



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

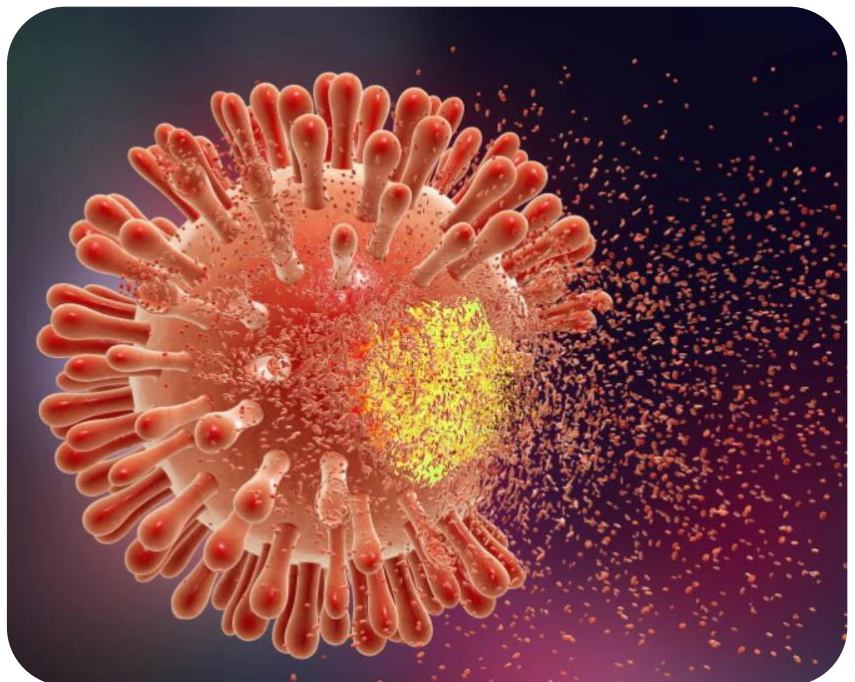
Αθήνα 2023

## Π.Μ.Σ. Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική

Μελέτη κυτταροτοξικότητας της  
Δισφαινόλης S (BPS) στην κυτταρική  
σειρά αναπαραγωγικού ιστού Ishikawa

Διπλωματική Εργασία

Χριστίνα Θεοδώρα Αλεξοπούλου





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

---

Θέμα διπλωματικής εργασίας

---

«Μελέτη κυτταροτοξικότητας της Δισφαινόλης S (BPS) στην  
κυτταρική σειρά αναπαραγωγικού ιστού Ishikawa »

«Cytotoxicity study of Bisphenol S (BPS) in the reproductive  
tissue cell line Ishikawa»

**Χριστίνα Θεοδώρα Αλεξοπούλου**  
**Αθήνα 2023**

**Christina Theodora Alexopoulou**  
**Athens 2023**

*Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης του Γενικού Νοσοκομείου Αλεξάνδρα την ακαδημαϊκή χρονιά 2022-2023 υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της καθηγήτριας Δρ. Μαυρογιάννης Δέσποινας.*

### Τριμελής Επιτροπή

Μαυρογιάννη Δέσποινα (Επιβλέπουσα) : Μοριακή Βιολόγος-Εμβρυολόγος και μέλος Ε.ΔΙ.Π. της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διδάσκουσα στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική», Αθήνα, Ελλάδα

Μαχαιριώτης Νικόλαος : Γυναικολόγος-Μαιευτήρας και Διδάκτωρ του Π.Μ.Σ. «Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική», Αθήνα, Ελλάδα

Σταύρος Σοφοκλής : Γυναικολόγος-Μαιευτήρας και Επίκουρος Καθηγητής του Π.Μ.Σ. «Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική», Αθήνα, Ελλάδα

## Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| <b>I. Περίληψη</b> .....  | 4  |
| <b>II. Abstract</b> .....   | 5  |
| <b>1. Εισαγωγή</b> .....  | 5  |
| 1.1 Γυναικείο Αναπαραγωγικό Σύστημα & Ανατομία .....  | 6  |
| 1.2 Εξωτερικά Γεννητικά Όργανα .....  | 7  |
| 1.3 Εσωτερικά Γεννητικά Όργανα .....  | 9  |
| <b>2. Κυτταροτοξικότητα</b> .....   | 12 |
| 2.1 Τοξικότητα .....  | 12 |
| 2.2 Κυτταροτοξικότητα/Τρόποι πρόκλησης .....  | 13 |
| 2.3 Μέθοδοι αξιολόγησης μέτρησης .....  | 14 |
| 2.4 Αναπαραγωγική (Κυτταρο)Τοξικότητα .....   | 16 |
| 2.5 Παραδείγματα ουσιών .....   | 18 |
| <b>3. Δισφαινόλες</b> .....   | 18 |
| <b>3.1 Δισφαινόλη Α (BPA)</b> .....   | 19 |
| 3.2 Γενικά Χαρακτηριστικά .....   | 19 |
| 3.3 Παραγωγή/Σύνθεση .....  | 19 |
| 3.4 Χρήσεις και Εφαρμογές .....   | 20 |
| 3.5 Επιδράσεις στην Υγεία & στην Αναπαραγωγή .....  | 21 |
| 3.6 Κυτταροτοξικότητα BPA .....   | 23 |
| 3.7 Υποκατάστατα BPA .....  | 23 |
| 3.8 Δισφαινόλη S (BPS) .....  | 24 |
| <b>4. Σκοπός</b> .....  | 26 |
| <b>5. Υλικά και Μεθοδολογία</b> .....   | 27 |
| 5.1 Υλικά .....   | 27 |
| 5.2 Μεθοδολογία .....   | 28 |
| <b>ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</b> .....   | 28 |
| <b>ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ</b> .....   | 30 |
| <b>ΑΛΛΑΓΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ &amp; ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΓΙΑ ΠΕΡΕΤΑΙΡΩ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ</b> ....                                | 30 |
| <b>SPPLITTING-ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</b> .....  | 31 |
| <b>ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΜΕΤΡΗΤΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</b> .....   | 32 |
| <b>ΠΡΟΣΘΗΚΗ BPS ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ</b> .....  | 33 |
| <b>ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ/ΝΙΤΡΩΔΩΝ</b> .....   | 33 |
| <b>6. Αποτελέσματα και Συζήτηση</b> .....   | 34 |
| 6.1 Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων της Δισφαινόλης S (BPS) στην<br>κυτταρική σειρά Ishikawa ..... | 34 |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.2 Έλεγχος της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων μέσω μέτρησης<br>νιτρικών/νιτρωδών ..... | 35        |
| 6.3 Συζήτηση .....   | 36        |
| <b>7. Βιβλιογραφία .....</b>   | <b>39</b> |

## I. Περίληψη

Οι δισφαινόλες είναι προϊόντα της χημικής βιομηχανίας και χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή προϊόντων καθημερινής κατανάλωσης, κυρίως πλαστικών δοχείων τροφίμων και ποτών. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη δισφαινόλη είναι η δισφαινόλη Α (BPA) και έχει πολλές επιβλαβείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Τα τελευταία χρόνια, η δισφαινόλη Σ (BPS) αντικατέστησε την BPA σε διάφορα προϊόντα, θεωρώντας την πιο ασφαλή λύση.

Στην πορεία, αποδείχθηκε ότι είναι πιο τοξική για το αναπαραγωγικό σύστημα από τη BPA και αποδείχθηκε ότι προάγει ορμονικά ορισμένους καρκίνους του μαστού με τον ίδιο ρυθμό με αυτόν της BPA. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική προσπάθεια από την παγκόσμια ερευνητική κοινότητα για την αξιολόγηση της ασφάλειάς της. Επιπλέον, είναι ερευνητικού ενδιαφέροντος η μελέτη της επίδρασής της στις κυτταρικές σειρές, καθώς η αξιολόγηση των *in vitro* αποτελεσμάτων (κυτταροκαλλιέργειες) μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών κυτταροτοξικότητας και στην επιβεβαίωση ή απόρριψη των επιπέδων ασφαλούς χρήσης της.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να μελετήσει την επίδραση της BPS στις κυτταρικές σειρές και να αξιολογήσει την πιθανή κυτταροτοξικότητά της. Από τη διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται ότι η BPS επηρεάζει τις λειτουργίες των τροφοβλαστικών κυττάρων μέσω της οδού του υποδοχέα οιστρογόνου και της πρωτεϊνικής κινάσης (ER/MAPK). Πρόσθετες μελέτες στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 δείχνουν την πιθανή επίδραση της BPS στη διαδικασία μεθυλίωσης και, κατ' επέκταση, στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Για το πειραματικό στάδιο, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις Bisphenol S (100pg/ml, 1000pg/ml), στην κυτταρική σειρά Ishikawa, μια καλά διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινου ενδομητρίου αδενοκαρκινώματος, και αξιολογήσαμε μικροσκοπικά την επίδρασή της. Επιπλέον, μετρήσαμε έμμεσα τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, μετρώντας τα νιτρικά και τα νιτρώδη.

Αποτελέσματα: Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά Ishikawa φαίνεται πως δεν επηρεάζεται από τη BPS σε συγκεντρώσεις 100pg/ml και 1000pg/ml σε χρόνο επώασης 48 ωρών, παρόλο που είναι κυτταροτοξική. Επίσης, παρατηρήσαμε μεταβολική δραστηριότητα η οποία ήταν σε χαμηλά επίπεδα. Αυτά τα αποτελέσματα είναι προκαταρκτικά και θα χρειαστεί επαναληπτικό πείραμα για να επιβεβαιωθεί αυτό.

## II. Abstract

Bisphenols are products of the chemical industry and are widely used in the production of everyday consumer products mainly plastic food and beverage containers. The most widely used bisphenol is bisphenol A (BPA) and it has numerous harmful effects on human health. In the last years, bisphenol S (BPS) replaced BPA in various products, considering it a safer solution.

Along the way, it was shown to be more toxic to the reproductive system than BPA and was shown to hormonally promote certain breast cancers at the same rate as BPA. In recent years, a significant effort has been made by the global research community to assess its safety. In addition, it is of research interest to study its effect on cell lines, as the evaluation of in vitro results (cell cultures) can help to better understand the mechanisms of cytotoxicity and confirm or reject its safe use levels.

The purpose of this thesis is to study the effect of BPS on Ishikawa cell line and to evaluate its potential cytotoxicity. From the international literature it appears that BPS affects the functions of trophoblast cells through the estrogen receptor and protein kinase (ER/MAPK) pathway. Additional studies in the MCF-7 cancer cell line show the potential effect of BPS on the methylation process and, by extension, neoplastic transformation. For the experimental stage, we will use different concentrations of Bisphenol S (0pg/ml, 10pg/ml, 100pg/ml), on the Ishikawa cell line, a well-differentiated human endometrial adenocarcinoma cell line, and microscopically evaluate its effect. In addition, we indirectly measured the metabolic activity of the cells by measuring nitrate and nitrite.

Results: The specific Ishikawa cell line appears not to be affected by BPS at concentrations of 10pg/ml and 100pg/ml at an incubation time of 48 hours, although it is cytotoxic. Also, we observed metabolic activity which was at low levels. These results are preliminary and a repeat experiment will be needed to confirm this.

### 1. Εισαγωγή

Το αναπαραγωγικό σύστημα ενός οργανισμού, γνωστό και ως γεννητικό σύστημα, είναι το βιολογικό σύστημα που αποτελείται από ένα σύνολο οργάνων καθώς και από ένα δίκτυο παραγωγής ουσιών που εκκρίνονται από τον οργανισμό όπως υγρά, ορμόνες και φερομόνες. Η μία και χαρακτηριστική λειτουργία του είναι η αναπαραγωγή των έμβιων όντων, η μόνη που δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ίδιου του οργανισμού αλλά για τη διαίωσιση του είδους. (Jones, 2014). Άλλα συστήματα στο σώμα, όπως το ενδοκρινικό και το ουροποιητικό σύστημα, εργάζονται συνεχώς για να διατηρήσουν την ομοιόσταση, η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ατόμου. Ένα άτομο μπορεί να ζήσει μια μακρά, υγιή και ευτυχισμένη ζωή χωρίς να παράγει απογόνους, αλλά εάν το είδος

πρόκειται να συνεχίσει, τουλάχιστον μερικά άτομα πρέπει να παράγουν απογόνους με τη βοήθεια του αναπαραγωγικού συστήματος. (National Cancer Institute, 2019). Στο πλαίσιο της παραγωγής απογόνων, το αναπαραγωγικό σύστημα έχει τέσσερις λειτουργίες:

Την παραγωγή ωαρίων και σπερματοζωαρίων

Τη μεταφορά και διατήρηση αυτών των κυττάρων

Να αναθρέψει τους αναπτυσσόμενους απογόνους

Να παράγει ορμόνες

(National Cancer Institute, 2019).

Η αναπαραγωγή στον άνθρωπο προϋποθέτει την ύπαρξη δύο φύλων. Το αναπαραγωγικό σύστημα κάθε φύλου έχει ιδιαίτερα ανατομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. (Jones, 2014).

Σε αντίθεση με τα περισσότερα συστήματα οργάνων, τα φύλα των διαφοροποιημένων ειδών έχουν συχνά σημαντικές διαφορές. Αυτές οι διαφορές επιτρέπουν τον συνδυασμό γενετικού υλικού μεταξύ δύο ατόμων, γεγονός που επιτρέπει τη δυνατότητα μεγαλύτερης γενετικής ικανότητας των απογόνων.

Το ανθρώπινο αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνει το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα που λειτουργεί για την παραγωγή και την εναπόθεση σπέρματος καθώς και το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα που λειτουργεί για την παραγωγή ωαρίων και για την προστασία και τη θρέψη του εμβρύου μέχρι τη γέννηση. Αυτές οι λειτουργίες χωρίζονται μεταξύ του πρωτογενούς και του δευτερογενούς ή βοηθητικού αναπαραγωγικού οργάνου.

Τα κύρια όργανα του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος περιλαμβάνουν τα εξωτερικά γεννητικά όργανα (πέος και αιδοίο) καθώς και ορισμένα εσωτερικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των γονάδων (όρχεις και ωοθήκες).

Αυτά τα όργανα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των γαμετών των ωαρίων και των σπερματοζωαρίων καθώς και των ορμονών. Αυτές οι ορμόνες λειτουργούν στην ωρίμανση του αναπαραγωγικού συστήματος, στην ανάπτυξη των σεξουαλικών χαρακτηριστικών και στη ρύθμιση της φυσιολογικής φυσιολογίας του αναπαραγωγικού συστήματος. Όλα τα άλλα όργανα, αγωγοί και αδένες του αναπαραγωγικού συστήματος θεωρούνται δευτερεύοντα ή βοηθητικά αναπαραγωγικά όργανα. Αυτές οι δομές μεταφέρουν και συντηρούν τους γαμέτες και θρέφουν τους αναπτυσσόμενους απογόνους. (National Cancer Institute, 2019).

## 1.1 Γυναικείο Αναπαραγωγικό Σύστημα & Ανατομία

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από μία ομάδα οργάνων που συνεργάζονται για να καταστεί δυνατή η σεξουαλική επαφή, η εμμηνορροια, η αναπαραγωγή, η εγκυμοσύνη και ο τοκετός στις γυναίκες ή στα άτομα που τους



αποδόθηκε το θηλυκό φύλο κατά τη γέννηση (AFAB).

Τα αναπαραγωγικά όργανα έχουν επίσης σημαντική επίδραση και σε άλλες πτυχές της υγείας. Για παράδειγμα, οι ωοθήκες παράγουν ορμόνες που επηρεάζουν την οστική πυκνότητα, τα επίπεδα χοληστερόλης, την υγεία της καρδιάς και τη διάθεση. Στους ανθρώπους, το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα είναι ανώριμο κατά τη γέννηση και ωριμάζει στην εφηβεία για να είναι σε θέση να παράγει γαμέτες και να διατηρήσει ένα έμβρυο μέχρι την πλήρη ολοκλήρωση της γέννησης. (Wikipedia)

Τα όργανα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος χωρίζονται σε εσωτερικά και εξωτερικά γεννητικά όργανα τα οποία λειτουργούν συνεργατικά για την αναπαραγωγή νέων απογόνων και εμπλέκονται στη γονιμότητα, τη σύλληψη, την εγκυμοσύνη και τον τοκετό. (Λουτράδης et al, 2017).

## 1.2 Εξωτερικά Γεννητικά Όργανα

Τα γυναικεία εξωτερικά αναπαραγωγικά όργανα είναι τα δευτερεύοντα όργανα που είναι ορατά εξωτερικά. Το αιδοίο είναι ο παγκόσμιος όρος που περιγράφει όλες τις δομές που δημιουργούν τα εξωτερικά γεννητικά όργανα της γυναίκας. Πολλοί άνθρωποι χρησιμοποιούν λανθασμένα τον όρο «κόλπος» για να περιγράψουν όλα τα γυναικεία αναπαραγωγικά μέρη. Ωστόσο, ο κόλπος είναι η δική του δομή που βρίσκεται μέσα στο γυναικείο σώμα. Οι λειτουργίες των εξωτερικών γεννητικών οργάνων είναι να δρουν ως αισθητήριο ιστός κατά τη σεξουαλική επαφή, να βοηθούν στην ούρηση κατευθύνοντας τη ροή των ούρων και να προστατεύουν τα εσωτερικά μέρη από μολύνσεις. (Λουτράδης et al, 2017).

Τα κύρια μέρη του αιδοίου ή των γυναικείων εξωτερικών γεννητικών οργάνων είναι:

Εφήβαιο, ή όρος της Αφροδίτης: είναι ο λιπώδης ιστός και το δέρμα στην μπροστινή πλευρά του αιδοίου που καλύπτεται από χαρακτηριστικό τρίχωμα και βρίσκεται ακριβώς μπροστά από τα ηβικά οστά. Λειτουργεί ως πηγή αντικραδασμικής προστασίας κατά τη σεξουαλική επαφή και περιέχει επίσης σημηματογόνους αδένες που εκκρίνουν φερομόνες για να προκαλέσουν σεξουαλική έλξη. (Nguyen & Duong, 2022)

Μεγάλα Χείλη: είναι δύο προεξέχουσες διαμήκεις δερματικές πτυχές που θα σχηματίσουν τα πλάγια διαμήκη όρια των αυλακώσεων του αιδοίου. Τα μεγάλα χείλη σχηματίζουν τις πτυχές που καλύπτουν τα μικρά χείλη, την κλειτορίδα, τον προθάλαμο του αιδοίου, τους αιθουσαίους βολβούς, τους αδένες Bartholin, τους αδένες του Skene, την ουρήθρα και το κοιλικό άνοιγμα. Μαζί με τα μικρά χείλη σχηματίζουν τα χείλη του αιδοίου. Περικλείουν και προστατεύουν τα άλλα εξωτερικά αναπαραγωγικά όργανα. Κατά την εφηβεία, η τριχοφυΐα εμφανίζεται στο δέρμα των μεγάλων χειλέων, τα οποία περιέχουν επίσης ιδρωτοποιούς αδένες.



