-persistent environmental chemicals: an overview of Danish data collected between 2006 and 2012*. Hentede 2016. 05 16 fra <http://www.reproduction-online.org/content/147/4/555.long>
- Frøsig, M., & M.fl. (2014). *Biologi i udvikling* (1 udg.). Nucleus.
- Gerona, R. R., Woodruff, T. J., & M.fl. (2013). *Bisphenol-A (BPA), BPA Glucuronide, and BPA Sulfate in Midgestation Umbilical Cord Serum in a Northern and Central California Population*. Hentede 2016. 05 16 fra <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es402764d>
- Gould, J., Leonard, L., & M.fl. (1998). *Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol*. Chemical Industry Institute of Toxicology. Hentede 2016. 04 04 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9783916/>
- Hansen, N. K., Kejs, A. M., & M.fl. (21. 12 2015). *Kræftens Bekæmpelse*. Hentede 2016. 04 25 fra <https://www.cancer.dk/brystkraeft-mammacancer/statistik-brystkraeft/>
- Harley, K. G., Marks, A. R., & M.fl. (2010). *PBDE Concentrations in Women's Serum and Fecundability*. Environmental Health Perspectives. Hentede 2016. 04 29 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2866688/?report=classic>
- Hass, U., Christiansen, S., & M.fl. (2016). *Low-dose effect of developmental bisphenol A exposure on sperm count and behaviour in rats*. DTU. Hentede 2016. 05 26 fra <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/andr.12176/epdf>
- Hejmej, A., & M.fl. (2011). *Steroids - Clinical Aspect*. Hentede 2016. 03 31 fra <http://www.intechopen.com/books/steroids-clinical-aspect/antiandrogenic-and-estrogenic-compounds-effect-on-development-and-function-of-male-reproductive-syst>
- Hiroi, H., & M.fl. (1999). *Differential Interactions of Bisphenol A and 17 β -estradiol with Estrogen Receptor α (ER α) and ER β* . University of Tokyo, Faculty of Medicine. Hentede 2016. 04 06 fra https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj1993/46/6/46_6_773/_article
- Ipsen, L., & M.fl. (2014). *Biologi* (3 udg.). Langbrugsforlaget.
- James, E. (2010). *Prenatal Exposure To Endocrine-Disrupting Chemicals Linked To Breast Cancer*. Hentede 2016. 04 20 fra MNT: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/189576.php>
- Kamper-Jørgensen, F., Almind, G., & Bruun Jensen, B. (2009). Munksgaard Danmark.
- Kinnberg, K. (2003). *Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity*. Miljøstyrelsen.
- Kitamura, S., Suzuki, T., & M.fl. (2005). *Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds*. Hiroshima University, Graduate School of Biomedical Sciences. Hentede 2016. 04 05 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635150/>
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., & M.fl. (1998). *Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β* - See more at: http://press.endocrine.org/doi/10.1210/endo.139.10.6216?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed#sthash.bLwQqgxJ.dpuf. Hentede 2016. 04 04 fra

- http://press.endocrine.org/doi/10.1210/endo.139.10.6216?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed
- Lanlan, L., Qianqian, W., & M.fl. (2015). *The Molecular Mechanism of Bisphenol A (BPA) as an Endocrine Disruptor by Interacting with Nuclear Receptors: Insights from Molecular Dynamics (MD) Simulations: e0120330*. Hentede 17. 04 2016 fra ProQuest: <http://search.proquest.com.molly.ruc.dk/docview/1667181129?pq-origsite=summon>
- Li, C. H. (2014). *Hormone*. Hentet fra Acces Science: <http://www.accessscience.com.bib265.bibbaser.dk/content/hormone/323000>
- Machtinger, R., Combelles, C. M., & M.fl. (2013). *Bisphenol-A and human oocyte*. Hentede 27. 04 2016 fra <http://humrep.oxfordjournals.org/content/early/2013/07/30/humrep.det312.full.pdf+html?sid=0f8e411c-6410-49e7-b685-0d41e202bdea>
- Mandrup, K., Boberg, J., & M.fl. (2015). *Low-dose effects of bisphenol A on mammary gland development in rats*. DTU. Hentede 26. 5 2016 fra <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/andr.12193/epdf>
- Meister, M. (2016). *Bisphenol A in low doses can affect the reproductive system and behaviour*. Hentede 26. 05 2016 fra DTU Food: <http://www.food.dtu.dk/english/News/2016/04/Bisphenol-A-in-low-doses-can-affect-the-reproductive-system-and-behaviour?id=ee009a3b-e421-4858-8be1-6103080a9978>
- Michałowicz, J. (2014). *Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation*. Department of Environmental Pollution Biophysics, University of Łódź, Pomorska 141/143St., 90-236 Łódź, Poland.
- Mikkelsen, L. (2013). Det økologiske råd.
- Miller, V. M. (2014). *Estrogen*. Hentede 14. 03 2016 fra Acces Science: <http://www.accessscience.com.bib265.bibbaser.dk/content/estrogen/242600>
- Ministeret for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri. (10. 11 2014). *Statusnotat om Bisphenol A*. Hentet fra <http://www.ft.dk/samling/20141/almDEL/flf/bilag/45/1418507.pdf>
- Mohd, R., Ejaz, A., & M.fl. (2015). *Androgen and Progesterone Receptors Are Targets for Bisphenol A (BPA), 4-Methyl-2,4-bis-(P-Hydroxyphenyl)Pent-1-Ene--A Potent Metabolite of BPA, and 4-Tert-Octylphenol: A Computational Insight: e0138438*. Hentede 18. 04 2016 fra ProQuest: <http://search.proquest.com.molly.ruc.dk/docview/1719287176?pq-origsite=summon>
- Myers, J. P., & M.fl. (27. 10 2011). *Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses*. Hentede 19. 5 2016 fra <http://press.endocrine.org/doi/full/10.1210/er.2011-1050>
- Nagel, S. C., Saal, F. S., & M.fl. (1997). *Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol*. Hentet fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1469837/?page=5>
- Nakama, A., & Funasaka, K. (2007). *Evaluation of estrogenic activity of organic biocides using ER-binding and YES assay*. Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan: ELSEVIER.
- Nam, S.-H.-S. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use.
- National Center for Biotechnology Information. (u.d.). *Bisphenol A*. Hentet fra PubChem Compound Database: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623>
- National Institutes of Health, U. D. (2016). *Endocrine Disrupters*. Hentede 31. 3 2016 fra National Institute of Environmental Health Sciences: <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>