(Nguyen & Duong, 2022)

Μικρά Χείλη: αποτελούν δύο μικρότερες άτριχες πτυχές του δέρματος που βρίσκονται εσωτερικά των μεγάλων χειλέων και μπορεί να έχουν διάφορα μεγέθη και σχήματα. Συντήκονται προς τα εμπρός για να σχηματίσουν την κουκούλα της κλειτορίδας και περιβάλλουν το άνοιγμα προς τον κόλπο (το κανάλι που ενώνει το κάτω μέρος της μήτρας με το εξωτερικό μέρος του σώματος) και την ουρήθρα (τον σωλήνα που μεταφέρει την ούρηση από την ουροδόχο κύστη προς το εξωτερικό του σώματος). (Αντσακλής et al, 2010)

Κλειτορίδα: βρίσκεται στο σημείο που ενώνονται τα άνω άκρα των μικρών χειλέων. Η κλειτορίδα είναι μικρό όργανο, μια μικρή, ευαίσθητη προεξοχή με στυτικό ιστό, όπως το πέος και λειτουργεί ως αισθητήριο όργανο. Η κλειτορίδα μπορεί να χωριστεί στην κλειτοριδική βάλανο και στο σώμα της κλειτορίδας. Η κλειτοριδική βάλανος είναι το μόνο εξωτερικά ορατό τμήμα της κλειτορίδας. Η κλειτοριδική βάλανος νευρώνεται σε μεγάλο βαθμό από τα νεύρα και διαχέεται από πολλά αιμοφόρα αγγεία. Υπολογίζεται ότι η κλειτορίδα νευρώνεται από περίπου οκτώ χιλιάδες νευρικές απολήξεις. (Αντσακλής et al, 2010)

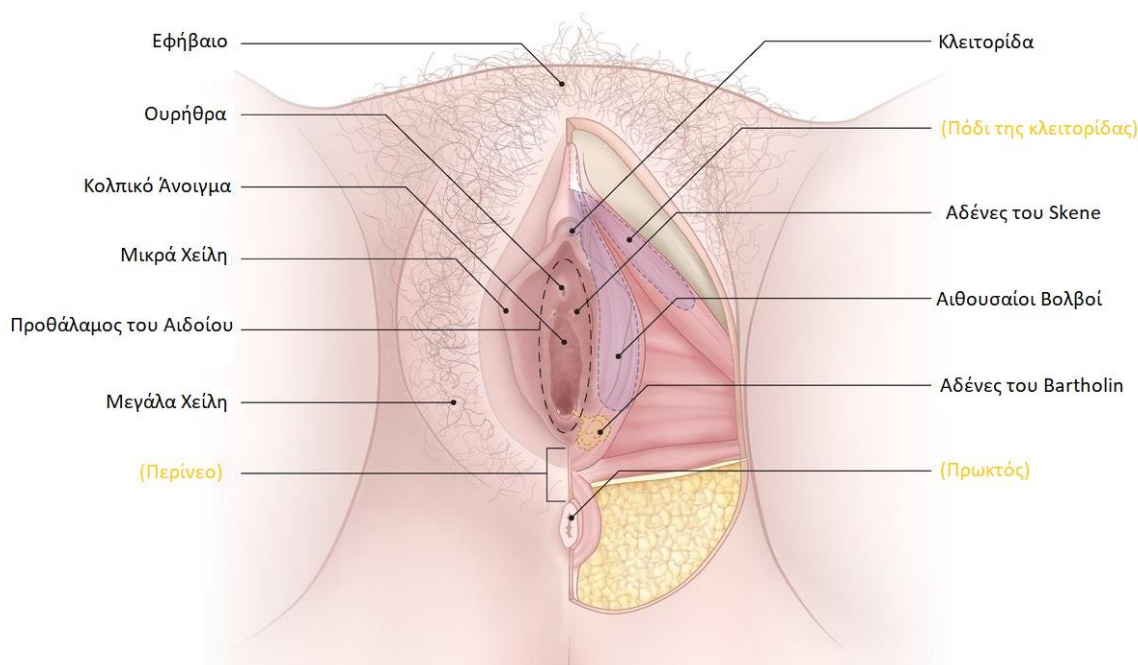
Αιθουσαίοι Βολβοί: είναι δομές που σχηματίζονται από σπογγώδη ιστό του σώματος. Αυτός είναι ένας τύπος στυτικού ιστού που σχετίζεται στενά με την κλειτορίδα. Οι αιθουσαίοι βολβοί ξεκινούν κοντά στην κάτω πλευρά του σώματος της κλειτορίδας και τελικά, οι θα χωριστούν και θα περιβάλλουν το πλάγιο όριο της ουρήθρας και του κόλπου. (Λουτράδης et al, 2017).

Προθάλαμος του Αιδοίου: η περιοχή που περικλείεται από τα μικρά χείλη. Πρόκειται για μια λεία επιφάνεια που ξεκινά ακριβώς κάτω από την κλειτορίδα και καταλήγει κάτω στην οπίσθια κοιλότητα των μικρών χειλέων. Ο προθάλαμος του αιδοίου περιέχει το άνοιγμα προς την ουρήθρα και το κολπικό άνοιγμα. Τα όρια του προθαλάμου του αιδοίου σχηματίζονται από την άκρη των μικρών χειλέων. Υπάρχει μια οριοθέτηση μεταξύ του προθαλάμου του αιδοίου και των μικρών χειλέων που ονομάζεται γραμμές του Hart. Οι γραμμές του Hart προσδιορίζουν την αλλαγή από τον προθάλαμο του αιδοίου στα μικρά χείλη. (Αντσακλής et al, 2010)

Αδένες του Bartholin: είναι δύο αδένες μεγέθους μπιζελιού που βρίσκονται ελαφρώς πλάγια και πίσω από το άνοιγμα του κόλπου. Αυτοί οι δύο αδένες λειτουργούν για να εκκρίνουν μια ουσία που μοιάζει με βλέννα στον κόλπο και εντός των ορίων των μικρών χειλέων. Αυτή η βλέννα λειτουργεί ως λιπαντικό για τη μείωση της τριβής κατά τη σεξουαλική επαφή και ως ενυδατικό για τον αιδοίο. (Λουτράδης et al, 2017).

Αδένες του Skene: είναι δύο αδένες που βρίσκονται εκατέρωθεν της ουρήθρας. Αυτοί οι αδένες πιστεύεται ότι εκκρίνουν μια ουσία για τη λίπανση του ανοίγματος της ουρήθρας. Αυτή η ουσία πιστεύεται επίσης ότι δρα ως αντιμικροβιακό. Αυτό το αντιμικροβιακό χρησιμοποιείται για την πρόληψη λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Η λειτουργία του αδένα του Skene δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά πιστεύεται ότι είναι η πηγή της γυναικείας εκσπερμάτισης κατά τη σεξουαλική διέγερση. (Αντσακλής et al, 2010)

Ουρήθρα: Η ουρήθρα είναι μια επέκταση ενός σωλήνα από την ουροδόχο κύστη προς το εξωτερικό του σώματος. Ο σκοπός της ουρήθρας είναι η απέκκριση των ούρων. Η ουρήθρα στις γυναίκες ανοίγει μέσα στον προθάλαμο του αιδοίου που βρίσκεται κάτω από την κλειτορίδα, αλλά πάνω από το άνοιγμα του κόλπου. (Λουτράδης et al, 2017).



Εικόνα 1. Ανατομία Γυναικείων Εξωτερικών Οργάνων (Female Reproductive Organs, n.d.)

Κολπικό Άνοιγμα: είναι η επέκταση του κόλπου, βρίσκεται πίσω από το άνοιγμα της ουρήθρας και επιτρέπει στο αίμα της περιόδου και στα μωρά να βγουν από το γυναικείο σώμα. Το άνοιγμα του κόλπου συνήθως καλύπτεται εν μέρει από ένα κομμάτι λεπτού ευαίσθητου ιστού που ονομάζεται παρθενικός υμένας. (Nguyen & Duong, 2022)

### 1.3 Εσωτερικά Γεννητικά Όργανα

Τα γυναικεία εσωτερικά αναπαραγωγικά όργανα είναι τα πρωτεύοντα όργανα που δεν είναι ορατά εξωτερικά. Τα εσωτερικά γυναικεία γεννητικά όργανα σχηματίζουν

μια οδό, την εσωτερική γυναικεία γεννητική οδό, που αποτελείται από τον κόλπο, τη μήτρα, τις σάλπιγγες και τις ωοθήκες. Η εσωτερική γυναικεία ανατομία ξεκινά από τον κόλπο, που είναι το κανάλι το οποίο οδηγεί από το αιδοίο στη μήτρα. Ο τράχηλος διαχωρίζει τον κόλπο από τη μήτρα και οι σάλπιγγες συνδέουν τις ωοθήκες με τη μήτρα. (Λουτράδης et al, 2017).

Κόλπος: Είναι ένας διατάσιμος μυϊκός σωλήνας που ενώνει τον τράχηλο (το κάτω μέρος της μήτρας) με το εξωτερικό του σώματος. Ο κόλπος (αλλά και η μήτρα) βρίσκεται πίσω από την ουρήθρα και την ουροδόχο κύστη και μπροστά από το ορθό και τον πρωκτό. Είναι επενδεδυμένος με βλεννογόνους που τον βοηθούν να διατηρείται υγρός. Ο κόλπος εκτελεί πληθώρα λειτουργιών στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Διευκολύνει την έμμηνο ρύση (χρησιμεύει ως κανάλι για να φύγουν τα υγρά και οι ιστοί της περιόδου από το σώμα), τον τοκετό (επεκτείνεται για να παρέχει ένα κανάλι για τη γέννηση ενός νεογνού από τη μήτρα) και τη σεξουαλική επαφή (δέχεται το πέος και την εκσπερμάτιση, βοηθώντας στη μεταφορά του στη μήτρα). Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη γυναικεία σεξουαλικότητα και σεξουαλική ευχαρίστηση. (Αντσακλής et al, 2010)

Τράχηλος της μήτρας: είναι το κατώτερο τμήμα της μήτρας, ένα όργανο της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού. Είναι μια κυλινδροειδής περιοχή ιστού που συνδέει τον κόλπο με το κύριο σώμα της μήτρας, λειτουργώντας ως πύλη μεταξύ τους. Περίπου το ήμισυ του μήκους του είναι ορατό, το υπόλοιπο βρίσκεται πάνω από τον κόλπο εκτός θέασης. Μια τρύπα στη μέση επιτρέπει στο σπέρμα να εισέλθει και στο αίμα της περιόδου να βγει. Ο τράχηλος της μήτρας ανοίγει (διαστέλλεται) για να επιτρέψει σε ένα μωρό να βγει κατά τη διάρκεια ενός κοιλιακού τοκετού. Ανατομικά και ιστολογικά, ο τράχηλος της μήτρας διακρίνεται από τη μήτρα και ως εκ τούτου τον θεωρούμε ως ξεχωριστή ανατομική δομή. (Λουτράδης et al, 2017).

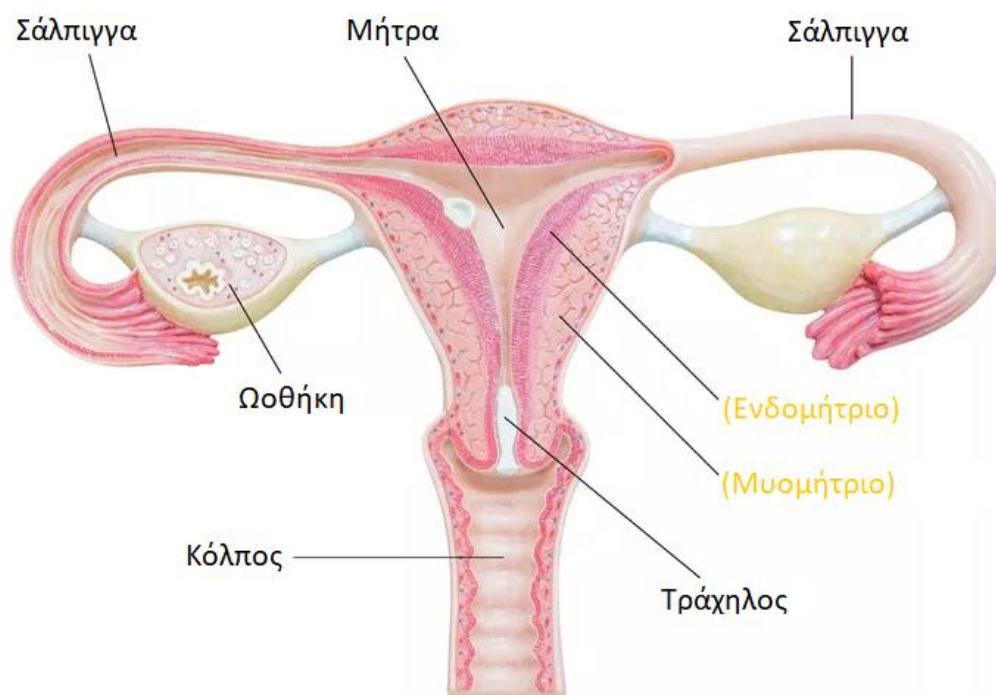
Μήτρα: είναι το κύριο γυναικείο αναπαραγωγικό όργανο. Είναι ένα μυϊκό όργανο με παχύ τοίχωμα ικανό να επεκταθεί για να φιλοξενήσει ένα αναπτυσσόμενο έμβρυο. Παρέχει μηχανική προστασία, διατροφική υποστήριξη και απομάκρυνση λυμάτων για το αναπτυσσόμενο έμβρυο (εβδομάδες 1 έως 8) και το κύημα (από την εβδομάδα 9 έως τον τοκετό). (Wikipedia). Συνδέεται περιφερικά με τον κόλπο και το άνω τμήμα της συνδέεται με τις ωοθήκες μέσω των σαλπίγγων. Βρίσκεται στη μέση της πυελικής κοιλότητας. Αυτός ο μυϊκός σάκος θα στεγάσει το έμβρυο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η μήτρα αποτελείται από τρία μέρη: τον θόλο (κορυφή της μήτρας, πάνω από το σημείο εισόδου των μητρικών σωλήνων.), το σώμα (συνήθης θέση για την εμφύτευση της βλαστοκύστης) και τον τράχηλο. Το σώμα είναι το μεγαλύτερο μέρος της μήτρας που διαστέλλεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Αποτελείται από πολλά ανατομικά μέρη, όπως ο τράχηλος, ο ισθμός και το σώμα. Ενώ η ανατομία της ακούγεται απλή, η ιστολογία της είναι πιο

περίπλοκη. Αποτελείται από τρία κύρια στρώματα, αλλά η ακριβής ιστολογική δομή εξαρτάται από την φάση του ενδομήτριου κύκλου. Κατά τη διάρκεια του μηνιαίου εμμηνορρυσιακού κύκλου μιας γυναίκας, η επένδυση της μήτρας πυκνώνει με αίμα ως προετοιμασία για την απελευθέρωση ενός ωαρίου από μια από τις ωοθήκες. Αυτό γίνεται για να προετοιμαστεί ένα θρεπτικό περιβάλλον για ένα έμβρυο εάν συμβεί εγκυμοσύνη. Εάν δεν συμβεί εγκυμοσύνη, η επένδυση της μήτρας απορρίπτεται. (Αντσακλής et al, 2010)

Σάλπιγγες: είναι δύο μυώδεις σωλήνες σε σχήμα J που οδηγούν από τις ωοθήκες στη μήτρα και αποτελούνται από επενδυμένους επιθήλιους ιστούς. Παρέχουν μια θέση για γονιμοποίηση και η κύρια λειτουργία τους είναι να βοηθούν στη μεταφορά του ωαρίου από τις ωοθήκες στο σώμα της μήτρας. Κατά την ωρίμανση ενός ωαρίου, ο θύλακας και το τοίχωμα των ωοθηκών σπάνε, επιτρέποντας στο ωάριο να διαφύγει και να εισέλθει στη σάλπιγγα. Εκεί ταξιδεύει προς τη μήτρα, ωθούμενο από κινήσεις της βλεφαρίδας στην εσωτερική επένδυση των σαλπίγγων. Αυτό το ταξίδι διαρκεί ώρες ή ημέρες. Εάν το ωάριο γονιμοποιηθεί ενώ βρίσκεται στη σάλπιγγα, τότε συνήθως εμφυτεύεται στο ενδομήτριο όταν φτάνει στη μήτρα, το οποίο σηματοδοτεί την έναρξη της εγκυμοσύνης. Εάν ένα γονιμοποιημένο ωάριο εμφυτευτεί στη σάλπιγγα, οι γιατροί το αποκαλούν έκτοπη ή εξωμήτριο κύηση. Μια έκτοπη κύηση είναι μια επείγουσα ιατρική κατάσταση επειδή η σάλπιγγα μπορεί να σπάσει. (Αντσακλής et al, 2010)

Ωοθήκες: είναι μικροί, ωοειδούς σχήματος γεννητικοί αδένες που συνδέονται με τις σάλπιγγες στην αριστερή και τη δεξιά πλευρά της μήτρας. Κάθε ωοθήκη έχει περίπου το μέγεθος ενός αμυγδάλου. Το μέγεθος της μεταβάλλεται ανάλογα με το σε ποια ωοθήκη θα γίνει ωοθυλακιορρηξία αλλά και σε ποια φάση του έμμηνου κύκλου βρίσκεται. (Wikipedia) Αποτελούν τις γυναικείες γονάδες. Και στους άντρες και στις γυναίκες, οι γονάδες αναπτύσσονται εντός του μεσόνεφρου και κατεβαίνουν μέσω της κοιλιάς. Ωστόσο, σε αντίθεση με τους όρχεις, οι ωοθήκες σταματούν στη λεκάνη. Η κύρια λειτουργία τους είναι αναπαραγωγική και αποτελεί την παραγωγή ωοκυττάρων (θηλυκοί γαμέτες) κατά την προετοιμασία για γονιμοποίηση. Έχουν επίσης και ενδοκρινική λειτουργία, παράγοντας στεροειδείς ορμόνες του φύλου οιστρογόνο και προγεστερόνη, ως απόκριση στις

γοναδοτροπίνες της υπόφυσης (LH και FSH). (Λουτράδης et al, 2017).