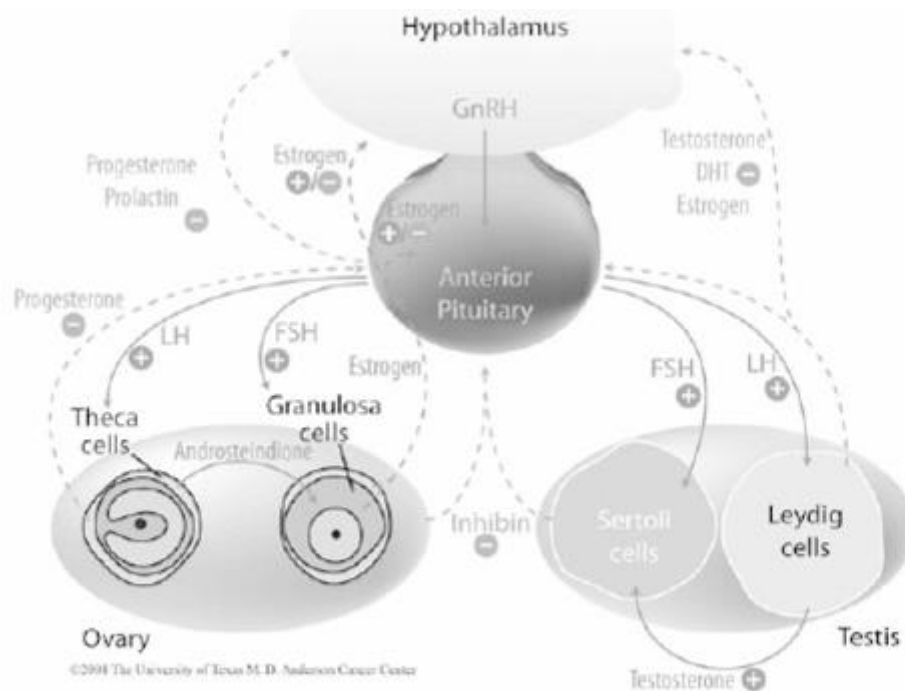
- NewsRx. (2016). *Embryonic Research; 'BPA-free' plastic accelerates embryonic development, disrupts reproductive system*. Hentede 20. 04 2016 fra ProQuest Central: <http://search.proquest.com/docview/1764402840?accountid=14732>
- Nørggard, K. B., Selck, H., & Syberg, K. (2012). *Aktuel Naturvidenskab*.
- Olsen, I., & Piilgaard Hallin, S. (2013). *FARMAKOLOGI*. Munksgaard.
- Paddock, C. (2010). *BPA Now Linked To Poor Sperm*. Hentede 27. 04 2016 fra MNT science: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/206102.php?sr&trendmd-shared=0>
- Pedersen, G. A., & m.fl. (2015). The Danish Enviromental Protection Agency.
- Politiken. (2009). *Plastarbejdere har meget sværere ved at få børn*. Hentede 29. 4 2016 fra Politiken: <http://politiken.dk/oekonomi/ECE797561/plastarbejdere-har-meget-svaerere-ved-at-faa-boern/>
- Rank, J. (2013). *USYNLIGE TRUSLER - Farlige kemikalier og kemikalieregulering* (1. udg.). Roskilde Universitets forlag.
- Rapra, S. (2012). *Endokrine Disruptors 2012*. Hentede 01. 03 2016 fra ProQuest: <http://site.ebrary.com.molly.ruc.dk/lib/rubruc/detail.action?docID=10785166>
- Rasmussen, U., & M.fl. (Maj 2000). Spildevand indeholder østrogene stoffer. *Vand & Jord*(2).
- Reece, J. B., Urry, L. A., & M.fl. (2011). *CAMPBELL BIOLOGY* (Ninth edition udg.). PEARSON.
- Richter, C. A., & M.fl. (26 Juni, 2007). *In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies*. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.).
- Routhledge, E. J., & Sumpter, J. P. (1996). *ESTROGENIC ACTIVITY OF SURFACTANTS AND SOME OF THEIR DEGRADATION PRODUCTS ASSESSED USING A RECOMBINANT YEAST SCREEN*. Uxbridge, Middlesex UB8 3PH, UK: Department of Biology and Biochemistry Brunel University.
- Saal, F. S., & Hughes, C. (2005). *An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment*. University of Missouri, Division of Biological Sciences. Hentede 23. 5 2016
- Schechter, A., & Malik, N. (2010). *Bisphenol A (BPA) in U.S. Food*. University of Texas School of Public Health, 6011 Harry Hines blvd V8.112, Texas: American Chemical Society.
- Schmidt, T. J. (2014). *Androgens*. Hentede 05. 04 2016 fra Access Science: <http://www.accessscience.com.bib265.bibbaser.dk/content/androgens/033400>
- Segni, N. D., Mallozzi, M., & M.fl. (2014). *Bisphenol a and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies*. Hentede 19. 04 2016 fra ProQuest: <http://search.proquest.com.molly.ruc.dk/docview/1525057170?pq-origsite=summon>
- Shanmugalingam, T., Soultati, A., & M.fl. (2013). *Global incidence and outcome of testicular cancer*. Hentede 2. 4 2016 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3804606/>
- Streibig, J. C., & mf. (2008). *Statistisk analyse og biologisk tolkning af toksicitetsdata*. Miljøstyrelsen.
- Thigpen, J. E., & M.fl. (2003). *Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice*. Hentede 23. 5 2016
- Torres, A., & Ramirez, C. (2014). *Experimental and theoretical study of bisphenol A migration from polycarbonate into regulated EU food simulant*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- United States Enviromental Protection Agency. (2014). *BISPHENOL A ALTERNATIVES IN THERMAL PAPER*. Hentede 05. 02 2016 fra https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/bpa_final.pdf
- Vallero, D. A. (2004). *Environmental endocrine disruptors*. Hentede 16. 03 2016 fra Access Science: <http://www.accessscience.com.bib265.bibbaser.dk/content/environmental-endocrine-disruptors/YB041115>

- Vandenberg, L. N. (2014). *Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: Bisphenol A as a case study*. University of Massachusetts. Hentede 20. 5 2016
- Vaughn, B. C. (2011). *Bisphenol A and Phthalates* (E-bog - 1. udg.). Nova Biomedical.
- Vinggård, A. M. (2015). DTU fødevare.
- Vogel, S. A. (2009). The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A “Safety”. *American Journal of Public Health*. Hentede 12. 5 2016 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2774166/>
- Washington, M. T. (2014). *Steroid*. Hentede 16. 03 2016 fra Access Science: <http://www.accessscience.com.bib265.bibbaser.dk/content/steroid/655700>
- Welshons, W., Thayer, K., & M.fl. (2003). *Large effects from small exposures: I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity*. *Environ Health Perspect*. Hentede 5. 5 2016
- Welshons, W., Thayer, K., Judy, B., Taylor, J., Curran, E., & Saal, F. v. (2003). *Large effects from small exposures: I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity*. *Environ Health Perspect*. Hentede 5. 5 2016
- WHO. (2015). *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. Hentede 26. 04 2016 fra World Health Organization: <http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch1.pdf>
- Woodruff, T. J., Janssen, S. J., & M.fl. (2010). *Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility* (1 udg.). Cambridge University Press. Hentet fra Cambridge University Press: <http://site.ebrary.com.molly.ruc.dk/lib/rubruc/detail.action?docID=10367197>
- XENOMETRIX - Swiss Commitment for Bioassays 3.03. (2015). *XenoScreen YES/YAS. YEAST-based microplate assay for the detection of compounds with estrogenic and androgenic agonistic and antagonistic activities using saccharomyces cerevisiae strains with human estrogen (hERα) and androgen (hAR) receptors*. GH-4123 Allschwil: XENOMETRIX AG.

Bilag

Bilag 1

Hypothalamus sender signaler til hypofysen, som herefter danner overordnede hormoner, eksempelvis FSH og LH, som sendes videre til blandet æggestokkene og testiklerne, som så producerer kønshormoner såsom østrogen og testosteron. Herunder ses den overordnede kommandovej, hvor der også kan ses positiv og negativ regulering (Woodruff, Janssen, & M.fl., 2010, s. 73)



Bilag 2

Faresætninger (H-sætninger) og sikkerhedssætninger (P-sætninger). Listen viser, at BPA mistænkes for at have en skadelig effekt på kroppen (National Center for Biotechnology Information).

P-sætninger
P201: specialinstruktioner før benyttelse
P202: benyt ikke før alle sikkerhedsforudsætninger er læst og forstået
P260: indånd ikke
P261: indånd ikke
P264: afvask efter håndtering af stoffet
P270: indtag ikke, drik ikke eller ryg ikke
P272: forgiftet tøj må ikke forlade arbejdspladsen
P273: undgå at indføre i miljøet
P280: vær iført sikkerhedshandsker/beskyttende tøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse
P281: benyt personlig beskyttelse hvis nødvendigt
P302+P352: ved eksponering på hud: vask med rigeligt vand
P305+P351+P338: ved eksponering i øjne: rens med vand i adskillige minutter. Fjern evt. Kontaktlinser
P307+P311: ved eksponering: kontakt et forgiftningscenter eller læge
P308+P313: ved eksponering eller bekymring: få medicinsk vejledning/opmærksomhed
P310: kontakt et forgiftningscenter eller læge
P312: kontakt et forgiftningscenter eller læge/... hvis du føler dig utilpas
P314: få medicinsk vejledning hvis du føler dig utilpas
P321: specifik behandling
P333+P313: ved hudirritation: få medicinsk vejledning
P363: vask forgiftet tøj for genbrug
H-sætninger
H303: kan skadeligt hvis det sluges
H313: kan skadeligt ved kontakt med hud
H317: kan skabe en allergisk reaktion
H318: kan forårsage øjenskade
H361: mistænkt for at skade fertiliteten eller ufødte børn
H370: skader organer
H373: skader organer ved længerevarende- eller gentagne eksponering
H401: skadelig for vandlige miljøer

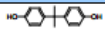
Bilag 3

BPA fysiske egenskaber (CAMEO Chemicals version 2.5 rev)

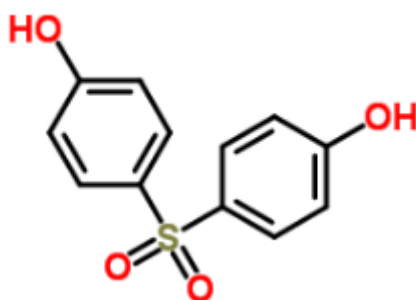
Udseende:	Hvide krystaller/flager eller pulver
Kemisk formel:	$C_{15}H_{16}O_2$ eller $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$
Kemisk navn	4,4'-isopropylidenediphenol
Molekylvægt	228,28634 g/mol
Opløselighed i vand	Ikke vandopløselig/meget lidt

Bilag 4

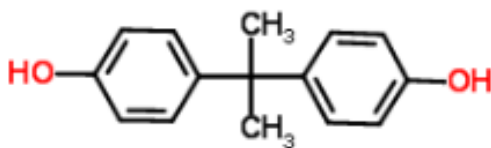
På tabellen ses, hvilke effekter henholdsvis BPA og BPS mistænkes for at have. Der er forskellige betegnelser for, hvor sundhedsskadelige stofferne mistænkes for at være. VL=very low hazard, L=low hazard, M=moderate hazard, H= high hazard og VH=very high hazard. Det viser sig ud fra denne tabel, at BPA og BPS bliver vurderet til at være meget ens. Eksempelvis ved reproduktion står de begge til medium, akut giftighed er de begge lave. De varierer dog også et par steder eksempelvis ved hud- og øjenirritation, hvor BPA står til moderat, BPS er lav. Det kan desuden ses, at de to stoffer er meget lig hinanden kemisk set, hvor de primært varierer mellem de to benzenringe, hvor BPS har svovl mellem de to ringe, hvor der er bundet to dobbeltbundet oxygenatomer. På BPA er der et karbonatom, som er bundet methylgrupper (United States Environmental Protection Agency, 2014).

Structure	Chemical (for TSCA inventory name and relevant trade names see the individual profiles in Section 4.8)	CASRN	Human Health Effects											Aquatic Toxicity		Environmental Fate	
			Acute Toxicity	Carcinogenicity	Genotoxicity	Reproductive	Developmental	Neurological	Repeated Dose	Skin Sensitization	Respiratory Sensitization	Eye Irritation	Dermal Irritation	Acute	Chronic	Persistence	Bioaccumulation
Bisphenol A and Phenolic Alternatives																	
	Bisphenol A 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)propane	80-05-7	L	M	L	M	H	M	M	M	M	M	H	H	VL	L	
	Bisphenol S 4-Hydroxyphenyl sulfone	80-09-1	L	M	M	M	M	M	H	L		L	L	M	M	M	L

Bisphenol S (forstørret i chemexper) (Chemexper, 2016)



Bisphenol A (forstørret i Chemexper) (Chemexper, 2016)



Bilag 5

Xenometrix YES/YAS assay

Indhold i kittet:

- 1 hætteglas indeholdende hER α gærceller (YES-assay) på filtpapir
- 1 hætteglas indeholdende hAR gærceller (YAS-assay) på filtpapir
- Basalmedie
- Vitaminopløsning
- L-aspartic syreopløsning
- L-threonine opløsning
- Cu-sulfatopløsning
- Substratopløsning (CPRG)
- 1 hætteglas indeholdende 17 β -estradiol positiv kontrol ("E2" – rødt låg)
- 1 hætteglas indeholdende 5 α -dihydrotestosterone positiv kontrol ("DHT" – blått låg)
- 1 hætteglas indeholdende 4-hydroxytamoxifen kontrol antagonist ("HT" – gult låg)
- 1 hætteglas indeholdende flutamide kontrol antagonist ("FL" – grønt låg)
- 1 hætteglas indeholdende DMSO
- 5 x 96 brøndplader (4 til assay; 1 til fortynding)
- 4 gasgennemtrængelige pladeforseglere
- 4 x T25 kulturflasker med gasgennemtrængelige filterpropper

Sikkerhed

Kittet er omkostningsfuldt og kræver stor respekt og derfor er der lavet et afsnit i forsøgsproceduren, som omhandler disse sikkerhedsfaktorer. Gærcellerne er genetisk modificeret organismer (GMO), som gør, at der skal tages bestemt hensyn med henblik på reglementet. I kittet medfølger kontrolkemikalier, som er hormonelt aktive, hvilke skal håndteres korrekt, så de ikke udgør en risiko for miljø og omgivelser. Det understreges, at kittet ikke må benyttes i mennesker og dyr. Dertil afhandles eventuelle udefra påvirkning, som kan have indflydelse på assayet, som indebærer ingen spising, drikke, rygning og påføring af make-up i laboratoriet. Hvad angår laboratorieudstyr er steriliteten et krav, da sensitiviteten af cellerne er høj. Derfor vaskes pipetter, pincetter etc. med destilleret vand og ethanol. Derudover skal handsker benyttes til håndtering af kittet og kemikalier.

Opbevaring:

- -20°C:

- Gærcellerne hvis de opbevares i mere end en måned
 - Antagonistic og positiv kontrol (E2, DHT, 4-HT, FL).
- 2-8°C:
 - Gærcellerne hvis de benyttes inden for en måned
 - CPRG-opløsning
 - Basal mediet
 - Vitaminopløsning
 - L-threonine opløsning
 - Antagonistic og positiv kontrol
- 20-25°C
 - L-aspartic acid opløsning
 - Cu(II)-sulfat opløsning
 - DMSO
 - 96- brøndplader (mikrotiterplader)
 - T25 kulturflasker
 - Pladeforseglere

Dag 1 (onsdag 11/05-16)

1) Klargøring af basalvækstmedie

Til denne del tilsættes den fulde mængde af følgende kemikalier til basalvækstmediet:

- Vitamin opløsning
- L-threonine opløsning
- L-aspartic syre opløsning

Derudover tilsættes 300µL Cu(II) sulfat opløsning til basalvækstmediet. Efter de nævnte kemikalier er tilsat, forekommer en omrystning af basalvækstmediet.

(Notat: Basalvækstmediet skal bruges inden for 2 uger ved 4°C. Ved opbevaring ved -20°C er opbevaring mulig i op til 6 måneder)

2) Dyrkning og mærkning af kulturflasker

To kulturflasker får begge påført en label. Den ene flaske får følgende label: "YES". Den anden flaske får følgende label: "YAS". Til begge flasker tilføres 5 mL af basalvækstmediet.

- Til flasken "YES" gøres nu følgende: Tilsætning af filterpapir, som indeholder hER α gærceller.
- Til flasken "YAS" gøres nu følgende: Tilsætning af filterpapir, som indeholder hAR gærceller.

Hertil skrues låget på begge kulturflasker. Begge flaskers låg indeholder ventilationslåg, som sørger for ilttilførsel, som forøger væksten af gærcellerne.

(Notat: Begge flasker skal ligge ned horisontalt, da opløsningen kan blokere for ilttilførsel, hvis en blokering finder sted.)

3) Inkubering af flaskerne: "YES og "YAS

Begge kulturflasker indsættes i inkuberingsmaskinen, som er forudindstillet til 31°C. Dertil benyttes en orbital ryster i inkuberingsmaskinen, som sørger for omrøring af opløsninger i kulturflaskerne (frekvens: 60 pr/min). Inkuberingen finder sted i 6 dage, indtil en grumset farve har indtruffet i begge opløsninger.



Dag 1,5 (tirsdag 12/5-16)

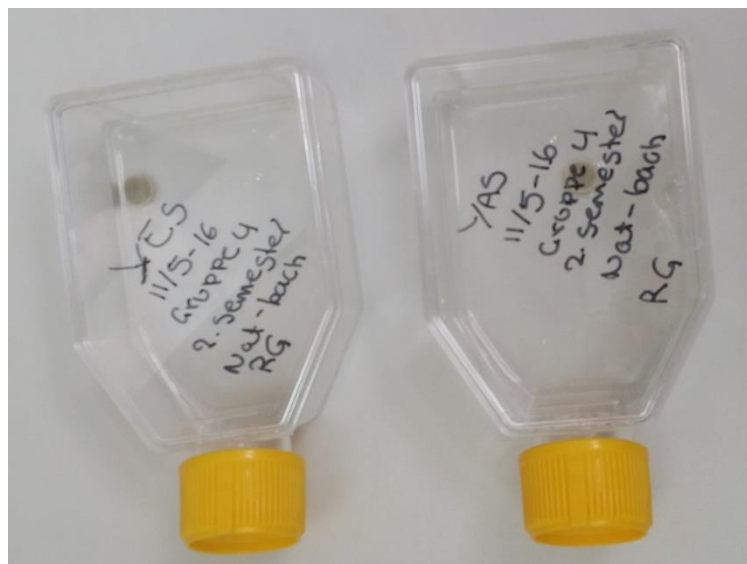
1) Iagttagelse af kulturflaskerne

Kulturflaskerne har inkuberet i cirka 24 timer og ingen vækst kunne observeres i flaskerne. Dette er en god observation, da vækst på dette tidlige tidpunkt kunne tyde på forurening af anden vækst.

Dag 2 (tirsdag 17/5-16)

1) Kulturflaskerne færdige med incubering

Begge kulturflasker ("YES og "YAS") har sammenlagt inkuberet fra d. 11/5-17/5. Vi undersøger begge flasker og kan konstatere, at der har været en vækst i de to kulturer. På billedet nedenfor kan kulturflaskerne ses:



På billedet ovenfor, er der sket en stor vækst over den sidste uge (det er dog ikke muligt, at gengive den vækst som har fundet sted pga. lys og baggrund.) På billedet kan det ses, at de filtpapirer, indeholdende hER α gærceller (venstre) og hAR gærceller (højre), har vækst, som kan ses på den mørkere farve (oprindelig hvide). Desuden er vækstmediet ligeledes blevet meget grumset sammenlignet med dag 0, hvilket indikerer en stor vækst. I sammenligning med dag 1,5 kan det konstateres, at den vækst som nu er forekommet, synes at være optimal og fortsættelse af forsøget kan finde sted.