Εικόνα 2. Ανατομία Γυναικείων Εσωτερικών Οργάνων (Boskey, 2020)

## 2. Κυτταροτοξικότητα

### 2.1 Τοξικότητα

Με την ταχεία και συνεχή εξέλιξη της Ιατρικής και ερευνητικής επιστήμης, πολλές ουσίες έχει αποδεχθεί ότι έχουν τοξική δράση. Μερικές είναι πιο τοξικές από άλλες και είναι ζωτικής σημασίας να γνωρίζουμε τις επιπτώσεις και πόσο σοβαρά μπορούν να επηρεάσουν έναν οργανισμό. Η τοξικότητα ορίζεται ως η ιδιότητα μιας χημικής ουσίας ή ενός συγκεκριμένου μείγματος ουσιών να είναι τοξική ή δηλητηριώδης και τελικά να προκαλέσει βλάβη σε έναν οργανισμό. Πρόκειται για την ιδιότητα ορισμένων φυσικών ή συνθετικών ουσιών να έχουν τοξική δράση σε οργανισμούς μετά από πρόσληψή τους. Η τοξικότητα μπορεί να αναφέρεται στην επίδραση σε έναν ολόκληρο οργανισμό, όπως ένα ζώο, βακτήριο ή φυτό, καθώς και στην επίδραση σε μια υποδομή του οργανισμού, όπως ένα κύτταρο (κυτταροτοξικότητα) ή ένα όργανο όπως το ήπαρ (ηπατοτοξικότητα). Υπάρχουν γενικά πέντε είδη τοξικότητας: χημικές, βιολογικές, φυσικές, ραδιενεργές και συμπεριφορικές. Μία τοξική ουσία μπορεί να εισέλθει στον οργανισμό με τρεις τρόπους: Με απορρόφηση μέσω του πεπτικού συστήματος, μέσω της αναπνοής ή μέσω του δέρματος. Σε συνέχεια αποθηκεύεται, αποβάλλεται ή μετατρέπεται σε κάποια άλλη ουσία (βιομεταλλαγή). Ο βαθμός τοξικότητας είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της τοξικής ουσίας, τη συνύπαρξη με άλλες ουσίες που επηρεάζουν τη δράση της, τα χαρακτηριστικά και τη φυσιολογία του οργανισμού. Η τοξικότητα

μιας ουσίας μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες, όπως η οδός χορήγησης (αν η τοξική ουσία εφαρμόζεται στο δέρμα, καταπίνεται, εισπνέεται, ενέθηκε), ο χρόνος έκθεσης (σύντομος ή μακροχρόνιος), ο αριθμός των εκθέσεων (μία δόση ή πολλαπλές δόσεις με την πάροδο του χρόνου), τη φυσική μορφή της τοξικής ουσίας (στερεό, υγρό, αέριο), τη γενετική σύνθεση ενός ατόμου, τη συνολική υγεία του ατόμου και άλλα. Η τοξικότητα είναι συγκεκριμένη για κάθε είδος, γεγονός που καθιστά την ανάλυση μεταξύ των ειδών προβληματική. (Timbrell, 2019).

## 2.2 Κυτταροτοξικότητα/Τρόποι πρόκλησης

Η τοξικότητα είναι ένας γενικότερος όρος για το πόσο επιβλαβής είναι μια ουσία για έναν οργανισμό, ενώ η κυτταροτοξικότητα είναι ο όρος για το πόσο τοξική είναι μια ουσία συγκεκριμένα για τα κύτταρα. Η κυτταροτοξικότητα αναφέρεται στην ικανότητα ορισμένων χημικών ουσιών ή κυττάρων μεσολαβητών να καταστρέφουν τα ζωντανά κύτταρα. Η κυτταροτοξικότητα είναι πολύ σημαντική, καθώς η καταστροφή υγιών ζωντανών κυττάρων γύρω από το τραύμα θα έχει αρνητικό αντίκτυπο στη διαδικασία επούλωσης. Μια κυτταροτοξική ένωση μπορεί να προκαλέσει σε υγιή ζωντανά κύτταρα είτε νέκρωση (τυχαίος κυτταρικός θάνατος) ή απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος είναι πιο αργός, πιο μεθοδικός και ελέγχεται γενετικά, ενώ τα κύτταρα που θα υποστούν νέκρωση, χάνουν γρήγορα την ακεραιότητα της μεμβράνης τους και πεθαίνουν γρήγορα ως αποτέλεσμα κυτταρικής λύσης.

Μπορεί να προκληθεί από χημικά ερεθίσματα, έκθεση σε άλλα κύτταρα (NK ή T κύτταρα για παράδειγμα) ή φυσικές/περιβαλλοντικές συνθήκες (έκθεση σε ακτινοβολία, ακραίες θερμοκρασίες ή πίεση κ.λπ.). (Çelik, 2018).

- Η χημική τοξικότητα μπορεί να προκύψει από τη διαταραχή συγκεκριμένων βιομοριακών λειτουργιών ή μέσω πιο γενικευμένου κυτταρικού στρες και διαδικασιών που προκαλούνται από την κυτταροτοξικότητα. Η χημική τοξικότητα μπορεί να εμφανιστεί με πολλούς τρόπους, αλλά υποθέτουμε ότι μπορεί να ταξινομηθεί ευρέως σε δύο μεγάλες κατηγορίες:
  - 1) Μέσω της διαταραχής συγκεκριμένων βιομοριακών στόχων ή μονοπατιών (π.χ. επιδράσεις αγωνιστή/ανταγωνιστή υποδοχέα και ενεργοποίηση/αναστολή ενζύμου)
  - 2) Μέσω γενικής διαταραχής του κυτταρικού μηχανισμού που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό στρες και κυτταροτοξικότητα (Judson et al., 2016)
- Τα κυτταροτοξικά T κύτταρα και τα φυσικά κύτταρα φονιάς (NK) είναι οι κύριοι μεσολαβητές της κυτταροτοξικότητας μέσω έκθεσης σε άλλα κύτταρα. Το ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιεί αυτόν τον τρόπο ως ένα μηχανισμό δράσης για την καταπολέμηση των ιογενών λοιμώξεων

(εξουδετέρωση ενδοκυττάρων παθογόνων συμπεριλαμβανομένων των ιών και ορισμένων βακτηρίων και παρασίτων) και του καρκίνου(εξουδετέρωση καρκινικών κυττάρων). Τα παθογόνα μόλις εισέλθουν στα κύτταρα δεν είναι προσβάσιμα στα αντισώματα και μπορούν να εξαλειφθούν μόνο με την καταστροφή ή την τροποποίηση των μολυσμένων κυττάρων από τα οποία εξαρτώνται. (Janeway et al., 2019)

Τα κυτταροτοξικά CD8 T κύτταρα είναι απαραίτητα για την άμυνα του ξενιστή έναντι παθογόνων που ζουν στο κυτταρόπλασμα. Μπορούν να σκοτώσουν οποιοδήποτε κύτταρο που φιλοξενεί τέτοια παθογόνα αναγνωρίζοντας ξένα πεπτίδια που μεταφέρονται στην κυτταρική επιφάνεια συνδεδεμένα με μόρια MHC τάξης I. Μπορούν να επιτύχουν το θάνατο μέσω πολλών μονοπατιών. Τα κυτταροτοξικά T κύτταρα σκοτώνουν μολυσμένους στόχους με μεγάλη ακρίβεια, γλυτώνοντας γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα. Αυτή η ακρίβεια είναι κρίσιμη για την ελαχιστοποίηση της βλάβης των ιστών. (Janeway et al., 2019)

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα φυσικά κύτταρα φονιάς (NK) είναι κυτταροτοξικά έμφυτα λεμφοκύτταρα που μπορούν να προκαλέσουν λύση σε καρκινικά ή σε μολυσμένα από ιούς κύτταρα, χωρίς τη μεσολάβηση των μορίων MHC. Η δραστηριότητά τους ρυθμίζεται από μια ποικιλία υποδοχέων που κωδικοποιούνται από τη βλαστική σειρά, η οποία μπορεί να στείλει είτε ενεργοποιητικά είτε ανασταλτικά σήματα και έτσι να γίνει απόκριση NK κυττάρων ενώ παράλληλα εξασφαλίζεται και η αυτοανοχή. Τα κύτταρα NK διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς που θα δεσμευτούν στο αντίσωμα, προκαλώντας το κύτταρο NK να απελευθερώσει πρωτεΐνες οι οποίες αναγκάζουν τη λύση του μολυσμένου κυττάρου ώστε να εμποδίσουν την εξάπλωση του ιού. (Torham & Hewitt, 2009).

- Οι φυσικοί/περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικό τραυματισμό περιλαμβάνουν μηχανικό τραύμα, ακραίες θερμοκρασίες (εγκαύματα και βαθύ κρύο), ξαφνικές αλλαγές στην ατμοσφαιρική πίεση, ακτινοβολία και ηλεκτροπληξία. (Çelik, 2018).

## 2.3 Μέθοδοι αξιολόγησης μέτρησης

Ορισμένες ουσίες είναι πιο κυτταροτοξικές από άλλες, και οι ερευνητές στοχεύουν να μετρήσουν τα επίπεδα κυτταροτοξικότητας μιας χημικής ουσίας για να διασφαλίσουν ότι δεν είναι επιβλαβής ή/και θανατηφόρος για τους ασθενείς. Η κυτταροτοξικότητα είναι μια από τις πιο σημαντικές μεθόδους βιολογικής αξιολόγησης καθώς έχει μια σειρά από πλεονεκτήματα. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις πληροφορίες, η ικανότητα ακριβούς μέτρησης της κυτταροτοξικότητας μπορεί να αποδειχθεί πολύτιμο εργαλείο για τον εντοπισμό ενώσεων που ενδέχεται να θέτουν ορισμένους κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου.

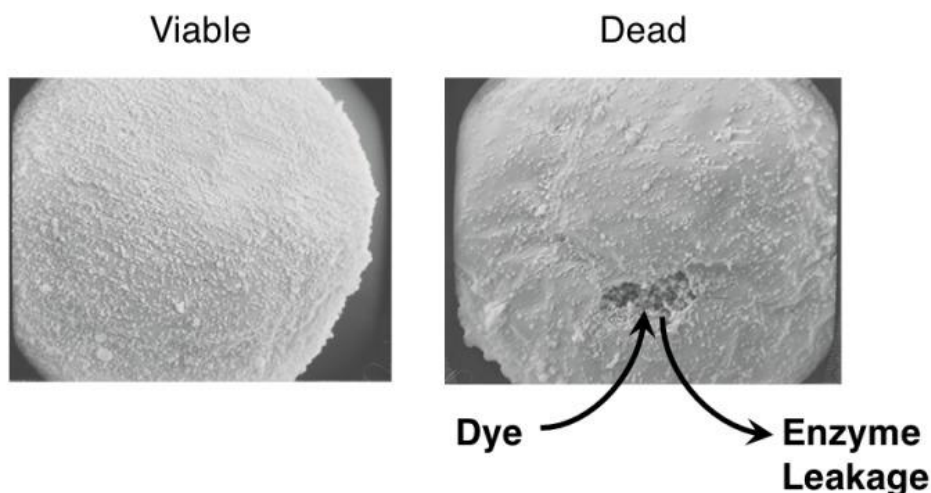


Αυτό μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας κατά τη φάση της έρευνας για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ή καλλυντικών προϊόντων. Η ελάχιστη έως καθόλου τοξικότητα είναι απαραίτητη για την επιτυχή ανάπτυξή τους. Η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας των κυττάρων αποδεικνύεται επίσης αρκετά σημαντική στη διαδικασία ανάπτυξης θεραπευτικών αντικαρκινικών φαρμάκων. Καθορίζοντας τα επίπεδα κυτταροτοξικότητας των καρκινικών κυττάρων, τα αντικαρκινικά φάρμακα μπορούν να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων-στόχων είτε αλλοιώνοντας το γενετικό τους υλικό είτε μπλοκάροντας τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται τα κύτταρα για να επιβιώσουν. (Riss, 2019). Επιπλέον, η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην κυτταροτοξικότητα μπορεί επίσης να δώσει στους ερευνητές μια πιο εις βάθος γνώση σχετικά με τις βιολογικές διεργασίες (τόσο φυσιολογικές όσο και μη φυσιολογικές) που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον θάνατο. (Celik, 2018).

Οι δοκιμές κυτταροτοξικότητας *in vitro* μετρούν εάν μια υπό δοκιμή ένωση είναι τοξική για τα κύτταρα σε καλλιέργεια, συνήθως προσδιορίζοντας τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων που απομένουν μετά από μια καθορισμένη περίοδο επώασης. Οι περισσότερες κυτταροτοξικές αναλύσεις βασίζονται στην προϋπόθεση ότι ένα κύτταρο που πεθαίνει έχει μια υποβαθμισμένη κυτταρική μεμβράνη, που οδηγεί στην απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών συστατικών του στο περιβάλλον μέσο. (Riss et al., 2011). Η ανίχνευση των νεκρών κυττάρων επιτυγχάνεται με τη μέτρηση της κίνησης των μορίων είτε προς τα μέσα είτε προς τα έξω από τα κύτταρα με μη ακέραίες μεμβράνες, οι οποίες δεν μπορούν να επισκευαστούν. Μια κύρια κατηγορία μορίων που χρησιμεύουν ως δείκτες νεκρών κυττάρων περιλαμβάνει δείκτες που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα βιώσιμων κυττάρων, αλλά διαρρέουν στο περιβάλλον μέσο της καλλιέργειας μετά την απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης. Αυτοί οι δείκτες μπορεί να υπάρχουν φυσικά, όπως ένα ένζυμο(πρωτεάση), μία οργανική ένωση(ATP) ή να εισαχθούν τεχνητά, όπως η φόρτωση ραδιενεργού χρωμίου (51Cr) ή ενός φθορίζοντος δείκτη σε βιώσιμα κύτταρα. (Riss et al., 2004). Μια δεύτερη κατηγορία μορίων που χρησιμεύουν ως δείκτες των νεκρών κυττάρων αναφέρονται ως «ζωτικές χρωστικές ουσίες». Αυτές οι χρωστικές συνήθως δεν είναι διαπερατές σε βιώσιμα κύτταρα, αλλά μπορούν να εισέλθουν στα νεκρά κύτταρα μέσω των κατεστραμμένων μεμβρανών. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το μπλε τρυπάνης, χρωστικές φορμαζάνης και πολλές φθορογόνες χρωστικές που δεσμεύουν το DNA. Η προσθήκη αυτών των μορίων σε κύτταρα σε καλλιέργεια έχει ως αποτέλεσμα την επιλεκτική χρώση των νεκρών κυττάρων. (Riss et al., 2004).

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3) απεικονίζει ηλεκτρονικές μικρογραφίες σάρωσης απομονωμένων ηπατοκυττάρων αρουραίου. Αριστερά είναι ένα άθικτο ζωντανό κύτταρο και δεξιά ένα νεκρό κύτταρο με μια κατεστραμμένη μεμβράνη. Η απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης επιτρέπει τη διαρροή δεικτών νεκρών κυττάρων όπως τα ένζυμα από το κυτταρόπλασμα στο περιβάλλον μέσο καλλιέργειας αλλά

και τη διείσδυση υλικών (ζωτικές χρωστικές) που κανονικά είναι μη διαπερατά στα ζωντανά κύτταρα.



Εικόνα 3. Ηλεκτρονικές μικρογραφίες σάρωσης απομονωμένων ζωντανών και νεκρών ηπατοκυττάρων αρουραίου (Riss et al., 2004).

Ωστόσο, η κυτταροτοξική δραστηριότητα μπορεί να υποτιμηθεί. Αυτό συμβαίνει επειδή η απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης εμφανίζεται αργότερα στην κυτταροτοξική διαδικασία. Για να αποφευχθεί αυτό, έχουν αναπτυχθεί πρόσφατα εναλλακτικές μη ραδιενεργές βιοδοκιμές. Αυτές μετρούν την κυτταροτοξικότητα τόσο σε πολλαπλασιαζόμενους όσο και σε μη πολλαπλασιαζόμενους πληθυσμούς κυττάρων. Η μέτρηση των ενώσεων που διαρρέουν από τα κύτταρα στα οποία έχουν υποβαθμισμένη κυτταρική μεμβράνη, επιτρέπει την ανίχνευση αυτών των κυττάρων μεταξύ υγιών, βιώσιμων κυττάρων. (Adan et al., 2016).

Το τεστ κυτταροτοξικότητας είναι ένας από τους σημαντικότερους δείκτες του συστήματος βιολογικής αξιολόγησης *in vitro* για την παρατήρηση της κυτταρικής ανάπτυξης, της αναπαραγωγής, καθώς και των μορφολογικών επιδράσεων από χημικές ουσίες και τέλος με την πρόοδο της σύγχρονης κυτταρικής βιολογίας. Για τον λόγο αυτό, οι πειραματικές μέθοδοι για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας αναπτύσσονται και βελτιώνονται συνεχώς. (Çelik, 2018).

## 2.4 Αναπαραγωγική (Κυτταρο)Τοξικότητα

Η αναπαραγωγική τοξικότητα έχει οριστεί ως «οποιαδήποτε επίδραση χημικών, φυσικών ή βιολογικών παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν δυσμενώς την αναπαραγωγική ικανότητα ή δυναμικό τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών ατόμων», με επακόλουθες επιπτώσεις στη γαλουχία και την ανάπτυξη των απογόνων. (Toragall et al., 2022).

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι αναπαραγωγικές τοξίνες παράγουν την επίδρασή

τους είναι πολύ περίπλοκος, αλλά συνήθως εμφανίζεται κατά την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό, την απέκκριση και την επιδιόρθωση. Με άλλα λόγια, ο τοξικός παράγοντας εισέρχεται στο σώμα και διαταράσσει τη μεταφορά υλικού, τη μεταφορά ενέργειας και τη μεταφορά πληροφοριών μεταξύ των κυττάρων. εμποδίζοντας τα κύτταρα, τα όργανα και τα συστήματα να λειτουργούν κανονικά. (Park, 2020).

Η αναπαραγωγική τοξικότητα υποδιαιρείται σε δύο κύριες ενότητες:

## 1) Δυσμενείς επιπτώσεις στην αναπαραγωγική ικανότητα ή δυναμικό

### 1α) Αναπαραγωγικοί τοξικοί παράγοντες στις γυναίκες

Υπάρχουν έξι συστατικά για τη φυσιολογική κύηση και την αναπαραγωγή: (1) γονιμότητα, (2) σύλληψη, (3) εμφύτευση και προκλινική κύηση, (4) κλινική εγκυμοσύνη και ανάπτυξη του εμβρύου, (5) γέννηση και (6) μεταγεννητική ανάπτυξη. Οι παράγοντες γονιμότητας περιλαμβάνουν τον νευρο-ενδοκρινικό γοναδικό άξονα, την ανάπτυξη και την ωορρηξία των ωαρίων και την ανατομική ακεραιότητα για τη διέλευση του σπέρματος και των ωαρίων [16]. Οι δυσμενείς επιπτώσεις σε έναν ή περισσότερους από αυτούς τους τρεις παράγοντες μπορεί να λειτουργήσουν ως παράγοντας αναπαραγωγικής τοξικότητας. (Park, 2020). Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθούν διάφορες επιπτώσεις, όπως δυσμενείς επιπτώσεις στην έναρξη της εφηβείας, στην παραγωγή και μεταφορά υγιών γαμετών, μειωμένη γονιμότητα, στειρότητα, αυθόρμητες αποβολές, καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου, πρόωρος τοκετός και γενετικές ανωμαλίες, πρόωρη αναπαραγωγική γήρανση ή τροποποιήσεις σε άλλες λειτουργίες που εξαρτώνται από την ακεραιότητα των αναπαραγωγικών συστημάτων. (Toragall et al., 2022).

### 1β) Αναπαραγωγικοί τοξικοί παράγοντες στους άνδρες

Τρία συστήματα απαιτούνται για τη φυσιολογική ανδρική γονιμότητα: (1) ο ενδοκρινικός άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γοναδικού (HPG), (2) σπερματογένεση των όρχεων, (3) ο βοηθητικός αδένας και το σύστημα μεταφοράς των γεννητικών οργάνων. Όπως και με τις γυναίκες, παράγοντες που επηρεάζουν οποιονδήποτε από αυτούς τους τρεις παράγοντες μπορούν να λειτουργήσουν ως παράγοντες αναπαραγωγικής τοξικότητας, με πρωταρχικό στόχο τον ενδοκρινικό άξονα ή τη σπερματογένεση του HPG. Οι δυσμενείς επιπτώσεις της αναπαραγωγικής τοξικότητας στην υγεία που μπορεί να εμφανιστούν στους άνδρες περιλαμβάνουν μειωμένη λίμπιντο, στυτική δυσλειτουργία και προβλήματα που σχετίζονται με το σπέρμα (π.χ. ολιγοσπερμία, αζωοσπερμία, τερατοσπερμία και ασθενοσπερμία). (Park, 2020).

## 2) Δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη των απογόνων

Η αναπτυξιακή προσβολή των απογόνων μπορεί να συμβεί μέσω της έκθεσης σε τοξικές ουσίες σε κάθε γονέα πριν από τη σύλληψη, μέσω έκθεσης στη μητέρα κατά

τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και από έκθεση μετά τη γέννηση μέσω γαλουχίας ή άμεσης έκθεσης στο παιδί, και μπορούν να εκδηλωθούν σε οποιοδήποτε σημείο της διάρκειας ζωής του απογόνου.

Τοξικές ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις, επιγενετικές αλλαγές ή άλλη βλάβη στο DNA των γεννητικών κυττάρων μπορεί να προκαλέσουν αναπτυξιακή τοξικότητα (εάν δεν οδηγήσουν σε θάνατο του γεννητικού κυττάρου). (Meyer et al., 2016). Οι σειρές γεννητικών κυττάρων και τα συστήματα οργάνων έχουν διαφορετικά κρίσιμα παράθυρα ανάπτυξης. Επομένως, η έκθεση στην ίδια δόση μιας τοξικής ουσίας θα έχει πολύ διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του εμβρύου και των απογόνων όταν συμβεί η έκθεση. (Meyer et al., 2016). Το φάσμα των πιθανών δυσμενών αναπτυξιακών επιπτώσεων από την έκθεση σε τοξικές ουσίες περιλαμβάνει θάνατο των απογόνων, δυσμορφία, αλλοιωμένη λειτουργία, μειωμένο βάρος γέννησης που οδηγεί σε δομική ανωμαλία, μειωμένη ανάπτυξη και αυξημένο κίνδυνο ασθενειών, όπως καρκίνος, καρδιακές παθήσεις και διαβήτης, αργότερα στη ζωή. (Meyer et al., 2016). (Toragall et al., 2022).

## 2.5 Παραδείγματα ουσιών

Κάποια παραδείγματα κυτταροτοξικών ουσιών είναι φάρμακα χημειοθεραπείας και ορισμένα δηλητήρια. Μια πολύ γνωστή ομάδα ουσιών που είναι τοξικές για την αναπαραγωγή είναι τα τερατογόνα – ουσίες που προκαλούν γενετικές ανωμαλίες. Η (S)-θαλιδομίδη είναι πιθανώς η πιο γνωστή από αυτές. Μια άλλη ομάδα ουσιών που έχουν λάβει μεγάλη προσοχή ως πιθανώς τοξικές για την αναπαραγωγή είναι οι λεγόμενοι ενδοκρινικοί διαταράκτες. Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες αλλάζουν τον τρόπο παραγωγής των ορμονών και τον τρόπο αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς τους. Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες ταξινομούνται ανάλογα με τη δράση τους ως οιστρογονικοί, αντι-οιστρογονικοί, ανδρογονικοί ή αντι-ανδρογονικοί. Κάθε κατηγορία περιλαμβάνει φαρμακευτικές ενώσεις και περιβαλλοντικές ενώσεις. Οι οιστρογονικές ή ανδρογονικές ενώσεις θα προκαλέσουν τις ίδιες ορμονικές αποκρίσεις με τα στεροειδή του φύλου (οιστρογόνα και τεστοστερόνη). Ωστόσο, οι αντι-οιστρογονικές και οι αντι-ανδρογονικές ενώσεις συνδέονται με έναν υποδοχέα και εμποδίζουν τις ορμόνες να δεσμευτούν στους υποδοχείς τους, εμποδίζοντας έτσι τη λειτουργία τους. Μερικά παραδείγματα των πολλών τύπων ενδοκρινικών διαταρακτών είναι η τρενβολόνη (ανδρογονικός), η φλουταμίδη (αντι-ανδρογονικός), η διαιθυλστυλβεστρόλη (οιστρογονικός), η δισφαινόλη A (οιστρογονικός), η τριβουτυλκασσίτερος (αντι-οιστρογονικός).

## 3. Δισφαινόλες

Οι δισφαινόλες είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που σχετίζονται με το διφαινυλομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Ph}_2$ ). Οι περισσότερες βασίζονται σε δύο λειτουργικές ομάδες υδροξυφαινυλίου που συνδέονται με μια γέφυρα μεθυλενίου. Εξαιρέσεις

περιλαμβάνουν τις δισφαινόλη S, P και M. Το όνομα "Δισφαινόλη" είναι μια κοινή ονομασία και το γράμμα που την ακολουθεί υποδηλώνει την παραλλαγή, η οποία εξαρτάται από τους πρόσθετους υποκαταστάτες της. (Fiege et al., 2000). Αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια με πολλές ουσίες που έχουν παρόμοιες χημικές δομές και χρήσεις. Οι δισφαινόλες είναι προϊόντα της χημικής βιομηχανίας και χρησιμοποιούνται ευρέως σε μια μεγάλη ποικιλία βιομηχανικών εφαρμογών καθώς και στην παραγωγή προϊόντων καθημερινής κατανάλωσης. Οι δισφαινόλες χρησιμοποιούνται στην κατασκευή πολυανθρακικού πλαστικού και εποξειδικής ρητίνης εδώ και δεκαετίες. Τα προϊόντα από πολυανθρακικό πλαστικό περιλαμβάνουν κοινά καταναλωτικά αγαθά, όπως επαναχρησιμοποιήσιμα πλαστικά επιτραπέζια σκεύη, μπουκάλια για ποτά, αθλητικό εξοπλισμό, CD και DVD. Οι εποξειδικές ρητίνες χρησιμοποιούνται για την επίστρωση του εσωτερικού των σωλήνων νερού καθώς και των κουτιών τροφίμων και ποτών για να αυξηθεί η διάρκεια ζωής τους και να αποφευχθεί η μεταλλική γεύση. Χρησιμοποιούνται επίσης σε δάπεδα, επιστρώσεις αμαξώματος αυτοκινήτου και σε κόλλες. Οι δισφαινόλες χρησιμοποιούνται επίσης σε θερμικό χαρτί, μελάνια, υφάσματα, χαρτί ή χαρτόνι. (*Bisphenols - ECHA*, n.d.). Μερικές από τις πιο γνωστές είναι η Δισφαινόλη A (BPA), ο πιο δημοφιλής εκπρόσωπος της ομάδας, που συχνά αποκαλείται απλά «δισφαινόλη» και η Δισφαινόλη S (BPS). Οι δισφαινόλες A (BPA), F (BPF) και S (BPS) έχουν αποδειχθεί ότι είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDCs). Πολλές δισφαινόλες μπορεί να βλάψουν τη γονιμότητα και να διαταράξουν τα ορμονικά συστήματα τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων. Μπορεί επίσης να προκαλέσουν δερματικές αλλεργίες. Λόγω των επικίνδυνων ιδιοτήτων τους, η χρήση ορισμένων δισφαινολών έχει περιοριστεί ή περιορίζεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση(ΕΕ) για την προστασία της υγείας των ανθρώπων και του περιβάλλοντος. (Rochester & Bolden, 2015).

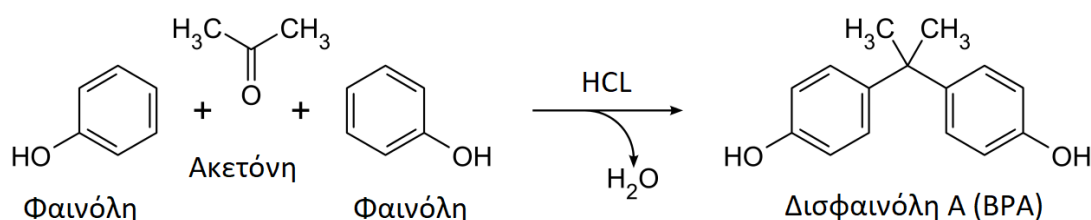
### 3.1 Δισφαινόλη A (BPA)

### 3.2 Γενικά Χαρακτηριστικά

Η δισφαινόλη A (BPA) είναι μια οργανική ένωση που παράγεται συνθετικά, είναι μέλος των οικογενειών του διφαινυλομεθανίου και της δισφαινόλης και έχει δύο ομάδες υδροξυφαινυλίου που συνδέονται με το άτομο άνθρακα της κύριας αλυσίδας. Ο χημικός του τύπος είναι  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ . Αντίθετα, ο ορισμός της BPA είναι ότι είναι μια συνθετική άχρωμη κρυσταλλική χημική ουσία που ανήκει στην ομάδα του διφαινυλομεθανίου, εμφανίζεται σε στερεά μορφή και είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες αλλά διαλύεται ελάχιστα στο νερό.

### 3.3 Παραγωγή/Σύνθεση

Η BPA συντέθηκε για πρώτη φορά το 1891, από τον Ρώσο χημικό Aleksandr P. Dianin, ο οποίος συνδύασε τη φαινόλη με την ακετόνη παρουσία ενός καταλύτη οξέος για να παράγει τη χημική ουσία. Η σύνθεση του BPA εξακολουθεί να ακολουθεί τη γενική μέθοδο του Dianin, με τα θεμελιώδη στοιχεία να αλλάζουν ελάχιστα σε 130 χρόνια. Η δισφαινόλη Α παρασκευάζεται από την καταλυόμενη από οξύ συμπύκνωση φαινόλης και ακετόνης. Η χημική αντίδραση για τη σύνθεση της BPA φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4. Σύνθεση της Δισφαινόλης Α (BPA)

Το BPA είναι αρκετά φθινό στην παραγωγή, καθώς η σύνθεση επωφελείται από μια υψηλή οικονομία ατόμων και μεγάλες ποσότητες και των δύο πρώτων υλών είναι διαθέσιμες από τη διαδικασία κουμένιου. (Fiege et al., 2000). Καθώς το μόνο υποπροϊόν είναι το νερό, μπορεί να θεωρηθεί βιομηχανικό παράδειγμα πράσινης χημείας. Συνήθως, η προσθήκη ακετόνης λαμβάνει χώρα στη θέση παρα και στις δύο φαινόλες, ωστόσο παράγονται επίσης μικρές ποσότητες ορθο-παρα (έως 3%) και ορθο-ορθο ισομερών, μαζί με αρκετά άλλα δευτερεύοντα υποπροϊόντα. (Terasaki et al., 2004). Αυτές δεν αφαιρούνται πάντα και είναι γνωστές ως ακαθαρσίες σε εμπορικά δείγματα BPA.

Στη δεκαετία του 1950 οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι η αντίδραση της BPA με το φωσγένιο (καρβονυλοχλωρίδιο) παρήγαγε μια διαυγή σκληρή ρητίνη γνωστή ως πολυανθρακικό, η οποία χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην κατασκευή πλαστικών. (Rogers, 2014).

### 3.4 Χρήσεις και Εφαρμογές

Η BPA χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή πολυανθρακικών πλαστικών και εποξειδικών ρητινών.

1) Περίπου το 65–70% όλης της δισφαινόλης Α χρησιμοποιείται για την κατασκευή πολυανθρακικών πλαστικών, τα οποία μπορεί να αποτελούνται από σχεδόν 90% BPA κατά μάζα. (Vasiljevic & Harner, 2021).

2) Περίπου το 25–30% του συνόλου της BPA χρησιμοποιείται στην κατασκευή εποξειδικών ρητινών. (Vasiljevic & Harner, 2021). Οι εποξειδικές ρητίνες είναι πολύ καλοί παράγοντες επικάλυψης και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται για την προστατευτική επικάλυψη αγωγών και για την κάλυψη της εσωτερικής επιφάνειας

μεταλλικών κουτιών τροφίμων και ποτών. Αυτό βοηθά τα τρόφιμα και τα ποτά να διαρκέσουν πολύ χωρίς καμία αποσύνθεση.

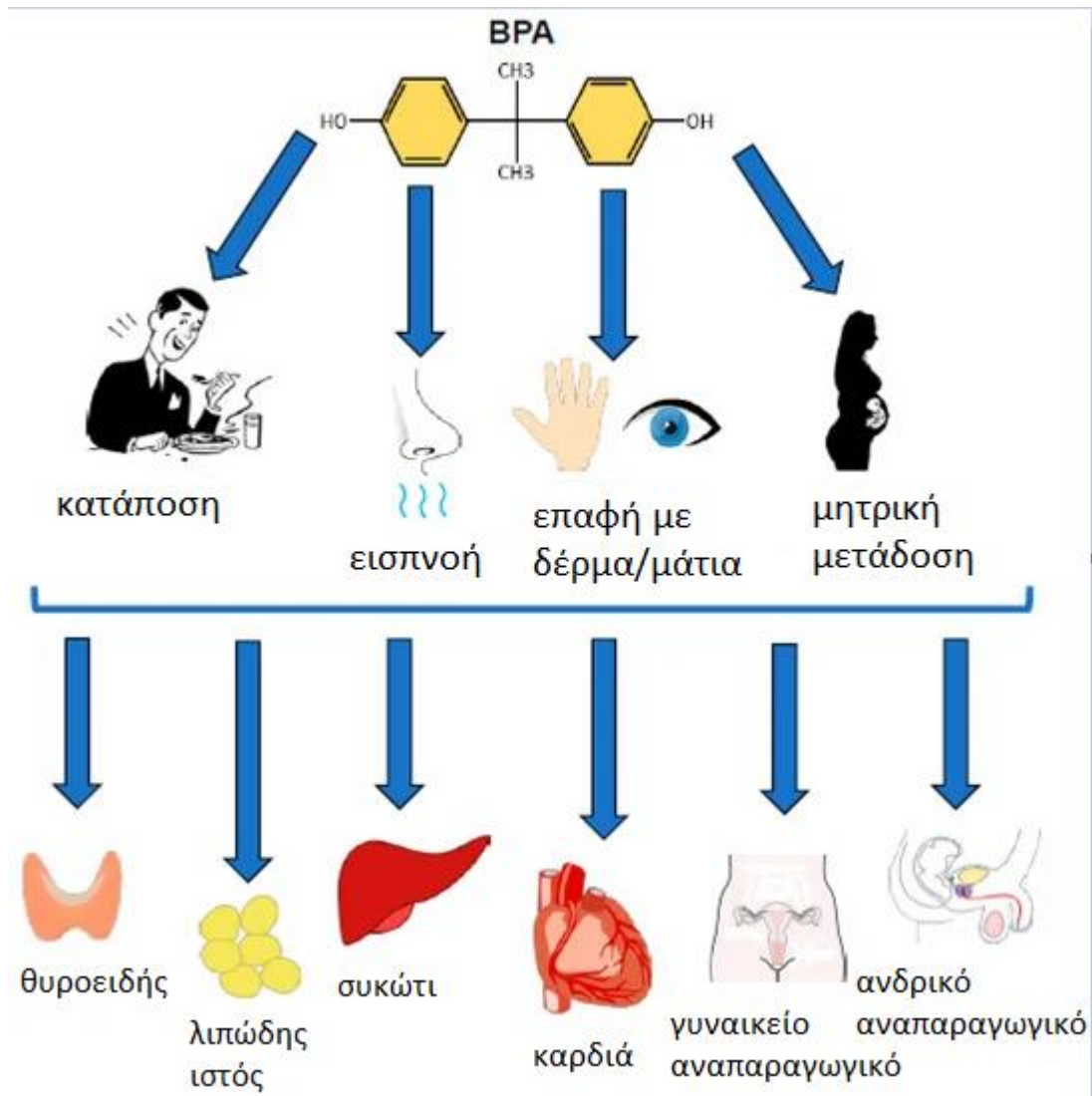
Το υπόλοιπο 5% της BPA χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, πολλές από τις οποίες περιλαμβάνουν πλαστικό. Το BPA είναι το κύριο συστατικό πολλών πλαστικών υψηλής απόδοσης, η παραγωγή αυτών είναι χαμηλή σε σύγκριση με άλλα πλαστικά, αλλά εξακολουθεί να ισούται με αρκετές χιλιάδες τόνους ετησίως. Συγκριτικά μικρές ποσότητες BPA χρησιμοποιούνται επίσης ως πρόσθετα ή τροποποιητές σε ορισμένα βασικά πλαστικά. Αυτά τα υλικά είναι πολύ πιο κοινά, αλλά η περιεκτικότητά τους σε BPA θα είναι χαμηλή. (Geens et al., 2011).