2) Identifikation af cytotoxiske effekter i kulturflaskerne

For at bevise og konstatere, at gærcellerne ikke har taget skade og lever, udtages to prøver på 100 μ L fra begge kulturflasker, som undersøges i et spektrofotometer (OD₆₉₀ – angivet i forsøgsvejledningen). Data fra disse, ses nedenfor:

YES-assay	YAS-assay
1,038	1,093
0,992	1,007

Vores målinger er alle over 0,2, hvilket var en forudsætning for, at vi kunne fortsætte forsøget, da gennemsnitsværdien af absorptionsmålingerne skulle være mindst 0,2. Dette sikrer, at der er tilstrækkelig med vækst i cellerne, så vi vil kunne måle den hormonforstyrrende effekt af kemikallet, BPA. Vi fortynder vores to gærcellekulturer 1:10 i

nye flasker, hvor vi overfører 4,5 mL basal vækstmedie til henholdsvis en ny flaske for YAS og YES. Herefter tog vi 0,5 mL fra vores oprindelige vækstmedie med YAS og overførte den nye flaske for YAS. Det samme gjorde vi for YES, så vi havde en slutvolumen på 5 mL.

3) Bestemmelse af koncentrationen af BPA

Dette trin er især en klargørelse til dag 3, hvor BPA skal benyttes i bestemte koncentrationer. Vi har valgt en høj koncentration på 5500 µg/L, da denne koncentration i forsøg har givet maksimal østrogen effekt. Dette skal så fortyndes i forskellige brønde. Først laves der en stamopløsning, som er 1000 gange mere koncentreret, end den vi skal bruge, da afvejning i µg er for unøjagtigt at afveje. Stamopløsningen fortyndes derfor yderligere til vores forsøg:

- Der afvejes 0,0550 gram BPA, som fortyndes i 10 mL ethanol (96%) og opløser BPA'en.
- Der laves en mellemfortynding. Udregningerne for denne ses nedenfor:

$$0,0550 \text{ gram pr. } 10 \text{ mL}$$

$$55,0 \text{ mg pr. } 10 \text{ mL}$$

$$5500 \text{ mg.pr.liter}$$

Opløsningen på 5500 mg/L fortyndes 1000 gange, da vi skal have fortynding i µg/L

$$\frac{5500 \text{ mg pr./L}}{1000} = 5500 \text{ µg/L}$$

DAG 3

På dag tre laves de 4 assay-plader for YES agonist, YES antagonist, YAS-agonist og YAS-antagonist, som ser ud som følger:

YES agonist: (kolonnerne A-H;3-5 indeholder BPA)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E2 Dil 8	E2 Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8							
B	E2 Dil 7	E2 Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7							
C	E2 Dil 6	E2 Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6							

D	E2 Dil 5	E2 Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5							
E	E2 Dil 4	E2 Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4							
F	E2 Dil 3	E2 Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3							
G	E2 Dil 2	E2 Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2							
H	E2 Dil 1	E2 Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1							

- E2: 17 β -estradiol

YES antagonist: (kolonnerne A-H;3-5 indeholder BPA)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E2+HT Dil 8	E2+HT Dil 8	E2 Dil 8	E2 Dil 8	E2 Dil 8							
B	E2+HT Dil 7	E2+HT Dil 7	E2 Dil 7	E2 Dil 7	E2 Dil 7							
C	E2+HT Dil 6	E2+HT Dil 6	E2 Dil 6	E2 Dil 6	E2 Dil 6							
D	E2+HT Dil 5	E2+HT Dil 5	E2 Dil 5	E2 Dil 5	E2 Dil 5							
E	E2+HT Dil 4	E2+HT Dil 4	E2 Dil 4	E2 Dil 4	E2 Dil 4							
F	E2+HT Dil 3	E2+HT Dil 3	E2 Dil 3	E2 Dil 3	E2 Dil 3							
G	E2+HT Dil 2	E2+HT Dil 2	E2 Dil 2	E2 Dil 2	E2 Dil 2							
H	E2+HT Dil 1	E2+HT Dil 1	E2 Dil 1	E2 Dil 1	E2 Dil 1							

- E2: 17 β -estradiol
- HT: 4-hydroxytamoxifen

YAS agonist: (kolonnerne A-H;3-5 indeholder BPA)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DHT Dil 8	DHT Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8							
B	DHT Dil 7	DHT Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7							
C	DHT Dil 6	DHT Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6							
D	DHT Dil 5	DHT Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5							
E	DHT Dil 4	DHT Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4							
F	DHT Dil 3	DHT Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3							
G	DHT Dil 2	DHT Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2							
H	DHT Dil 1	DHT Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1							

- DHT: 5 α -dihydrotestosterone

YAS antagonist: (kolonnerne A-H;3-5 indeholder BPA)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DHT + FL Dil 8	DHT + FL Dil 8	DHT Dil 8	DHT Dil 8	DHT Dil 8							
B	DHT + FL Dil 7	DHT + FL Dil 7	DHT Dil 7	DHT Dil 7	DHT Dil 7							
C	DHT + FL Dil 6	DHT + FL Dil 6	DHT Dil 6	DHT Dil 6	DHT Dil 6							
D	DHT + FL Dil 5	DHT + FL Dil 5	DHT Dil 5	DHT Dil 5	DHT Dil 5							
E	DHT + FL Dil 4	DHT + FL Dil 4	DHT Dil 4	DHT Dil 4	DHT Dil 4							
F	DHT + FL Dil 3	DHT + FL Dil 3	DHT Dil 3	DHT Dil 3	DHT Dil 3							
G	DHT + FL Dil 2	DHT + FL Dil 2	DHT Dil 2	DHT Dil 2	DHT Dil 2							
H	DHT + FL Dil 1	DHT + FL Dil 1	DHT Dil 1	DHT Dil 1	DHT Dil 1							

- FL: fluamide

- DHT: 5 α -dihydrotestosterone

1) Klargøring af agonist og antagonist kontrolkemikalier

For at opnå en bestemt koncentration tilføres 100 μ L DMSO til følgende kemikalier; E2, DHT, HT og FL. Dertil er koncentrationen af kemikalierne opgivet efter tilførslen:

- E2 $\rightarrow 1 \cdot 10^{-6}$ M
- DHT $\rightarrow 1 \cdot 10^{-4}$ M
- HT $\rightarrow 1 \cdot 10^{-3}$ M
- FL $\rightarrow 1 \cdot 10^{-2}$ M

Efter tilførsel af DMSO omrystes blandingerne i 30 sekunder for at sikre, at kontrolkemikalierne og DMSO blandes ordentligt.

Der klargøres 4 plader med 96 brønde hver, som navngives; "YES agonist", "YES antagonist", "YAS agonist" og "YAS antagonist".

2) Klargøring af assay-medie til agonister (både YES og YAS)

Der overføres 20 mL basalvækstmedie til reservoir. Dertil overføres 400 μ L CPRG substratopløsning til reservoir, hvilket kan ses på billedet nedenfor. CPRG giver den gule farve. Det kan være, at der her er sket en pipetteringsfejl, hvor der er tilsat en smule mere CPRG, da stemplet kan være trykket for langt ned, hvilket vi undersøger, når vi ser på absorbansen for de fire plader, når der måles OD for dag 3.



Der overføres 100 μ L af assaymediet til "YES agonist" og "YAS agonist" i brøndene A-H;1-5 på begge plader. Pladerne lukkes herefter til med et låg for at undgå forurening udefra.

Nedenfor vises et skema for henholdsvis YES agonist og YAS agonist på en brøndplade af 96 brønde. Farven som ses i de nævnte intervaller skal illustrere farven af indholdet i assaymediet, som ses på billedet i ovenover:

YES agonist:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
B	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
C	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
D	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
E	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
F	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
G	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
H	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							

YAS agonist:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
B	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
C	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
D	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
E	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
F	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
G	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							
H	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL							

3) Klargøring af YES antagonist medie (E2+HT)

Der overføres 5 mL basalmedie til et reservoir. Efterfølgende overføres 100 μL CPRG substratopløsning, samt 10 μL E2 stamopløsning til mediet. Til den korresponderende

brøndplade, YES antagonist assay, overføres 100 µL til brøndene A-H;1-5. Efter overførslen påføres brøndpladen et låg. På skemaet nedenfor illustreres, hvilke brønde som der overføres til:

YES antagonist:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)							
B	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)							
C	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)							
D	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)							
E	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)							
F	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)							
G	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)							
H	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)	100 µL (medie) inkl. 10 µL (E2)							

4) Klargøring af YAS antagonist (DHT+FL)

Da vi mangler et reservoir benytter vi en agarplade, hvor vi overfører 10 mL fra assay-mediet, som vi klargjorde til agonister (Dag 3, del 2), da vi mangler CPRG. Vi har en del i overskud fra agonist-mediet, da vi ikke engang fylder en halv plade. Dette undrer os meget, at vi mangler CPRG, da vi egentlig følte, at vi pipetterede korrekt. Det er af den grund, at vi tror, at der kan være sket en fejl i første omgang, vi ved det dog ikke. Det kan også være en fejl fra fabrikanten. Vi tilsatte 6 μ L DHT stamopløsning. Der overføres 100 μ L fra mediet, til den korresponderende brøndplade, YAS antagonist assay. På skemaet nedenfor illustreres hvilke brønde, som der overføres til:

YAS antagonist:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT							
B	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT							
C	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT							
D	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT							
E	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT	100 μ L (medie) inkl. 6 μ L DHT							
F	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L							

	(medie) inkl. 6 µL DHT	(medie) inkl. 6 µL DHT	(medie) inkl. 6 µL DHT	(medie) inkl. 6 µL DHT	(medie) inkl. 6 µL DHT							
G	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT							
H	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT	100 µL (medie) inkl. 6 µL DHT							

Vi lader nu disse fire plader stå, mens vi laver en fortyndingsplade med BPA og de fire forskellige kemikalier; E2, DHT, HT og FL, som skal tilføres i forskellige koncentrationer til pladerne.

5) Klargøring af fortyndingsplade

I en plade med 96 brønde gøres følgende:

- I brøndene A-G;1-4 tilføres 50 µL DMSO
- I brøndene A-H;5 tilføres 100 µL DMSO
- I brønden H;1 indsættes 73 µL E2
- I brønden H;2 indsættes 73 µL HT
- I brønden H;3 indsættes 73 µL DHT
- I brønden H;4 indsættes 73 µL FL
- I brøndene AG;6 og AH;11 tilføres 50 µL ethanol
- I brønd H;6 tilføres 73 µL mellemfortynding af kemikaliet (BPA) i koncentrationen 5500 µg/L)
- Kolonne 7-10 er beregnet til testmateriale, men her er kun et taget i brug (kolonne 6)

Nedenfor er udfyldt et skema, som illustrerer, det ovennævnte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	100 µL DMSO	50 µL ethanol					50 µL ethanol	

B	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	100 µL DMSO	50 µL ethanol					50 µL ethanol	
C	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	100 µL DMSO	50 µL ethanol					50 µL ethanol	
D	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	100 µL DMSO	50 µL ethanol					50 µL ethanol	
E	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	100 µL DMSO	50 µL ethanol					50 µL ethanol	
F	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	100 µL DMSO	50 µL ethanol					50 µL ethanol	
G	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	50 µL DMSO	100 µL DMSO	50 µL ethanol					50 µL ethanol	
H	73 µL E2	73 µL HT	73 µL DHT	73 µL FL	100 µL DMSO	73 µL BPA					50 µL ethanol	

6) Fortynding af BPA og kontrollkemikalier

Fra H1 med kontrollkemikalie E2 pipetteres 23 µL op, som tilføres G1, herefter tages 23 µL fra G1 og tilføres F1. Hvilket gøres til og med B1, hvor 23 µL fra B1 kasseres. Dette gøres for alle kontrollkemikalier i rækkerne B-H; 1-4.

Fra H6, hvor der tilført 73 µL BPA, suges 23 µL med en pipette og tilføres G6. Fra G6 suges 23 µL, som tilføres F6 osv. så koncentrationen af BPA bliver mindre for hver fortynding. Der fortyndes dog ikke fra B;6 til A;6, her bibeholdes de sidste 23 µL i modsæt til kontrollkemikalier.

7) Klargørelse af assayplader

Fra fortyndingspladens række 5 overføres 2 µL DMSO til de 4 assaypladers brønde i kolonnerne A-H;3-5.

Dertil overføres der fra række 11 (ethanol) fra fortyndingspladen 2 µL til rækkerne A-H;1-2 i de 4 assay plader, som er vores non-DMSO opløsningsmiddel. Dette illustreres nedenfor:

De 4 assayplader er illustreret i et skema nedenfor. Det skal udstreges, at tidligere tilsætninger af kemikalier ikke vises på skemaet, men er implicit:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2 µL ethanol	2 µL ethanol	2 µL DMSO	2 µL DMSO	2 µL DMSO							
B	2 µL ethanol	2 µL ethanol	2 µL DMSO	2 µL DMSO	2 µL DMSO							
C	2 µL ethanol	2 µL ethanol	2 µL DMSO	2 µL DMSO	2 µL DMSO							
D	2 µL ethanol	2 µL ethanol	2 µL DMSO	2 µL DMSO	2 µL DMSO							
E	2 µL ethanol	2 µL ethanol	2 µL DMSO	2 µL DMSO	2 µL DMSO							
F	2 µL ethanol	2 µL ethanol	2 µL DMSO	2 µL DMSO	2 µL DMSO							
G	2 µL ethanol	2 µL ethanol	2 µL DMSO	2 µL DMSO	2 µL DMSO							
H	2 µL ethanol	2 µL ethanol	2 µL DMSO	2 µL DMSO	2 µL DMSO							

NB: Der skiftes pipettespids, når der arbejdes med nyt assay, dvs. ny plade. Vi tager heller DMSO eller ethanol fra samme brønd til to forskellige plade for at undgå forurening.

8) YES agonist (E2)

Fra fortyndingspladen tages 2 µL fra brøndene A-G;1 (E2) til kolonnerne 1+2 i YES agonist assayplade - altså 2 µL til hver brønd. Brøndene, hvor der tages fra i kolonne 1 på fortyndingspladen, indsættes i de tilsvarende brønde på YES agonist assayplade – eksempelvis overføres 2 µL fra A1 fra fortyndingspladen til A1 og A2 på brøndpladen. Vi skifter spids, hvor gang vi skifter koncentration for ikke at mikse koncentrationerne, da de er nøje fortyndet.

På skemaet nedenfor illustreres dette. Det skal understreges, at tidligere tilsætninger til brøndene ikke vises på dette skema, men er implicit – såsom de 2 µL ethanol i A-H;1-2:

YES agonist:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2 µL E2	2 µL E2										
B	2 µL E2	2 µL E2										
C	2 µL E2	2 µL E2										
D	2 µL E2	2 µL E2										
E	2 µL	2 µL										

	E2	E2										
F	2 μ L E2	2 μ L E2										
G	2 μ L E2	2 μ L E2										
H	2 μ L E2	2 μ L E2										

9) YES antagonist (HT)

Samme procedure som i trin 8). Dog benyttes kolonne 2 (HT) på fortyndingspladen i stedet for kolonne 1.

10) YAS agonist (DHT)

Samme procedure som i trin 8). Dog benyttes kolonne 3 (DHT) på fortyndingspladen i stedet for kolonne 1.

11) YAS antagonist (FL)

Samme procedure som i trin 8). Dog benyttes kolonne 4 (FL) på fortyndingspladen i stedet for kolonne 1.

12) BPA

Fra kolonne 6 (BPA) på fortyndingspladen overføres 2 μ L til brøndene A-H;3-5 til de 4 assays i følgende rækkefølge; YES agonist, YAS agonist, YES antagonist og YAS antagonist. Det er samme procedure som før, hvor der overføres fra A1 på fortyndingspladen til A;3-5 på den pågældende assay plade. Det skiftes spids for hver overførsel, da der tages fra de samme BPA-brønde til samtlige 4 plader, og vi ønsker ikke at blande hverken kontrollkemikalier eller koncentrationer.

Observation: Kolonne 6 fra vores fortyndingsplade, indeholdende BPA fortyndet i ethanol, var delvist fordampet, hvilket resulterede i, at en erstatning af kolonne 6 var nødvendig inden forsøget kunne påbegyndes. Erstatningen bliver fordelt til en ny række på en tom brøndplade, fordi der stadig er BPA tilbage i kolonne 6 på fortyndingspladen, da ethanolen er fordampet.

I rækkerne A-H;1-2 befinder sig den korresponderende agonist/antagonist kontrol i hver plade.

Nedenfor ses et skema, som illustrerer det ovennævnte. Der vises kun 1 skema, da samme procedure i de 4 assays finder sted. Det skal understreges, at tidligere overførsler ikke er nævnt i skemaet, men er implicit:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			2 µL BPA	2 µL BPA	2 µL BPA							
B			2 µL BPA	2 µL BPA	2 µL BPA							
C			2 µL BPA	2 µL BPA	2 µL BPA							
D			2 µL BPA	2 µL BPA	2 µL BPA							
E			2 µL BPA	2 µL BPA	2 µL BPA							
F			2 µL BPA	2 µL BPA	2 µL BPA							
G			2 µL BPA	2 µL BPA	2 µL BPA							
H			2 µL BPA	2 µL BPA	2 µL BPA							

13) Overførsel af YES- og YAS-gærceller til assaypladerne

Det beregnes hvor meget af hver gærkultur YES og YAS (1:10), som skal overføres til et agarplader. Her bruges OD₆₉₀ fra dag 2, trin 2, hvor gennemsnittet af to målingerne for henholdsvis YES og YAS, benyttes.

$$YES: \frac{0,6}{OD_{690}} = \frac{0,6}{0,607 \text{ nm}} = 0,988 \text{ mL}$$

$$YAS: \frac{0,4}{OD_{690}} = \frac{0,6}{0,901 \text{ nm}} = 0,444 \text{ mL}$$

De udregnede volumener for gærceller tilføres 2 agarplader, som navngives ”YES” og ”YAS”. Derudover, tilsættes 20 mL basalmedie til hver agarplade. Det er afgørende, at gærcellerne og basalmediet mikset godt sammen, da gærcellerne har en tendens til at falde til bunds. Vi rørte derfor løbende i agarpladen, mens vi overførte gærcellerne til brøndene.