### 3.5 Επιδράσεις στην Υγεία & στην Αναπαραγωγή

Ως αποτέλεσμα της παρουσίας BPA σε πλαστικά, ρητίνες και άλλα υλικά καθημερινής κατανάλωσης, οι περισσότεροι άνθρωποι εκτίθενται συχνά σε ίχνη BPA. Η BPA μπορεί να μεταναστεύσει σε τρόφιμα και ποτά από συσκευασίες τροφίμων και επαναχρησιμοποιήσιμα δοχεία. (Thoene et al., 2018). Άλλες πιθανές πηγές έκθεσης περιλαμβάνουν τη σκόνη (Björnsdotter et al., 2017), νερό, θερμικό χαρτί, (Björnsdotter et al., 2017), ρούχα, (Xue et al., 2017), οδοντιατρικά υλικά (Van Landuyt et al., 2011) και ιατρικές συσκευές. (Geens et al., 2012). Οι πηγές έκθεσης στο BPA περιλαμβάνουν την κατάποση, τη μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο, την εισπνοή, την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Η BPA διαταράσσει τις ενδοκρινικές οδούς, επειδή έχει αδύναμες οιστρογονικές (1.000–100.000 φορές λιγότερη από αυτό της οιστραδιόλης), αντιανδρογόνες και αντιθυρεοειδικές δράσεις. (Matuszczak et al., 2019). Αν και η έκθεση σε BPA είναι συχνή, δεν συσσωρεύεται στο σώμα. Η BPA που απορροφάται από τον άνθρωπο μεταβολίζεται από το ήπαρ, με χρόνο ημιζωής 6 ώρες και απεκκρίνεται με τα ούρα σε 24 ώρες. (Huo et al., 2015). Παρά τον γρήγορο μεταβολισμό, η BPA, λόγω της λιπόφιλης φύσης της, έχει την ικανότητα να συσσωρεύεται σε διαφορετικούς ανθρώπινους και ζωικούς ιστούς, θέτοντας σε κίνδυνο τις φυσιολογικές τους λειτουργίες και

ασκώντας επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία (Valentino et al., 2015). Μόλις εισέλθει στο ανθρώπινο σώμα, η BPA μπορεί να επηρεάσει αρνητικά πολλούς στόχους, όπως τον θυρεοειδή, τον λιπώδη ιστό, το ήπαρ, την καρδιά, το γυναικείο και το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. (Cimmino et al., 2020).





Εικόνα 5. Πηγές έκθεσης BPA & όργανα στόχοι.

Πολυάριθμες είναι οι μελέτες που αφορούν την τοξικότητα της BPA στο αναπαραγωγικό σύστημα και τις λειτουργίες του. Πρόσφατες ανθρώπινες μελέτες δείχνουν ότι η έκθεση σε BPA σε ενήλικες μπορεί να σχετίζεται με μειωμένη ανταπόκριση ωθηκών και επιτυχία εξωσωματικής γονιμοποίησης, μειωμένη επιτυχία γονιμοποίησης και ποιότητα εμβρύου, αποτυχία εμφύτευσης, αποβολή, πρόωρο τοκετό, μειωμένη ανδρική σεξουαλική λειτουργία, μειωμένη ποιότητα και κινητικότητα σπέρματος, μεταβολές συγκεντρώσεων ορμονών φύλου και σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών (PCOS). (Matuszczak et al., 2019). Επιπλέον, η έκθεση στη BPA κατά τη διάρκεια της κύησης θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη αυθόρμητη άμβλωση, μη φυσιολογικό χρόνο κύησης, μειωμένο βάρος γέννησης, αυξημένες ανωμαλίες των ανδρικών γεννητικών οργάνων και παιδική παχυσαρκία. Ιδιαίτερα ισχυρές είναι οι συσχετίσεις μεταξύ της πρώιμης έκθεσης σε BPA και της αλλοιωμένης συμπεριφοράς και της διαταραγμένης νευροανάπτυξης στα παιδιά, καθώς και της αυξημένης πιθανότητας παιδικού συριγμού και άσθματος. (Rochester, 2013).

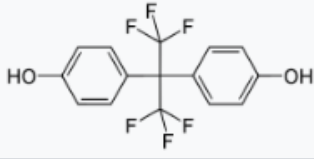
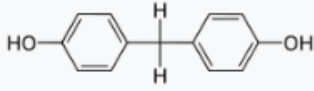
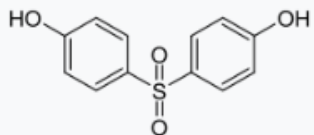
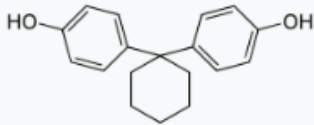
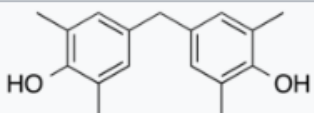
Δεδομένα που ελήφθησαν σε ανθρώπινες και διαφορετικές κυτταρικές σειρές δείχνουν ότι η BPA παρεμβαίνει στη σύνθεση, την έκκριση και τη σηματοδότηση των θυρεοειδικών ορμονών. Λόγω της αντι-ανδρογόνου δράσης του, το BPA δρα ως αγωνιστής στους υποδοχείς οιστρογόνων και ως ανταγωνιστής στους υποδοχείς ανδρογόνων (Rotondo & Chiarelli, 2020). Η έκθεση σε BPA έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο υπέρτασης και καρδιαγγειακής νόσου σε ανθρώπους και τρωκτικά, αν και οι μηχανισμοί είναι ακόμα ασαφείς (Wehbe et al., 2020). Είναι ενδιαφέρον ότι το BPA επηρεάζει το μεταβολισμό της γλυκόζης (συσχέτιση με διαβήτη τύπου 2), την εμφάνιση και την εξέλιξη αρκετών όγκων και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού δεσμεύοντας διαφορετικούς υποδοχείς, ρυθμίζοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες και επάγοντας επιγενετικές αλλαγές (συσχέτιση με οξειδωτικό στρες και φλεγμονή). Τα περισσότερα από αυτά τα αποτελέσματα έχουν ληφθεί σε ανθρώπους, τρωκτικά και κυτταρικές καλλιέργειες. Η ανησυχία σχετικά με τις δυνητικά επιβλαβείς επιπτώσεις της BPA στην υγεία είχε ως αποτέλεσμα την απαγόρευση πολλών πλαστικών προϊόντων, ιδιαίτερα αυτών που χρησιμοποιούνται για βρέφη και μικρά παιδιά. (Cimmino et al., 2020).

### 3.6 Κυτταροτοξικότητα BPA

Πρόσφατα, αρκετές μελέτες πρότειναν ότι η BPA έχει καταστροφικές επιδράσεις στο DNA και στα χρωμοσώματα στα φυσιολογικά κύτταρα του σώματος μέσω των υποδοχέων οιστρογόνου (ER). Έχει δειχθεί ότι η κυτταροτοξικότητα της BPA εξαρτάται από τη δόση και ότι διάφορα κύτταρα με διαφορετικούς ER έδειξαν εντελώς διαφορετική ευαισθησία στην BPA. (Aghajanjpour-Mir et al., 2016).

### 3.7 Υποκατάστατα BPA

Οι ανησυχίες σχετικά με τις επιπτώσεις της BPA στην υγεία οδήγησαν ορισμένους κατασκευαστές να την αντικαταστήσουν με άλλες δισφαινόλες, όπως η δισφαινόλη S και η δισφαινόλη F. Αυτές παράγονται με παρόμοιο τρόπο με την BPA, αντικαθιστώντας την ακετόνη με άλλες κετόνες, οι οποίες υφίστανται ανάλογες αντιδράσεις συμπύκνωσης. (Fiege et al., 2000). Έχουν επίσης διατυπωθεί ανησυχίες για την υγεία σχετικά με αυτά τα υποκατάστατα. (Chen et al., 2016). Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα υποκατάστατα της BPA.

| Δομή  | Όνομασία                | Αντιδρώντα   |                      |
|---|-------------------------|--------------|----------------------|
|  | Δισφαινόλη AF           | Φαινόλη      | Εξαφθορο-ακετόνη     |
|  | Δισφαινόλη F            | Φαινόλη      | Φορμαλδεΐδη          |
|  | Δισφαινόλη S            | Φαινόλη      | Τριοξείδιο του θείου |
|  | Δισφαινόλη Z            | Φαινόλη      | Κυκλοεξανόνη         |
|  | Τετραμεθυλοδισφαινόλη F | 2,6-ξυλενόλη | Φορμαλδεΐδη          |

Πίνακας 1. Δισφαινόλες

### 3.8 Δισφαινόλη S (BPS)

Η δισφαινόλη S (BPS) είναι μια οργανική ένωση με τύπο  $(\text{HO-C}_6\text{H}_4)_2\text{SO}_2$ . Έχει δύο λειτουργικές ομάδες φαινόλης εκατέρωθεν μιας σουλφονυλομάδας. Η BPS κατασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1869 ως βαφή (Glausiusz, 2014) και πλέον χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή καθημερινών καταναλωτικών προϊόντων, όπως πλαστικά, θερμικά χαρτιά και εσωτερικές επενδύσεις δοχείων τροφίμων, μπιμπερό και παιχνιδιών, καθώς η προσοχή έχει μετατοπιστεί στην παραγωγή πλαστικών «χωρίς BPA». (Basak et al., 2020). Η BPS χρησιμοποιείται στη σκλήρυνση εποξειδικών κολλών που στεγνώνουν γρήγορα και ως αναστολέας διάβρωσης. Χρησιμοποιείται επίσης συνήθως ως αντιδραστήριο σε αντιδράσεις πολυμερών. Ταξινομείται ως δισφαινόλη και αποτελεί στενό μοριακό ανάλογο της δισφαινόλης A (BPA). Η χρήση της BPS έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια μετά την απαγόρευση της BPA λόγω της ευαισθητοποίησης του κοινού, το 2012, ότι η BPA έχει ιδιότητες που μιμούνται τα οιστρογόνα και τη διαδεδομένη πεποίθηση ότι αρκετή παραμένει στα προϊόντα ως επικίνδυνη για την υγεία.

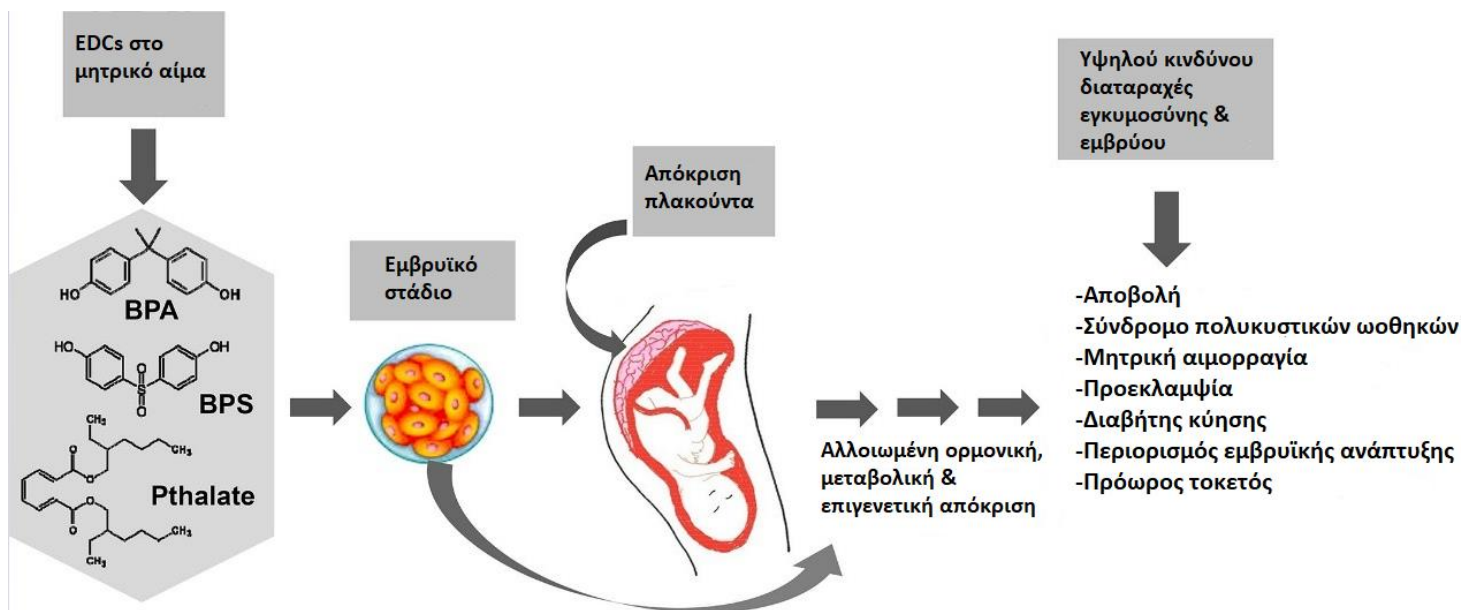
Η BPS θεωρείται ασφαλέστερο υποκατάστατο της BPA, όμως παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα με την BPA στην ανθρώπινη έκθεση (Rochester & Bolden, 2015); (Song et al., 2018); (Thoene et al., 2020). Όντας σχετικά αδρανής, η BPS διοχετεύεται αργά από τη συσκευασία των τροφίμων στα τρόφιμα και το νερό και εισέρχεται στο

ανθρώπινο σώμα. Η BPS μεταβολίζεται από το ήπαρ και τελικά απεκκρίνεται στα ούρα και τα κόπρανα (Liao et al., 2012); (Song et al., 2018).

Στην πορεία αποδείχθηκε ότι η δράση της BPS είναι παρόμοια με αυτή της BPA. Η δισφαινόλη S είναι και αυτή ένας ενδοκρινικός διαταράκτης (EDC) και έχει συγκρίσιμους κινδύνους για την υγεία με αυτόν της BPA. (Grignard et al., 2012). Αποδείχθηκε ότι είναι πιο τοξική για το αναπαραγωγικό σύστημα από τη BPA και επίσης ότι προάγει ορμονικά ορισμένους καρκίνους του μαστού με τον ίδιο ρυθμό με τη BPA. Η BPS έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση των καρκινογόνων παραγόντων του καρκίνου του μαστού και τον πολλαπλασιασμό των θετικών καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η φύση της ενδοκρινικής διαταραχής της BPS έχει ενθαρρύνει τις έρευνες για τη συγγενεία της με τους οιστρογονικούς υποδοχείς, δείχνοντας ότι η BPS είναι ένας ασθενής αγωνιστής, παρόμοια σε ισχύ με τη BPA. Μελέτες δείχνουν ότι η BPS είναι ικανή να μιμείται την οιστραδιόλη και μερικές φορές να είναι πιο αποτελεσματική. (Žalmanová et al., 2016). Η BPS έχει δείξει ότι τόσο διαταράσσει τη σηματοδότηση όσο και βλάπτει το DNA. Η ανδρογόνος και η αντιανδρογόνος δράση της έχουν επίσης επιβεβαιωθεί από τη διαταραχή της λειτουργίας της BPS των υποδοχέων ανδρογόνων. (Siracusa et al., 2018). Μελέτες σε ψάρια ζέβρα έχουν δείξει μειωμένη ποιότητα ωαρίων, μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων, αυξημένη συχνότητα ανωμαλιών στα έμβρυα, καθώς και αλλαγές στη μάζα των γονάδων, (Žalmanová et al., 2016) υποδηλώνοντας ότι η BPS είναι αναπαραγωγική τοξίνη και για τα δύο φύλα.

Η BPS, σε σύγκριση με τη BPA, είναι πιο ανθεκτική στη θερμότητα, το φως και είναι λιγότερο βιοδιασπώμενη, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να παραμείνει στο περιβάλλον για πιο παρατεταμένη περίοδο σε σύγκριση με άλλες δισφαινόλες όπως η BPA και η BPF. Εισέρχεται στο ανθρώπινο σώμα μέσω της κατάποσης, της εισπνοής και της επαφής με το δέρμα, αν και η από του στόματος λήψη παραμένει η κύρια πηγή εισόδου στον άνθρωπο. (Basak et al., 2020). Έχει ανιχνευθεί σε διάφορα σωματικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του αίματος, του σάλιου, των ούρων (Wu et al., 2018), του αμνιακού υγρού και του μητρικού γάλακτος. Γενικά, οι EDCs (πχ BPA, BPS, φθαλικές ενώσεις), μπορούν να διαταράξουν το ενδοκρινικό σύστημα ανταγωνιζόμενοι την ενδογενή στεροειδή ορμόνη και δεσμεύοντας τους υποδοχείς και τις πρωτεΐνες μεταφοράς ορμονών ή αλλάζοντας τον μεταβολισμό ή τη σύνθεση των ενδογενών ορμονών. Τελικά μπορούν να αλλάξουν την έκφραση των γονιδίων (Wetherill et al., 2007). Παρόλο που ο οργανισμός ενός ενήλικου ανθρώπου μπορεί να καθαρίσει αποτελεσματικά από τους EDCs, το αγέννητο έμβρυο και ο πλακούντας δεν διαθέτουν ενζυματικό μηχανισμό για την προστασία τους από αυτή την έκθεση. (Basak et al., 2020). Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 6.) βλέπουμε την περίπτωση της έκθεσης της μητέρας σε EDCs στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης και τις επιπτώσεις της στις επιπλοκές της εγκυμοσύνης και στις γενετικές

ανωμαλίες.