14) Overførsel af gærceller og basalmedie til korresponderende assays

Der overføres 100 µL fra agarpladerne (trin 13) ”YES” og ”YAS” til de korresponderende assays brønde. Altså overføres der 100 µL fra ”YES” til samtlige brønde i YES agonist og YES antagonist, samt 100 µL fra ”YAS” til samtlige brønde i YAS agonist og YAS antagonist. Vi skifter spids hver gang.

15) Absorbansmåling af de 4 assays

Der foretages absorbansmåling i et spektrofotometer ved OD₅₇₀ og OD₆₉₀. De tomme felter vises stadig, som illustration for brøndpladerne og hvilke brønde som er i brug:

YES agonist OD₆₉₀ (d. 18/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,046	0,046	0,048	0,048	0,047							
B	0,048	0,047	0,048	0,047	0,050							
C	0,046	0,053	0,050	0,051	0,044							
D	0,054	0,047	0,046	0,047	0,045							
E	0,048	0,046	0,048	0,048	0,046							
F	0,048	0,047	0,046	0,047	0,044							
G	0,053	0,050	0,046	0,048	0,045							
H	0,047	0,045	0,046	0,045	0,045							

YES agonist OD₅₇₀ (d. 18/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,071	0,069	0,071	0,068	0,071							
B	0,073	0,073	0,071	0,072	0,074							
C	0,072	0,076	0,074	0,075	0,07							
D	0,077	0,072	0,071	0,073	0,071							
E	0,072	0,074	0,072	0,072	0,071							
F	0,074	0,071	0,071	0,072	0,069							
G	0,079	0,077	0,073	0,074	0,069							
H	0,073	0,071	0,07	0,071	0,07							

YAS agonist OD₆₉₀ (d. 18/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,047	0,049	0,048	0,047	0,047							
B	0,05	0,049	0,046	0,047	0,048							
C	0,047	0,048	0,047	0,049	0,047							
D	0,05	0,047	0,051	0,047	0,051							
E	0,053	0,048	0,048	0,05	0,068							
F	0,05	0,053	0,052	0,051	0,045							
G	0,051	0,05	0,048	0,049	0,05							

H	0,045	0,044	0,046	0,045	0,054							
---	-------	-------	-------	-------	-------	--	--	--	--	--	--	--

YAS agonist OD₅₇₀ (d. 18/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,07	0,071	0,071	0,07	0,073							
B	0,075	0,073	0,069	0,071	0,07							
C	0,071	0,071	0,07	0,075	0,072							
D	0,076	0,071	0,076	0,071	0,077							
E	0,076	0,073	0,071	0,074	0,089							
F	0,073	0,076	0,076	0,074	0,07							
G	0,075	0,075	0,074	0,072	0,074							
H	0,07	0,07	0,068	0,069	0,078							

YES antagonist OD₆₉₀ (d. 18/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,051	0,049	0,046	0,047	0,049							
B	0,048	0,047	0,046	0,047	0,048							
C	0,045	0,046	0,044	0,06	0,045							
D	0,048	0,044	0,046	0,046	0,046							
E	0,05	0,049	0,047	0,051	0,049							
F	0,048	0,049	0,052	0,051	0,047							
G	0,048	0,051	0,047	0,046	0,046							
H	0,047	0,047	0,048	0,047	0,045							

YES antagonist OD₅₇₀ (d. 18/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,064	0,064	0,06	0,063	0,065							
B	0,061	0,063	0,061	0,066	0,065							
C	0,061	0,06	0,06	0,078	0,063							
D	0,063	0,061	0,061	0,065	0,064							
E	0,062	0,066	0,061	0,065	0,065							
F	0,062	0,061	0,067	0,063	0,063							
G	0,062	0,065	0,063	0,062	0,062							
H	0,062	0,062	0,062	0,062	0,062							

YAS antagonist OD₆₉₀ (d. 18/5-16):

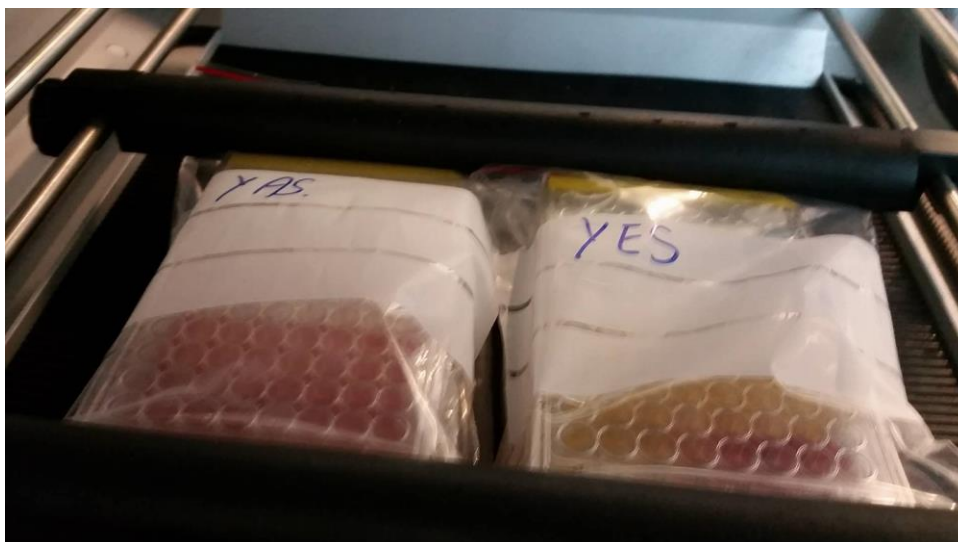
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,047	0,059	0,05	0,051	0,051							
B	0,049	0,05	0,05	0,051	0,048							
C	0,05	0,048	0,05	0,049	0,046							
D	0,051	0,047	0,052	0,048	0,047							
E	0,051	0,054	0,05	0,049	0,051							
F	0,049	0,049	0,05	0,05	0,044							
G	0,048	0,049	0,05	0,052	0,046							
H	0,044	0,047	0,054	0,048	0,045							

YAS antagonist OD₅₇₀ (d. 18/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,071	0,084	0,073	0,074	0,075							
B	0,073	0,076	0,075	0,076	0,073							
C	0,072	0,073	0,076	0,075	0,073							
D	0,075	0,073	0,076	0,072	0,069							
E	0,072	0,082	0,073	0,073	0,077							
F	0,072	0,072	0,074	0,072	0,071							
G	0,071	0,074	0,075	0,077	0,074							
H	0,070	0,073	0,074	0,072	0,072							

16) Inkubering

Efter klargøring af de 4 assays indsættes disse i inkubator ved 31°C i 48 timer ved 60 rotation/min således, at der er konstant bevægelse i de indsatte elementer. På billedet nedenfor, ses to poser, ”YES” og ”YAS”, indeholdende de korresponderende assays. Vi har lagt et par våde servietter i bunden i posen for at undgå at være brøndene tørrer ud.

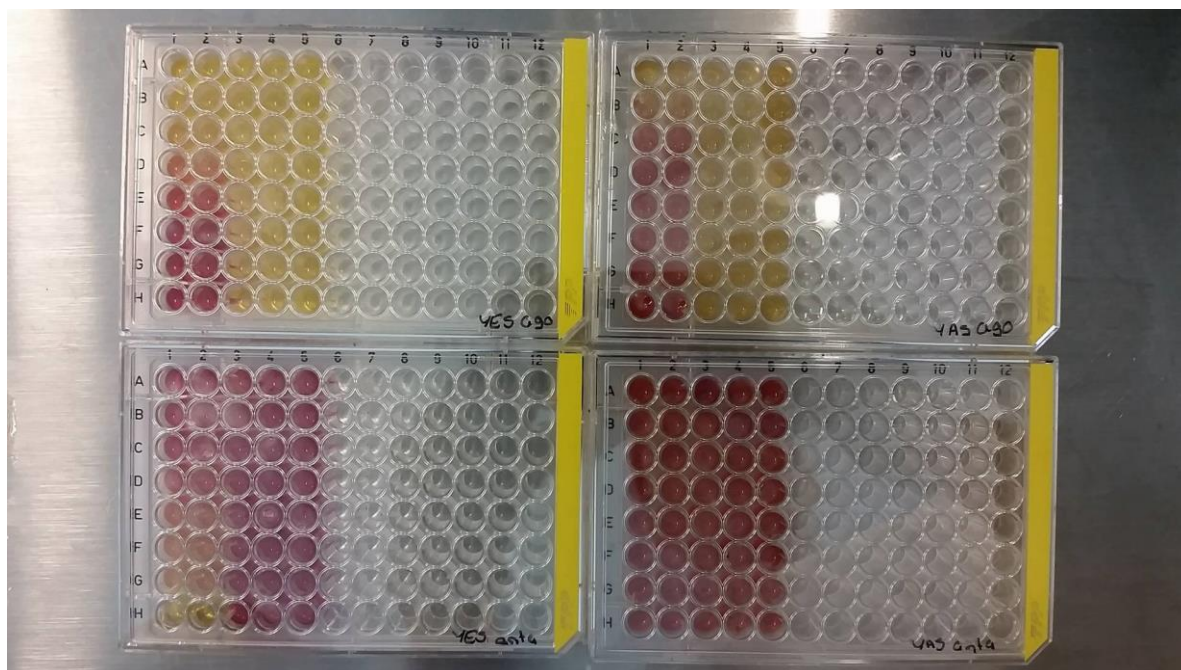


DAG 4

1) Absorbansmåling efter 48 timer

Efter 48 timer aflæses de 4 assays ved OD₆₉₀ og OD₅₇₀. På billedet nedenfor ses de 4 assays, hvortil forskellige farver kan ses i mange brønde:

- Venstre hjørne, øverst: YES agonist
- Venstre hjørne, nederst: YES antagonist
- Højre hjørne, øverst: YAS agonist
- Højre hjørne, nederst: YAS antagonist



Herunder er absorbansen for de 4 assays opsat i skemaer. De tomme kolonner er med til at illustrere de resterende brønde på pladerne:

YES agonist OD₆₉₀ (d. 20/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,648	0,693	0,693	0,502	0,69							
B	0,715	0,717	0,516	0,422	0,49							
C	0,808	0,534	0,686	0,724	0,431							
D	0,845	0,509	0,584	0,543	0,61							
E	0,738	0,629	0,74	0,722	0,56							
F	0,773	0,534	0,585	0,587	0,558							
G	0,798	0,761	0,637	0,655	0,633							
H	0,748	0,696	0,621	0,535	0,612							

YES agonist OD₅₇₀ (d. 20/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,787	0,832	0,78	0,624	0,816							
B	0,887	0,874	0,652	0,535	0,615							
C	1,024	0,713	0,826	0,872	0,553							
D	1,247	0,831	0,724	0,675	0,753							
E	1,536	1,375	0,891	0,874	0,688							
F	2,757	2,712	0,736	0,728	0,694							
G	2,759	2,547	0,79	0,805	0,79							
H	2,403	2,357	0,78	0,674	0,749							

YAS agonist OD₆₉₀ (d. 20/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,585	0,735	0,626	0,683	0,731							
B	0,689	0,72	0,518	0,645	0,601							
C	0,712	0,748	0,69	0,649	0,684							
D	0,703	0,678	0,652	0,708	0,702							
E	0,515	0,597	0,665	0,7	0,676							
F	0,484	0,505	0,706	0,675	0,614							
G	0,509	0,461	0,696	0,732	0,663							
H	0,501	0,459	0,656	0,568	0,558							

YAS agonist OD₅₇₀ (d. 20/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,762	0,941	0,824	0,857	0,915							
B	1,038	1,032	0,676	0,824	0,777							
C	1,465	1,528	0,888	0,83	0,882							
D	1,677	1,627	0,837	0,899	0,907							
E	1,426	1,483	0,858	0,898	0,871							
F	1,469	1,314	0,892	0,865	0,802							
G	1,516	1,357	0,885	0,918	0,855							
H	1,533	1,411	0,823	0,741	0,737							

YES antagonist OD₆₉₀ (d. 20/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,743	0,927	0,706	0,662	0,946							
B	0,734	0,803	0,7	0,753	0,764							
C	0,885	0,754	0,669	0,782	0,862							
D	0,755	0,694	0,68	0,854	0,687							
E	0,882	0,966	0,796	0,895	0,803							
F	0,912	0,893	0,636	0,825	0,692							
G	0,893	0,92	0,677	0,662	0,524							
H	0,09	0,115	0,711	0,706	0,803							

YES antagonist OD₅₇₀ (d. 20/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,089	2,466	1,973	2,147	2,548							
B	1,967	2,207	2,013	2,426	2,509							
C	1,891	1,734	2,111	2,495	2,783							
D	1,518	1,286	2,192	2,765	2,261							
E	1,353	1,401	2,253	2,85	2,64							
F	1,268	1,244	2,225	2,61	2,403							
G	1,214	1,256	2,252	2,564	2,275							
H	0,136	0,161	2,335	2,362	2,524							

YAS antagonist OD₆₉₀ (d. 20/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A	0,54	0,57	0,594	0,503	0,54							
B	0,49	0,581	0,517	0,583	0,487							
C	0,476	0,531	0,501	0,534	0,467							
D	0,587	0,501	0,545	0,625	0,404							
E	0,618	0,639	0,549	0,53	0,542							
F	0,588	0,601	0,561	0,587	0,506							
G	0,758	0,664	0,497	0,532	0,409							
H	0,756	0,802	0,474	0,584	0,32							

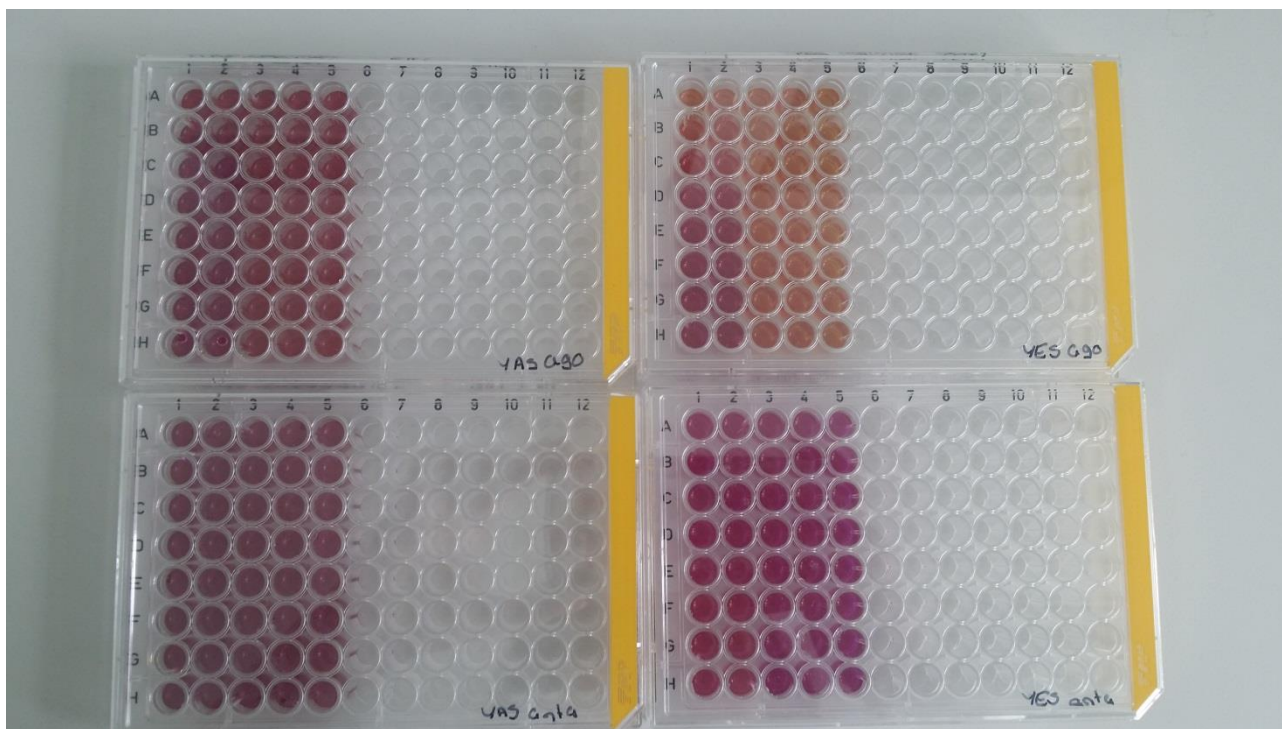
YAS antagonist OD₅₇₀ (d. 20/5-16):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,389	1,562	1,987	1,413	1,516							
B	1,351	1,483	1,376	1,564	1,452							
C	1,333	1,428	1,373	1,458	1,369							
D	1,481	1,359	1,428	1,561	1,278							
E	1,458	1,588	1,425	1,412	1,623							
F	1,444	1,498	1,505	1,483	1,478							
G	1,549	1,531	1,369	1,484	1,385							
H	1,582	1,71	1,441	1,56	1,314							

2) Fortolkning af farver på assayplader

På billedet på dag 4, punkt 1), ses både gul, lilla og rød farve. De brønde som har fået lilla farve, har den højeste koncentration. Brøndene med den gule/lidt gule farve, har enten ikke reageret / reageret lidt. Brønde med røde/lidt røde farver indikerer, at der er sket en reaktion / kun reageret lidt.

- 3) Vi lod prøverne stå til mandag 23/05-2016 for at se, om det ville gøre en forskel for de prøver, som endnu ikke havde reageret. Resultatet kan ses på billedet nedenunder.