Εικόνα 6. Πιθανά αναπτυξιακά στάδια όπου τα EDCs μπορεί να αλλάξουν την ανάπτυξη του εμβρύου, του πλακούντα και συνεπώς να επηρεάσουν την έκβαση της εγκυμοσύνης. (Basak et al., 2020)

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική προσπάθεια από την παγκόσμια ερευνητική κοινότητα για την αξιολόγηση της ασφάλειας της BPS. Έτσι, είναι ερευνητικού ενδιαφέροντος η μελέτη της επίδρασής της στις κυτταρικές σειρές, καθώς η αξιολόγηση των *in vitro* αποτελεσμάτων (κυτταροκαλλιέργειες) μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών κυτταροτοξικότητας και στην επιβεβαίωση ή απόρριψη των επιπέδων ασφαλούς χρήσης της.

#### 4. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να μελετήσει την επίδραση της BPS στις κυτταρικές σειρές και να αξιολογήσει την πιθανή κυτταροτοξικότητά της. Από τη διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται ότι η BPS επηρεάζει τις λειτουργίες των τροφοβλαστικών κυττάρων μέσω της οδού του υποδοχέα οιστρογόνου και της πρωτεϊνικής κινάσης (ER/MAPK). Πρόσθετες μελέτες στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 δείχνουν την πιθανή επίδραση της BPS στη διαδικασία μεθυλίωσης και, κατ' επέκταση, στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Για το πειραματικό στάδιο, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις Bisphenol S (100pg/ml, 1000pg/ml), στην κυτταρική σειρά Ishikawa, μια καλά διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινου ενδομητρίου αδενοκαρκινώματος, και αξιολογήσαμε μικροσκοπικά την επίδρασή της. Επιπλέον, μετρήσαμε έμμεσα τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, μετρώντας τα νιτρικά και τα νιτρώδη.

## 5. Υλικά και Μεθοδολογία

### 5.1 Υλικά

#### Αντιδραστήρια

| Αντιδραστήριο                                    | Εταιρία Παροχής                |
|--|--------------------------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)          | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| Fetal Bovine Serum (FBS)                         | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| Antibiotic-Antimycotic (penicillin-streptomycin) | Thermo Fisher, Scientific      |
| L-Glutamine                                      | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| Trypsin  | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| Phosphate Buffered Saline (PBS)                  | Thermo Fisher, Scientific      |
| Dimethyl Sulfoxide (DMSO)                        | Thermo Fisher, Scientific      |
| Glycerol   | Thermo Fisher, Scientific      |
| Liquid Nitrogen                                  | Air Liquide                    |
| Trypan Blue                                      | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| Bisphenol S (BPS)                                | Bisphenol S                    |
| Purified Water                                   |                                |
| Ethanol  |                                |
| Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay kit           | Cayman Chemical                |

#### Αναλώσιμα-Υλικά

| Υλικά   | Εταιρία Παροχής           |
|---|---------------------------|
| Flasks (75cm <sup>2</sup> , 25cm <sup>2</sup> ) | Thermo Fisher, Scientific |
| Plastic Pasteur Pipettes Sterile (5ml)          | Thermo Fisher, Scientific |
| Disposable Serological Pipettes Sterile (10ml)  | Thermo Fisher, Scientific |
| Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Eppendorf (1,5ml)   | Thermo Fisher, Scientific |
| Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon (15ml)       | Thermo Fisher, Scientific |
| Microplate                                      | Thermo Fisher, Scientific |

#### Όργανα

| Όργανα                              | Εταιρία Παροχής  |
|-------------------------------------|------------------|
| Απαγωγός κατακόρυφης νηματικής ροής | FASTER S.R.L.    |
| Επωαστήρας CO <sub>2</sub>          | FORMA SCIENTIFIC |



|                   |  |
|-------------------|--|
| Μικροσκόπιο ICSI  | Nikon eclipse te2000-5                           |
| Υδατόλουτρο       |  |
| Κυτταρόμετρο      | Thermo Fisher Countess II Automated Cell Counter |
| Φυγόκεντρος       | HETTICH  |
| Αυτόματες πιπέτες | GILSON   |
| Photometer        |  |

### Κυτταρική Σειρά

- Ishikawa cell line (καλά διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου)

## 5.2 Μεθοδολογία

### ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

#### Παρασκευή υλικών

##### Πλήρες Θρεπτικό υλικό

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium , περιέχει L-γλουταμίνη, 4.500 mg/ L D-γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο)
- 10% FBS (ορός εμβρύου μόσχου)
- 1% αντιβιοτικό/αντιμυκητιακό (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη)
- Γλουταμίνη-L (Υποστηρίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, ως πηγή ενέργειας)

#### Μεθοδολογία

Στα πειράματα των κυτταροκαλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Ishikawa (καλά διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου). Αναπτύσσεται ως μονόστοιβη καλλιέργεια και διατηρείται σε υγρό μέσο καλλιέργειας σε θερμοκρασία 37°C, παρουσία 5% CO<sub>2</sub> (επωαστήρας) και παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με 10% FBS, 1% αντιβακτηριακό/αντιμυκητιακό (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) και L-γλουταμίνη. Οι διαδικασίες του χειρισμού των κυττάρων πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένα υλικά, τα οποία πριν προστεθούν στα κύτταρα ζεσταίνονται στους 37 °C στον επωαστήρα, και σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Η εσωτερική επιφάνεια εργασίας του απαγωγού, καθώς και ό,τι εισέρχεται σε αυτόν, απολυμαίνονται εξωτερικά με αιθανόλη.

#### ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Τα φιαλίδια που περιέχουν τα κύτταρα, εμβαπτίζονται στο υδατόλουτρο στους 37°C και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση.
2. Αμέσως μόλις ξεπαγώσουν, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε φλάσκα (T<sub>75</sub>) και προστίθενται 9mL πλήρους θρεπτικού υλικού.



Πραγματοποιείται έντονη ανάδευση του εναιωρήματος με τη χρήση σιφωνίου κατάλληλου όγκου ώστε να διαλυθούν όλα τα συσσωματώματα που πιθανώς δημιουργήθηκαν.

3. Η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστήρα για 16 ώρες.
4. Μετά το πέρας των 16 ωρών, απομακρύνεται το υπερκείμενο με το θρεπτικό ώστε να αφαιρεθεί το DMSO, επειδή από ένα σημείο και μετά δρα κυτταροτοξικά και αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων.
5. Προστίθενται 3-4 mL PBS και με ήπιες σταυρωτές κινήσεις, ώστε να μην διαταραχθούν τα κύτταρα, πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων για να απομακρυνθεί οποιοδήποτε υπόλειμμα θρεπτικού υλικού υπάρχει.

Τέλος αφού αναρροφηθεί το PBS, προστίθεται νέο θρεπτικό 10mL και η φλάσκα επανατοποθετείται στον επωαστήρα.

### ΑΝΑΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ-ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΡΙΨΙΝΗ

Όταν η επιφάνεια της φλάσκας καλυφθεί στο μεγαλύτερο μέρος της με κύτταρα και δεν υπάρχει χώρος για περαιτέρω ανάπτυξη, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν η πληρότητα των κυττάρων φτάσει περίπου το 90-100% και γίνεται ως εξής:

1. Απομακρύνεται με αναρρόφηση το καλλιεργητικό υλικό σε δοχείο απορριμμάτων προσέχοντας να μην αυξηθεί ο κίνδυνος μόλυνσης με τυχόν σταγόνες.
2. Τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα PBS ώστε να απαλλαχθούν από τυχόν FBS στο υπολειμματικό μέσο καλλιέργειας. Ανακινούμε τη φλάσκα μερικές φορές για να ξεπλυθούν τα κύτταρα και μετακινούμε προσεκτικά το PBS έξω στο δοχείο απορριμμάτων. Αυτό μπορεί να επαναληφθεί άλλη μία ή δύο φορές εάν είναι απαραίτητο. (Προσοχή να μη μπει PBS στο φίλτρο του πώματος του σιφωνίου)
3. Προστίθεται κατάλληλος όγκος τρυψίνης, αναλόγως του μεγέθους της φλάσκας, ώστε να καλύψει τα κύτταρα στο κάτω μέρος της φιάλης (πάνω στα κύτταρα και όχι στην άκρη).  
π.χ. σε φλάσκα 25 cm<sup>2</sup> περίπου 1 ml θρυψίνης  
σε φλάσκα 75 cm<sup>2</sup> περίπου 5 ml θρυψίνης  
σε φλάσκα 175 cm<sup>2</sup> περίπου 10 ml θρυψίνης
4. Ανακινούμε τη φλάσκα με σταυρωτές κινήσεις έτσι ώστε η τρυψίνη να έρθει σε επαφή με όλα τα κύτταρα. Έπειτα την τοποθετούμε για 3 λεπτά στην επιφάνεια του επωαστήρα στους 37°C. Διαφορετικές κυτταρικές σειρές απαιτούν διαφορετικούς χρόνους τρυψινοποίησης. Για να αποφευχθεί η υπερβολική θρυψίνη που μπορεί να βλάψει σοβαρά τα κύτταρα, είναι απαραίτητο να τα ελέγχετε κάθε λίγα λεπτά.
5. Είναι έτοιμα όταν τα κύτταρα αρχίσουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια, δηλαδή όταν μεταβληθεί η μορφολογία τους και το σχήμα τους γίνει σφαιρικό. Παρατηρείται η μορφή των κυττάρων στο μικροσκόπιο και έπειτα προστίθεται θρεπτικό υλικό σε όγκο τουλάχιστον 5 φορές του όγκου της τρυψίνης που χρησιμοποιήθηκε. (Το FBS σταματά τη τρυψινοποίηση).

6. Παράλληλα, προστίθεται θρεπτικό υλικό (το οποίο έχει τοποθετηθεί στον επωαστήρα στους 37°C για 10 λεπτά ώστε να μη διαταραχτεί η θερμοκρασία της καλλιέργειας) στις νέες φλάσκες που θα μεταφερθούν τα κύτταρα, ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας.  
π.χ. σε φλάσκα 25 cm<sup>2</sup> περίπου 5-10 ml θρεπτικού υλικού  
σε φλάσκα 75 cm<sup>2</sup> περίπου 10-30 ml θρεπτικού υλικού  
σε φλάσκα 175 cm<sup>2</sup> περίπου 40-150 ml θρεπτικού υλικού
7. Τα κύτταρα επαναιωρούνται και διασπείρονται ομοιόμορφα με σιφώνιο κατάλληλου όγκου. (up and down για να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα και προσοχή να μη μπει όλη η ποσότητα μέσα στο σιφώνιο αλλά και να γίνει όσο το δυνατόν λιγότερος αφρός).
8. Σε αυτό το στάδιο επιλέγεται η κατάλληλη/επιθυμητή αραιώση, δηλαδή πόση ποσότητα κυττάρων θα βάλουμε σε κάθε φλάσκα που περιέχει συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού.
9. Τέλος, αφήνουμε τις φλάσκες στον επωαστήρα για όλη τη νύχτα ώστε να ανακάμψουν και να εγκατασταθούν. Την επόμενη μέρα καλό είναι να αλλάξθει το καλλιεργητικό υλικό για να απαλλαγείτε από τυχόν υπολείμματα θρυψίνης.

#### ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Όταν η πληρότητα της φλάσκας φτάσει περίπου στο 80% πραγματοποιείται κατεργασία με τρυψίνη για να συλλεχθούν και να καταψυχθούν τα κύτταρα για επακόλουθη καλλιέργεια. Είναι επιθυμητό, η πληρότητα να είναι στο 80% και όχι περισσότερο διότι τότε βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Η διαδικασία είναι η εξής:

1. Πραγματοποιούνται τα βήματα της παραπάνω διαδικασίας από το 1 έως και το 5.
2. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1.000 rpm για 5λεπτά.
3. Αναρροφάται το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα των κυττάρων σε κατάλληλη ποσότητα κρυοπροστατευτικού θρεπτικού υλικού DMEM.
4. Το εναιώρημα μοιράζεται σε cryovials των 2ml και τα τοποθετούνται σε θερμοκρασία - 80°C σε κατάλληλο δοχείο κατάψυξης το οποίο διαβρέχεται από ισοπροπανόλη ώστε να επιτευχθεί σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας κατά 1°C /min.
5. Αποθήκευση των cryovials στους -80°C για μικρό χρονικό διάστημα (έως πέντε μήνες) ή στο υγρό άζωτο μακροπρόθεσμα.

#### ΑΛΛΑΓΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ & ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Όταν το χρώμα του καλλιεργητικού υλικού της φλάσκας αλλάξει χρώμα, τότε θα χρειαστούν αλλαγή του καλλιεργητικού υλικού για την αναπλήρωση των θρεπτικών συστατικών και τη διατήρηση του σωστού pH ( πχ. στην περίπτωσή μας όταν από κόκκινο αρχίζει σταδιακά και γίνεται ροζ και ακόμα περισσότερο κίτρινο). Τα κύτταρα παράγουν παράγοντες προαγωγής της ανάπτυξης που εκκρίνονται στα μέσα τους, επομένως μπορεί να είναι ωφέλιμο να πραγματοποιηθεί η μισή αλλαγή

του μέσου για την αναπλήρωση των θρεπτικών συστατικών αλλά και τη διατήρηση των αυξητικών παραγόντων. Η διαδικασία αυτή γίνεται ως εξής:

1. Θερμαίνεται το νέο καλλιεργητικό υλικό στους 37°C στον επωαστήρα για τουλάχιστον 30 λεπτά.
2. Αναρροφάται το παλιό υλικό μέσα από τη φλάσκα (προσεκτικά ώστε να μη διαταραχθούν τα κύτταρα) και φυλάσσεται σε σωληνάκια falcon στους -20°C για περαιτέρω επεξεργασία.
3. Αμέσως μετά αντικαθίσταται με τον απαραίτητο όγκο φρέσκου προθερμανθέντος υλικό καλλιέργειας και επιστροφή στον επωαστήρα.

### SPLITTING-ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι αναλογίες διαχωρισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διασφαλιστεί ότι τα κύτταρα είναι έτοιμα για ένα πείραμα μια συγκεκριμένη ημέρα ή για τη διατήρηση κυτταροκαλλιιεργειών για μελλοντική χρήση ή ως εφεδρικών. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην περίπτωση που η φλάσκα διαθέτει πολλά νεκρά κύτταρα έτσι ώστε να δώσει νέο χώρο στα ζωντανά κύτταρα να πολλαπλασιαστούν. Οι προσκολλημένες κυτταρικές σειρές διανέμονται με βάση το εμβαδόν της επιφάνειας της φλάσκας, οπότε θα υπολογιστούν ως κύτταρα/cm<sup>2</sup>. Τα αργά αναπτυσσόμενα κύτταρα ενδέχεται να μην αναπτυχθούν εάν χρησιμοποιείται υψηλή αναλογία διαχωρισμού. Τα ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα μπορεί να απαιτούν υψηλή αναλογία διαχωρισμού για να βεβαιωθείτε ότι δεν θα μεγαλώσουν υπερβολικά. Εάν τα κύτταρα πρόκειται να μείνουν χωρίς επίβλεψη για μεγαλύτερες περιόδους (δηλαδή τα Σαββατοκύριακα ή σε αργίες), συνιστάται η χρήση χαμηλότερης από την κανονική αναλογία διαχωρισμού. Η διαδικασία αυτή γίνεται ως εξής:

1. Θερμαίνεται το PBS και το νέο καλλιεργητικό υλικό στον επωαστήρα στους 37°C.
2. Απομακρύνεται με αναρρόφηση το καλλιεργητικό υλικό σε δοχείο απορριμμάτων προσέχοντας να μην αυξηθεί ο κίνδυνος μόλυνσης με τυχόν σταγόνες.
3. Τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα PBS ώστε να απαλλαχθούν από τυχόν FBS στο υπολειμματικό μέσο καλλιέργειας.
4. Προστίθεται κατάλληλος όγκος θρυψίνης, αναλόγως του μεγέθους της φλάσκας, ώστε να καλύψει τα κύτταρα στο κάτω μέρος της φιάλης (πάνω στα κύτταρα και όχι στην άκρη).  
π.χ. σε φλάσκα 25 cm<sup>2</sup> περίπου 1 ml θρυψίνης  
σε φλάσκα 75 cm<sup>2</sup> περίπου 5 ml θρυψίνης  
σε φλάσκα 175 cm<sup>2</sup> περίπου 10 ml θρυψίνης
5. Ανακινούμε τη φλάσκα με σταυρωτές κινήσεις έτσι ώστε η θρυψίνη να έρθει σε επαφή με όλα τα κύτταρα. Έπειτα την τοποθετούμε για 3 λεπτά στην επιφάνεια του επωαστήρα στους 37°C.
6. Είναι έτοιμα όταν τα κύτταρα αρχίσουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια, δηλαδή όταν μεταβληθεί η μορφολογία τους και το σχήμα τους γίνει σφαιρικό. Παρατηρείται η μορφή των κυττάρων στο μικροσκόπιο

7. Προσθήκη του νέου καλλιεργητικού υλικού στη φλάσκα με τη θρυψίνη.
8. Διαμοιρασμός της επιθυμητής ποσότητας κυττάρων/καλλιεργητικού σε νέες φλάσκες.

### ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΜΕΤΡΗΤΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όλες οι μετρήσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ στο νοσοκομείο Αλεξάνδρα, υπό την καθοδήγηση και βοήθεια του Γαβαλά Νικόλαου, τον οποίο και ευχαριστούμε πολύ.

Οι αυτοματοποιημένοι μετρητές κυττάρων είναι μηχανές που μετρούν αυτόματα τα κύτταρα. Το δείγμα φορτώνεται και ωθείται μέσω ενός μικρού σωλήνα, ενώ ο αυτοματοποιημένος μετρητής κυττάρων χρησιμοποιεί αισθητήρες οπτικής ή ηλεκτρικής σύνθετης αντίστασης για να μετρήσει πόσα κύτταρα περνούν από το σωλήνα. Το Thermo Fisher Countess II Automated Cell Counter που χρησιμοποιήσαμε έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

Ακριβής—εξαλείφει την υποκειμενικότητα της χειροκίνητης μέτρησης και της μεταβλητότητας από χρήστη σε χρήστη.

Γρήγορος—μετράει ζωντανά και νεκρά κύτταρα, μετρά τη βιωσιμότητα και αναφέρει το μέσο μέγεθος κυττάρων με ένα μόνο άγγιγμα σε περίπου 20 δευτερόλεπτα.

Βολικός—δεν απαιτεί καθαρισμό ή τακτική συντήρηση. Η οθόνη αφής υψηλής ανάλυσης και η απλή επαφή χρήστη παρέχουν γρήγορη εκκίνηση, απαιτούν ελάχιστη εκπαίδευση και προσφέρουν αυτόματα αποθήκευση δεδομένων σε USB ή cloud.

1. Πραγματοποιούνται τα βήματα της παραπάνω διαδικασίας από το 1 έως και το 6.
2. Παίρνετε λίγη ποσότητα από τα θρυψινοποιημένα κύτταρα και την προσθέτετε σε ένα σωληνάκι Eppendorf.
3. Αμέσως προσθέτετε και ίδια ποσότητα νέου καλλιεργητικού υλικού για απενεργοποίηση της θρυψίνης.
4. Προετοιμάστε το δείγμα που θα βάλετε στον μετρητή, προσθέτοντας 10μL του κυτταρικού σας εναιωρήματος (το οποίο περιέχει κύτταρα μετά από θρυψινοποίηση μαζί με ίση ποσότητα καλλιεργητικού υλικού για απενεργοποίηση της θρυψίνης) σε 10μL χρώσης μπλε τρυπανίου (Trypan Blue) 0,4%. Ανακατέψτε καλά το μείγμα του δείγματος με πιπέτα πάνω και κάτω μερικές φορές.
5. Τραβήξτε απαλά με την πιπέτα 10μL από το μείγμα δείγματος-χρώσης και τοποθετήστε το στην περιοχή φόρτωσης πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα.
6. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο πλάκα στη θύρα του μετρητή.
7. Όταν εισάγεται η πλάκα, ο μετρητής φωτίζει αυτόματα το δείγμα, ρυθμίζει την ένταση του φωτισμού και εστιάζει αυτόματα στα κύτταρα.
8. Η οθόνη εμφανίζει τα παρακάτω αποτελέσματα: συνολική συγκέντρωση, ποσοστό και συγκέντρωση ζωντανών και νεκρών κυττάρων).

Σημείωση: Αφού χρησιμοποιήσετε τις πλάκες καταμέτρησης κυττάρων Countess™, απορρίψτε τις κατάλληλα ως βιολογικά επικίνδυνα απόβλητα. Μην

επαναχρησιμοποιείτε τις πλάκες μιας χρήσης.

### ΠΡΟΣΘΗΚΗ BPS ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

Για την προσθήκη της επιθυμητής ποσότητας και συγκέντρωσης BPS είναι απαραίτητες και οι σωστές αραιώσεις. Αφού πραγματοποιηθούν οι αραιώσεις με προσθήκη απιονισμένου νερού και φτάσουμε στην επιθυμητή συγκέντρωση BPS τότε η διαδικασία ακολουθεί ως εξής:

1. Επιλέγουμε 2 φλάσκες για να χρησιμοποιήσουμε ως Control, δηλαδή να μη προσθέσουμε καθόλου BPS και 2 φλάσκες για κάθε διαφορετική συγκέντρωση BPS που θέλουμε να μελετήσουμε. (Είναι ιδανικό οι φλάσκες που θα χρησιμοποιήσουμε να έχουν πάνω κάτω την ίδια συνολική συγκέντρωση κυττάρων και καλό ποσοστό ζωντανών κυττάρων).
2. Πραγματοποιούμε όλα τα βήματα της παραπάνω διαδικασίας της αυτοματοποιημένης μέτρησης των κυττάρων πριν προσθέσουμε BPS.
3. Στη συνέχεια, προσθέτουμε τις συγκεντρώσεις BPS που θέλουμε σε συγκεκριμένες φλάσκες και τις σημειώνουμε.
4. Αφήνουμε όλες τις φλάσκες στον επωαστήρα στους 37°C για 48 ώρες.
5. Μετά το πέρας των 48 ωρών, πραγματοποιούμε δεύτερη μέτρηση των κυττάρων σύμφωνα με όλα τα βήματα της παραπάνω διαδικασίας.
6. Τέλος, συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των μετρήσεων και βγάζουμε συμπεράσματα.

### ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ/ΝΙΤΡΩΔΩΝ

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO), προϊόν του φυσιολογικού ενδοθηλίου, είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας της φυσιολογικής ενδοθηλιακής και αγγειακής λειτουργίας. Σε καταστάσεις φλεγμονής, η παραγωγή NO από τα αγγεία αυξάνεται σημαντικά και, σε συνδυασμό με άλλα ROS, συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες. Μέσω της μέτρησης νιτρικών/νιτρωδών μπορούμε έμμεσα να μελετήσουμε την μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων. Η μετατροπή του νιτρικού σε νιτρώδη είναι απαραίτητη για τη μέτρηση της συνολικής ποσότητας του NO (μονοξειδίου του αζώτου) που σχηματίζεται από τα κύτταρα.

Το κιτ χρωματομετρικής ανάλυσης νιτρικών/νιτρωδών της Cayman βασίζεται στη μέθοδο της ELISA και παρέχει μια ακριβή και βολική μέθοδο για τη μέτρηση της συνολικής συγκέντρωσης νιτρικών/νιτρωδών αλάτων σε μια απλή διαδικασία δύο σταδίων. Το πρώτο βήμα είναι η μετατροπή νιτρικών σε νιτρώδη χρησιμοποιώντας νιτρική αναγωγή. Το δεύτερο βήμα είναι η προσθήκη των αντιδραστηρίων Griess που μετατρέπουν τα νιτρώδη σε μια βαθύ μωβ άζω ένωση. Η φωτομετρική μέτρηση της απορρόφησης που οφείλεται σε αυτό το αζωχρωμοφόρο προσδιορίζει με ακρίβεια τη συγκέντρωση NO. Σημείωση: Είναι απαραίτητο να υπάρχουν μερικά πηγαδάκια στην πλάκα (τουλάχιστον δύο) που ορίζονται ως Blanks (που περιέχουν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης ή νερού). Εάν σκοπεύετε να μετρήσετε μόνο ολικά προϊόντα NO (νιτρικά + νιτρώδη), απαιτείται μόνο η τυπική καμπύλη νιτρικών αλάτων. Εάν μετρώνται μόνο τα νιτρώδη, τότε χρειάζεται μόνο η τυπική καμπύλη νιτρωδών.

Η διαδικασία αυτή γίνεται ως εξής:

1. Προσθέστε 200μl Assay Buffer στα πηγαδάκια της πλάκας που θα ορίσετε ως Blank. Μην προσθέσετε άλλα αντιδραστήρια σε αυτά τα.
2. Προσθέστε έως και 80μl αραιώσεων δειγμάτων ή δειγμάτων στα πηγαδάκια με τη σειρά που επιλέγετε. Ο τελικός όγκος πρέπει να ρυθμιστεί στα 80μl χρησιμοποιώντας το διάλυμα Assay Buffer.
3. Προσθέστε 10μl του Enzyme Cofactor Mixture (Αρ. 780012) σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια (πρότυπα και άγνωστα).
4. Προσθέστε 10μl του Nitrate Reductase Mixture (Αρ. 780010) σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια (πρότυπα και άγνωστα).
5. Καλύψτε την πλάκα με το κάλυμμα της πλάκας και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα.
6. Μετά τον απαιτούμενο χρόνο επώασης, προσθέστε 50μl αντιδραστηρίου Griess R1 (Αρ. 780018) σε καθένα από τα φρεάτια (πρότυπα και άγνωστα).
7. Προσθέστε αμέσως 50μl αντιδραστηρίου Griess R2 (Αρ. 780020) σε καθένα από τα φρεάτια (πρότυπα και άγνωστα).
8. Αφήστε το χρώμα να αναπτυχθεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Δεν είναι απαραίτητο να καλύψετε το πιάτο. (Η 10λεπτη επώαση είναι η βέλτιστη για την ανάπτυξη χρώματος).
9. Διαβάστε την απορρόφηση στα 540nm ή 550nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών.
10. Για τους υπολογισμούς πρέπει στη συνέχεια να αφαιρέσετε τα Blanks και να σχεδιάσετε τις τυπικές καμπύλες σύμφωνα με το εγχειρίδιο.

## 6. Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 6.1 Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων της Δισφαινόλης S (BPS) στην κυτταρική σειρά Ishikawa

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση 2 διαφορετικών συγκεντρώσεων (100pg/ml και 1000pg/ml) Δισφαινόλης S (BPS) που προστέθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων Ishakawa και συγκρίθηκαν με Control καλλιέργειες (χωρίς προσθήκη BPS) κυττάρων Ishakawa για να ελέγξουμε αν η BPS μπορεί να αποδειχθεί τοξική για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Πραγματοποιήσαμε μία αρχική μέτρηση κυτταρικής συγκέντρωσης πριν την προσθήκη BPS σε όλα τα δείγματα. Αμέσως μετά την αρχική μέτρηση χωρίσαμε 2 δείγματα (φλάσκες) Control, 2 δείγματα (φλάσκες) στα οποία προσθέσαμε 100pg/ml BPS και 2 δείγματα (φλάσκες) στα οποία προσθέσαμε 1000pg/ml BPS. Αφήσαμε όλες τις φλάσκες στον επωαστήρα στους 37°C για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών πραγματοποιήσαμε την τελική μέτρηση κυτταρικής συγκέντρωσης μετά την προσθήκη BPS. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα αποτελέσματα και των δύο μετρήσεων της συγκέντρωσης των κυττάρων πριν και μετά την προσθήκη BPS.



| Δείγματα          | Κυτταρική Συγκέντρωση<br>Προ BPS (/mL) | Κυτταρική Συγκέντρωση<br>Μετά BPS (/mL) |
|-------------------|--|---|
| Control (1)       | 1,17 x 10 <sup>5</sup>                 | 2,70 x 10 <sup>6</sup>                  |
| Control (2)       | 1,1 x 10 <sup>6</sup>                  | 2,17 x 10 <sup>6</sup>                  |
| 100pg/mp BPS (1)  | 2,35 x 10 <sup>5</sup>                 | 8,21 x 10 <sup>5</sup>                  |
| 100pg/ml BPS (2)  | 3,52 x 10 <sup>5</sup>                 | 4,69 x 10 <sup>5</sup>                  |
| 1000pg/ml BPS (1) | 4,11 x 10 <sup>5</sup>                 | 9,38 x 10 <sup>5</sup>                  |
| 1000pg/ml BPS (2) | 1,1 x 10 <sup>6</sup>                  | 2,17 x 10 <sup>6</sup>                  |

Πίνακας 2. Αποτελέσματα Κυτταρικής Συγκέντρωσης πριν και μετά από την προσθήκη BPS.

Παρατηρούμε ότι σε όλα τα δείγματα μετά την προσθήκη BPS και το πέρας των 48 ωρών υπάρχει διακριτή αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης δηλαδή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε άλλη μία φορά με παρόμοια αποτελέσματα τα οποία δεν απεικονίζονται.

## 6.2 Έλεγχος της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων μέσω μέτρησης νιτρικών/νιτρωδών

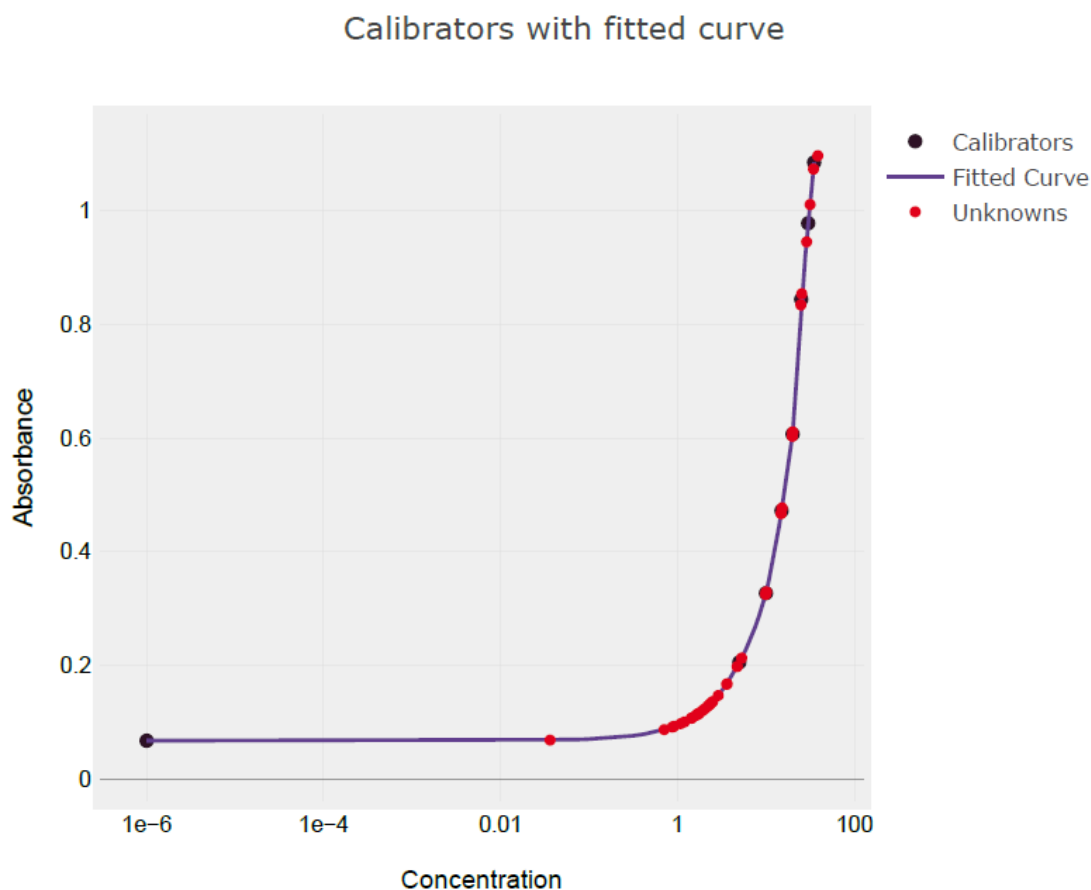
| Plate layout  |         |          |          |           |
|---------------|---------|----------|----------|-----------|
| CAL-35        | CAL-35  | Blank    | Sample   | Sample 8  |
| CAL-30        | CAL-30  | Sample 1 | Sample 1 | Sample 9  |
| CAL-25        | CAL-25  | Sample 2 | Sample 2 | Sample 10 |
| CAL-20        | CAL-20  | Sample 3 | Sample 3 | Sample 11 |
| CAL-15        | CAL-15  | Sample 4 | Sample 4 | Sample 12 |
| CAL-10        | CAL-10  | Sample 5 | Sample 5 | Sample 13 |
| CAL-5         | CAL-5   | Sample 6 | Sample 6 | blank     |
| CAL-0         | CAL-0   | Sample 7 | Sample 7 | CAL-blank |
| Absorbance    |         |          |          |           |
| 1.0965        | 1.0728  | 0.1137   | 0.1368   | 0.116     |
| 1.0105        | 0.9449  | 0.167    | 0.1164   | 0.1213    |
| 0.8538        | 0.8339  | 0.1073   | 0.1319   | 0.1309    |
| 0.6031        | 0.6108  | 0.1353   | 0.1679   | 0.115     |
| 0.4772        | 0.467   | 0.1282   | 0.1473   | 0.1077    |
| 0.3251        | 0.3294  | 0.1241   | 0.112    | 0.093     |
| 0.198         | 0.2133  | 0.1008   | 0.0978   | 0.0343    |
| 0.0668        | 0.0688  | 0.0873   | 0.0919   | 0.0358    |
| Concentration |         |          |          |           |
| 38.5          | 34.446  | 1.66485  | 2.50272  | 1.74828   |
| 31.5334       | 28.7747 | 3.59811  | 1.76279  | 1.94052   |
| 25.3717       | 24.79   | 1.43272  | 2.32499  | 2.28872   |
| 19.8572       | 20.0813 | 2.44831  | 3.63076  | 1.71201   |
| 15.1891       | 14.824  | 2.19079  | 2.88357  | 1.44723   |
| 9.9116        | 10.0742 | 2.04208  | 1.60319  | 0.91404   |
| 4.72252       | 5.31456 | 1.19695  | 1.08814  | 0         |
| 0             | 0.03627 | 0.70729  | 0.87414  | 0         |

Εικόνα 7. Δείγματα, Απορροφήσεις και Συγκεντρώσεις που προέκυψαν από την ανάλυση νιτρικών/νιτρωδών.



Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται τα δείγματα που χρησιμοποιήσαμε για τη μέτρηση νιτρικών/νιτρωδών, οι αντίστοιχες απορροφήσεις τους, καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους όπως μας δόθηκαν από το φωτόμετρο.

Παρατηρούμε ότι έχουμε ένα εύρος τιμών συγκεντρώσεων από 0.70729 έως 3.63076 και έναν μέσο όρο συγκεντρώσεων 1.920826. Τοποθετώντας τις απορροφήσεις στον άξονα  $y$  και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στον άξονα  $x$  φτιάξαμε την παρακάτω τυπική καμπύλη.



Εικόνα 8. Τυπική Καμπύλη απορροφήσεων/συγκεντρώσεων νιτρικών/νιτρωδών.