Koncentrationer for BPA og kontrollkemikalier med tilhørende absorptions

Koncentration af BPA fortyndingsplade

Vi udregner koncentrationen af BPA i vores fortyndingsrække for, at vi kan udregne koncentrationen af BPA i brøndene på vores assay-plader, så vi kan lave grafer, hvor vi har absorptions som funktion af koncentration af BPA. Vi benytter følgende formel til at udregne de forskellige koncentrationer.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

- C_1 er startkoncentrationen
- V_1 er startvolumen
- C_2 er slutkoncentration
- V_2 er slutvolumen

Da vi regner på slutkoncentration omskrives formelen:

$$C_2 = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2}$$

Vi starter med at regne fra højeste koncentration, hvilket er i række H, da vi kender koncentrationen her, som er 5500 µg/L. Den er dog fast her, da vi bare overfører 73 µL direkte fra vores mellemfortynding af BPA på 5500 µg/L.

Række H

- $C_1 = 5500 \text{ µg/L}$, hvilket er koncentrationen mellemfortyndingen

Række G

- $C_1 = 5500 \mu\text{g/L}$, hvilket er koncentrationen i brønd H
- $V_1 = 23 \mu\text{L}$, den mængde volumen som tages op af brønd H
- $V_2 = 50 \mu\text{L}$, det endelige volumen i brønd G, 23 μL opløsning fra H og 50 μL ethanol 96 %, men der tages 23 fra igen.
- $C_2?$, hvilket er koncentrationen af BPA i brønden efter tilsætning af det.

$$C_2 = \frac{5500 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \cdot 23 \mu\text{L}}{50 \mu\text{L}} = 2530 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$$

- $C_2 = 2530 \mu\text{g/L}$

Dette gentages op til kolonne A, hvor C_1 er koncentrationen fra forrige brønd, men V_1 og V_2 er det samme for alle fortyndinger.

	Koncentration BPA-fortyndingsplade, række A-H;6
A	24 $\mu\text{g/L}$
B	52 $\mu\text{g/L}$
C	113 $\mu\text{g/L}$
D	246 $\mu\text{g/L}$
E	535 $\mu\text{g/L}$
F	1164 $\mu\text{g/L}$
G	2530 $\mu\text{g/L}$
H	5500 $\mu\text{g/L}$

BPA koncentration på assayplader

Nu regnes koncentrationerne af BPA i assay-pladerne. Vi overfører BPA fra brønd H;6 på fortyndingspladen til H;3-5 på assaypladerne, hvilket er ens for alle 4 fire assayplader. Vi benytter samme metode som for fortyndingsrækken.

Række H

- $C_1 = 5500 \mu\text{g/L}$, hvilket er koncentrationen i brønd H;6 på fortyndingsplade
- $V_1 = 2 \mu\text{L}$, den mængde volumen som tages op af brønd H;6
- $V_2 = 204 \mu\text{L}$, det endelige volumen i brønd G;3-5: 100 μL assay medium, 2 μL DMSO, 100 μL gærcelekultur og 2 μL BPA.
- $C_2?$, hvilket er koncentrationen af BPA i brønden efter tilsætning af det.

$$C_2 = \frac{5500 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \cdot 2 \mu\text{L}}{204 \mu\text{L}} = 53 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$$

Række G

- $C_1 = 53 \mu\text{g/L}$, hvilket er koncentrationen i brønd G;6 på fortyndingsplade
- $V_1 = 2 \mu\text{L}$, den mængde volumen som tages op af brønd G;6
- $V_2 = 204 \mu\text{L}$, det endelige volumen i brønd G;3-5: 100 μL assay medium, 2 μL DMSO, 100 μL gærcelekultur og 2 μL BPA.
- $C_2?$, hvilket er koncentrationen af BPA i brønden efter tilsætning af det.

$$C_2 = \frac{53 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \cdot 2 \mu\text{L}}{204 \mu\text{L}} = 24 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$$

Vi gør det samme for de resterende rækker A-F;6 fra fortyndingsplade til A-F;3-5 på assaypladerne.

	Koncentration af BPA i assay-plader række A-H;3-5
A	0,24 µg/L
B	0,51 µg/L
C	1,11 µg/L
D	2,41 µg/L
E	5,25µg/L
F	11,4 µg/L
G	24,8 µg/L
H	53,9 µg/L

Absorbans for BPA rækker:

YES agonist OD₅₇₀ (d. 20/5-16):

C (BPA) (µg/L)	Abs ₅₇₀ (BPA)	Abs ₅₇₀ (BPA)	Abs ₅₇₀ (BPA)
0,24	0,78	0,624	0,816
0,51	0,652	0,535	0,615
1,11	0,826	0,872	0,553
2,41	0,724	0,675	0,753
5,25	0,891	0,874	0,688
11,4	0,736	0,728	0,694
24,8	0,79	0,805	0,79
53,9	0,78	0,674	0,749

YAS agonist OD₅₇₀ (d. 20/5-16):

C (BPA) (µg/L)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)
0,24	0,824	0,857	0,915
0,51	0,676	0,824	0,777
1,11	0,888	0,83	0,882
2,41	0,837	0,899	0,907
5,25	0,858	0,898	0,871
11,4	0,892	0,865	0,802
24,8	0,885	0,918	0,855
53,9	0,823	0,741	0,737

YES antagonist OD₅₇₀ (d. 20/5-16):

C (BPA) (µg/L)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)
0,24	1,973	2,147	2,548
0,51	2,013	2,426	2,509
1,11	2,111	2,495	2,783
2,41	2,192	2,765	2,261
5,25	2,253	2,85	2,64

11,4	2,225	2,61	2,403
24,8	2,252	2,564	2,275
53,9	2,335	2,362	2,524

YAS antagonist OD₅₇₀ (d. 20/5-16):

C (BPA) (µg/L)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)	Abs OD ₅₇₀ (BPA)
0,24	1,987	1,413	1,516
0,51	1,376	1,564	1,452
1,11	1,373	1,458	1,369
2,41	1,428	1,561	1,278
5,25	1,425	1,412	1,623
11,4	1,505	1,483	1,478
24,8	1,369	1,484	1,385
53,9	1,441	1,56	1,314

Absorbans af kontrol

YES agonist: E2 (20/05-2016).

SC = solvent control

Række	Koncentration E2 (mol/L)	Koncentration E2 (µg/L)	Abs OD ₅₇₀	Abs OD ₅₇₀
A	SC	SC	0,787	0,832
B	1·10 ⁻¹¹	0,0082	0,887	0,874
C	3·10 ⁻¹¹	0,027	1,024	0,713
D	1·10 ⁻¹⁰	0,082	1,247	0,831
E	3·10 ⁻¹⁰	0,272	1,536	1,375
F	1·10 ⁻⁹	0,817	2,757	2,712
G	3·10 ⁻⁹	2,724	2,759	2,547
H	1·10 ⁻⁸	8,171	2,403	2,357

Omregning fra mol/L til g/L

$$c \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) \cdot M \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)$$

M(E2): 272,38 g/mol

$$1 \cdot 10^{-11} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 272,38 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 2,7 \cdot 10^{-9} \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,0027 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$$

YES antagonist: E2 (1·10⁻⁹ M) og HT. (20/05-2016).

M(HT)=387,51 g/mol

Række	Koncentration HT (mol/L)	Koncentration HT (µg/L)	Abs OD ₅₇₀	Abs OD ₅₇₀
A	SC	SC	2,089	2,466
B	$1 \cdot 10^{-8}$	3,875	1,967	2,207
C	$3 \cdot 10^{-8}$	11,625	1,891	1,734
D	$1 \cdot 10^{-7}$	38,751	1,518	1,286
E	$3 \cdot 10^{-7}$	116,253	1,353	1,401
F	$1 \cdot 10^{-6}$	387,51	1,268	1,244
G	$3 \cdot 10^{-6}$	1162,53	1,214	1,256
H	$1 \cdot 10^{-5}$	3875,1	0,136	0,161

YAS-agonist: DHT: (20/05-2016).

Række	Koncentration DHT (M)	Abs OD ₅₇₀	Abs OD ₅₇₀
A	SC	0,762	0,941
B	$1 \cdot 10^{-9}$	1,038	1,032
C	$3 \cdot 10^{-9}$	1,465	1,528
D	$1 \cdot 10^{-8}$	1,677	1,627
E	$3 \cdot 10^{-8}$	1,426	1,483
F	$1 \cdot 10^{-7}$	1,469	1,314
G	$3 \cdot 10^{-7}$	1,516	1,357
H	$1 \cdot 10^{-6}$	1,533	1,411

YAS-antagonist: DHT ($3 \cdot 10^{-8}$ M) og FL (20/05-2016).

Række	Koncentration FL (M)	Abs OD ₅₇₀	Abs OD ₅₇₀
A	SC	1,389	1,562
B	$1 \cdot 10^{-7}$	1,351	1,483
C	$3 \cdot 10^{-7}$	1,333	1,428
D	$1 \cdot 10^{-6}$	1,481	1,359
E	$3 \cdot 10^{-6}$	1,458	1,588
F	$1 \cdot 10^{-5}$	1,444	1,498
G	$3 \cdot 10^{-5}$	1,549	1,531
H	$1 \cdot 10^{-4}$	1,582	1,71