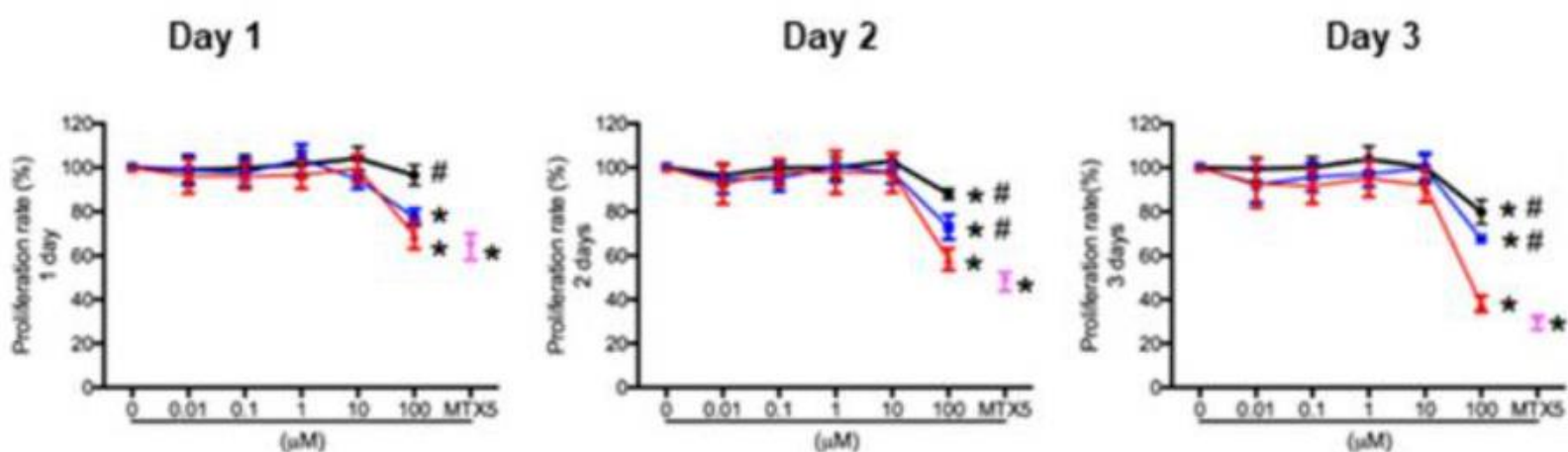
### 6.3 Συζήτηση

Η δισφαινόλη S (BPS) είναι μια οργανική ένωση χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή καθημερινών καταναλωτικών προϊόντων μετά την απαγόρευση της BPA, η οποία αποδείχθηκε επικίνδυνη για την υγεία. Η BPS στην αρχή θεωρούνταν ασφαλέστερο υποκατάστατο της BPA, όμως στην πορεία αποδείχθηκε ότι η δράση της είναι παρόμοια με αυτή της BPA. Η δισφαινόλη S είναι ένας ενδοκρινικός διαταράκτης (EDC), είναι τοξική για το αναπαραγωγικό σύστημα και κατέχει ανδρογόνο και η αντιανδρογόνο δράση. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική προσπάθεια από την παγκόσμια ερευνητική κοινότητα για την αξιολόγηση της

ασφάλειας της BPS. Έτσι, έχει μεγάλο ενδιαφέρον η μελέτη της επίδρασής της στις κυτταρικές σειρές, καθώς η αξιολόγηση των *in vitro* αποτελεσμάτων (κυτταροκαλλιέργειες) μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών κυτταροτοξικότητας και στην επιβεβαίωση ή απόρριψη των επιπέδων ασφαλούς χρήσης της.

Ύστερα από τη διεξαγωγή των προαναφερθέντων πειραματικών διαδικασιών, από τα αποτελέσματα μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά Ishikawa φαίνεται να μην επηρεάστηκε σημαντικά από καμία από τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του BPS παρόλο που γνωρίζουμε ότι είναι κυτταροτοξικό. Αυτό οφείλεται στις συγκεκριμένες ποσότητες του BPS που χρησιμοποιήθηκαν και στο γεγονός ότι οι καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι γενικά πιο ανθεκτικές. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποίησαν την ίδια κυτταρική σειρά Ishikawa και παρόμοιες συγκεντρώσεις BPS οδηγήθηκαν σε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της παρούσας διπλωματικής. (Benjamin et al., 2023), (Fan et al., 2021).

Στην πρώτη μελέτη (Fan et al., 2021) χρησιμοποίησαν δεκτικά κύτταρα ενδομητρίου Ishikawa για να αξιολογήσουν τις επιδράσεις των BPA, BPS και BPF στην δεκτικότητα του ενδομητρίου, τις εκφράσεις γονιδίων και την εμφύτευση εμβρύου χρησιμοποιώντας μια *in vitro* δοκιμασία συν-καλλιέργειας. Τα κύτταρα Ishikawa εκτέθηκαν σε 0,01–100μM BPA, BPS ή BPF για 1 έως 3 ημέρες. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αξιολογήθηκε και συγκρίθηκε με control. Η υψηλή συγκέντρωση (100 μM) BPA, BPS και BPF, αλλά όχι οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις, μείωσαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από 1 σε 3 ημέρες (Εικόνα 9). Η μείωση στον πολλαπλασιασμό ήταν πιο εμφανής ( $p < 0,05$ ) με 100 μM BPA τις ημέρες 2 και 3 σε σύγκριση με το BPF και το BPS.



Εικόνα 9. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων Ishikawa που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις BPA, BPF και BPS (0,01 έως 100 μM) τις ημέρες 1, 2 και 3.

Επομένως, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής όπου χρησιμοποιήθηκε μικρότερη συγκέντρωση BPS από 100μM, το ότι δεν παρατηρήθηκε μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών μέσα στο πέρασ 2 ημερών, συμβαδίζει με την παραπάνω μελέτη.

Στη δεύτερη μελέτη που ήρθε αργότερα χρονολογικά (Benjamin et al., 2023), ήθελαν να προσδιορίσουν εάν η BPS προκαλεί πολλαπλασιασμό και μετανάστευση κυττάρων σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου (Ishikawa) και σε ιστούς της μήτρας ενηλικού ποντικού. Τα κύτταρα Ishikawa εκτέθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις BPS (1 nM και 100 nM) για 72 ώρες και έπειτα αξιολογήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε 1 και 100 nM BPS για να αντικατοπτρίσει τη φυσιολογικά σχετική συγκέντρωση των οιστρογόνων που βρίσκονται στους ανθρώπινους ορούς. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις, η BPS αύξησε σημαντικά τον συνολικό αριθμό των κυττάρων Ishikawa.

Επομένως, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής όπου χρησιμοποιήθηκε μικρότερη συγκέντρωση BPS από 100nM, το ότι δεν παρατηρήθηκε μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καλλιιεργειών μέσα στο πέρας 2 ημερών, συμβαδίζει με αυτή τη μελέτη καθώς και με την παραπάνω.

Επιπλέον, με την μέτρηση των νιτρικών/νιτρωδών καταφέραμε να παρατηρήσουμε μεταβολική δραστηριότητα σε χαμηλά επίπεδα.

Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι αδιαμφισβήτητα και οριστικά και χρίζονται περαιτέρω μελέτης. Οι μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να στοχεύσουν στα εξής: Να έχουν τον απαιτούμενο βαθμό επαναληψιμότητας, να χρησιμοποιήσουν τις ίδιες ή διαφορετικές συγκεντρώσεις BPS στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου ενδομητρίου αδενοκαρκινώματος Ishikawa ή ακόμα και σε άλλες κυτταρικές σειρές αναπαραγωγικού ιστού, να παρατηρήσουν αν αλλάζει και πως η μορφολογία των κυττάρων αυτών πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την προσθήκη BPS, να παρατηρήσουν τη ρύθμιση των β-οιστρογονικών υποδοχέων και πως αυτοί αντιδρούν στην προσθήκη BPS καθώς και να γίνουν όλα αυτά τα πειράματα in vitro σε πειραματόζωα. Επίσης, σε μία πρόσφατη μελέτη (Huifeng et al., 2023), ενήλικα θηλυκά ποντίκια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με BPS για 28 μέρες και μετά από αυτό, οι μήτρες και οι ωοθήκες συλλέχθηκαν για ιστοπαθολογική εξέταση. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η BPS προκαλεί ορισμένες ιστοπαθολογικές αλλαγές, μεταβάλλει τις εκφράσεις των γονιδίων του κέντρου, ενισχύει τους όγκους της μήτρας και των ωοθηκών ή ακόμη και τον κίνδυνο καρκίνου. Οπότε σημαντικό θα ήταν να μελετηθούν περαιτέρω τα συγκεκριμένα γονίδια. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η BPA και τα ανάλογά της (BPS και BPF) τροποποιούν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ενδοκρινική οδό και στην απόπτωση (Morales et al., 2020), καθώς και σχετικά με το οξειδωτικό στρες και την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Nguyen et al., 2022). Επομένως, μεγάλης σημασίας θα είναι στο μέλλον να μελετηθούν παραπάνω τα συγκεκριμένα γονίδια. Τέλος, σε δύο διαφορετικές μελέτες βρέθηκε ότι, 1) (McCabe et al., 2020) Αυξανόμενες συγκεντρώσεις BPA συσχετίστηκαν με χαμηλότερη μεθυλίωση του DNA στο 87% των σημαντικών θέσεων στα λευκοκύτταρα του αίματος του ομφάλιου λώρου των βρεφών. 2) (Brulport et al., 2020). Η έκθεση στη BPS σε διάφορες βιολογικές οδούς που σχετίζονται με τη μεταβολική ρύθμιση του ήπατος προκαλεί επίσης υπομεθυλίωση στο 58,5% των διαφορετικά μεθυλιωμένων περιοχών (DMR). Οπότε υψηλού ενδιαφέροντος στο μέλλον θα ήταν οι μελέτες που στοχεύουν στην ανίχνευση των μεθυλίωσεων μετά από έκθεση σε BPS.

## 7. Βιβλιογραφία

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221.
- Aghajanpour-Mir, S. M., Zabihi, E., Akhavan-Niaki, H., Keyhani, E., Bagherizadeh, I., Biglari, S., & Behjati, F. (2016). The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 Cell Line and Amniocytes. *International journal of molecular and cellular medicine*, 5(1), 19–29.
- Basak, S., Das, M. K., & Duttaroy, A. K. (2020). Plastics derived endocrine-disrupting compounds and their effects on early development. *Birth Defects Research*, 112(17), 1308–1325.
- Benjamin, K., Marquez, C. M., Morta, M., Reyes, E. M., Aragonés, L., & Velarde, M. (2023). Bisphenol S Increases Cell Number and Stimulates Migration of Endometrial Epithelial Cells. *Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies*, 38(1), 13–22.
- Bisphenols - ECHA. (n.d.). Echa.europa.eu. <https://echa.europa.eu/hot-topics/bisphenols>
- Björnsdotter, M. K., de Boer, J., & Ballesteros-Gómez, A. (2017). Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere*, 182, 691–706.
- Boskey, E. (2020, January 27). The fallopian tubes transport the eggs from the ovaries to the uterus. *Verywell Health*.
- Brulport, A., Vaiman, D., Bou-Maroun, E. *et al.* (2020). Hepatic transcriptome and DNA methylation patterns following perinatal and chronic BPS exposure in male mice. *BMC Genomics* 21, 881.
- Carolyn F McCabe, Vasantha Padmanabhan, Dana C Dolinoy, Steven E Domino, Tamara R Jones, Kelly M Bakulski, Jaclyn M Goodrich, (2020) Maternal environmental exposure to bisphenols and epigenome-wide DNA methylation in infant cord blood, *Environmental Epigenetics*, Volume 6, Issue 1, dvaa021.
- Çelik, T. A. (2018). Introductory Chapter: Cytotoxicity. InTech.
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.-L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5438–5453.
- Chen, M.-Y., Ike, M., & Fujita, M. (2002). Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*, 17(1), 80–86.
- Cimmino, I., Fiory, F., Perruolo, G., Miele, C., Beguinot, F., Formisano, P., & Oriente, F. (2020). Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5761.

de Angelis, A., Ingallina, P., & Perego, C. (2004). Solid Acid Catalysts for Industrial Condensations of Ketones and Aldehydes with Aromatics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43(5), 1169–1178.

Fan, H., Fernando, S. R., Jiang, L., Wang, Z., Kodithuwakku, S. P., Wong, C. K. C., Ng, E. H. Y., et al. (2021). Bisphenol A Analogues Suppress Spheroid Attachment on Human Endometrial Epithelial Cells through Modulation of Steroid Hormone Receptors Signaling Pathway. *Cells*, 10(11), 2882. MDPI AG.

Female reproductive organs. (n.d.). [www.amboss.com](https://www.amboss.com/us/knowledge/Female_reproductive_organ).  
[https://www.amboss.com/us/knowledge/Female\\_reproductive\\_organ](https://www.amboss.com/us/knowledge/Female_reproductive_organ)

Fiege, H., Voges, H.-W., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y., Buysch, H.-J., Garbe, D., & Paulus, W. (2000). Phenol Derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.

Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.-P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.-M., Pussemier, L., Scippo, M.-L., Van Loco, J., & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3725–3740.

Geens, T., Goeyens, L., & Covaci, A. (2011). Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(5), 339–347.

Glausiusz, J. (2014). Toxicology: The plastics puzzle. *Nature*, 508(7496), 306–308.

Grignard, E., Lapenna, S., & Bremer, S. (2012). Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology in Vitro*, 26(5), 727–731.

Huifeng Yue, Yuchai Tian, Xiaoyun Wu, Xiaowen Yang, Pengchong Xu, Huizhen Zhu, Nan Sang. (2023) Exploration of the damage and mechanisms of BPS exposure on the uterus and ovary of adult female mice. *Science of The Total Environment*, Volume 868, 161660, ISSN 0048-9697.

Huo, X., Chen, D., He, Y., Zhu, W., Zhou, W., & Zhang, J. (2015). Bisphenol-A and Female Infertility: A Possible Role of Gene-Environment Interactions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(9), 11101–11116.

Jalal, N., Surendranath, A. R., Pathak, J. L., Yu, S., & Chung, C. Y. (2018). Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology Reports*, 5, 76–84.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2019). *T cell-mediated cytotoxicity*. Nih.gov; Garland Science.

Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2014). Chapter 1—Endocrinology, Brain, and Pituitary Gland. In R. E. Jones & K. H. Lopez (Eds.), *Human Reproductive Biology (Fourth Edition)* (pp. 3–22). Academic Press.

Judson, R., Houck, K., Martin, M., Richard, A. M., Knudsen, T. B., Shah, I., Little, S., Wambaugh, J., Woodrow Setzer, R., Kothiya, P., Phuong, J., Filer, D., Smith, D., Reif, D., Rotroff, D., Kleinstreuer, N., Sipes, N., Xia, M., Huang, R., Crofton, K., ... Thomas, R. S. (2016). Editor's Highlight: Analysis of the Effects of Cell Stress and Cytotoxicity on In Vitro Assay Activity Across a Diverse Chemical and Assay Space. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 152(2), 323–339.

Lehman-McKeeman L.D. (2019). Mechanisms of toxicity. Klaassen C.D.(Ed.), Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 9th edition. McGraw Hill.

Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V. D., Mohd, M. A., Moon, H.-B., Nakata, H., & Kannan, K. (2012). Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environmental Science & Technology*, 46(12), 6860–6866.

Matuszczak, E., Komarowska, M. D., Debek, W., & Hermanowicz, A. (2019). The Impact of Bisphenol A on Fertility, Reproductive System, and Development: A Review of the Literature. *International journal of endocrinology*, 2019, 4068717.

Meyer, J. D., McDiarmid, M., Diaz, J. H., Baker, B. A., & Hieb, M. (2016). Reproductive and Developmental Hazard Management. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 58(3), e94–e102.

Mónica Morales, Mercedes de la Fuente, Raquel Martín-Folgar. (2020). BPA and its analogues (BPS and BPF) modify the expression of genes involved in the endocrine pathway and apoptosis and a multi drug resistance gene of the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera), *Environmental Pollution*, Volume 265, Part A, 114806, ISSN 0269-7491,

National Cancer Institute. (2019). Introduction to the reproductive system | SEER training. Cancer.gov. Retrieved from <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/reproductive/>

Nguyen, J. D., & Duong, H. (2022). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Female External Genitalia. PubMed; StatPearls Publishing

Nguyen, M., Sabry, R., Davis, O. S., & Favetta, L. A. (2022). Effects of BPA, BPS, and BPF on Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Expression in Bovine Oocytes and Spermatozoa. *Genes*, 13(1), 142.

Park C. (2020). Reproductive toxic agents in work environments and related cases in Korea. *Yeungnam University journal of medicine*, 37(1), 22–31.

Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., & Vidugiriene, J. (2004). Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells (G. S. Sittampalam, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. P. Austin, J. Baell, B. Bejcek, J. M. M. Caaveiro, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanaryan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, S. R. J. Hoare, J. Inglese, & P. W. Iversen, Eds.). PubMed; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Riss, T. L., Moravec, R. A., & Niles, A. L. (2011). Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 740, 103–114.

Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., & Vidugiriene, J. (2019). Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In S. Markossian (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42(42), 132–155.

Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental health perspectives*, 123(7), 643–650.

Rogers, K. (2014). Bisphenol A | chemical compound. In *Encyclopædia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/bisphenol-A>

Rotondo, E., & Chiarelli, F. (2020). Endocrine-Disrupting Chemicals and Insulin Resistance in Children. *Biomedicines*, 8(6).

Siracusa, J. S., Yin, L., Measel, E., Liang, S., & Yu, X. (2018). Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review. *Reproductive Toxicology*, 79, 96–123.

Song, Y., Xie, P., & Cai, Z. (2018). Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(6), 495–502.

Terasaki, M., Nomachi, M., Edmonds, J. S., & Morita, M. (2004). Impurities in industrial grade 4,4'-isopropylidene diphenol (bisphenol A): possible implications for estrogenic activity. *Chemosphere*, 55(6), 927–931.

Thoene, M., Dzika, E., Gonkowski, S., & Wojtkiewicz, J. (2020). Bisphenol S in Food Causes Hormonal and Obesogenic Effects Comparable to or Worse than Bisphenol A: A Literature Review. *Nutrients*, 12(2), 532.

Thoene, M., Rytel, L., Nowicka, N., & Wojtkiewicz, J. (2018). The state of bisphenol research in the lesser developed countries of the EU: a mini-review. *Toxicology Research*, 7(3), 371–380.

Timbrell, J. (2019). *Introduction to Toxicology*. CRC Press.

Topham, N. J., & Hewitt, E. W. (2009). Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*, 128(1), 7–15.

Toragall, M., C. Ghagane, S., B. Nerli, R., & B. Hiremath, M. (2022). *Reproductive Toxicology: An Update*. IntechOpen.

Valentino, R., D'Esposito, V., Ariemma, F., Cimmino, I., Beguinot, F., & Formisano, P. (2016). Bisphenol A environmental exposure and the detrimental effects on human



metabolic health: is it necessary to revise the risk assessment in vulnerable population?. *Journal of endocrinological investigation*, 39(3), 259–263.

Van Landuyt, K. L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., Scheers, H., Godderis, L., Hoet, P., & Van Meerbeek, B. (2011). How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental Materials*, 27(8), 723–747.

Vasiljevic, T., & Harner, T. (2021). Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Science of the Total Environment*, 789, 148013.

Vogel, S. A. (2009). The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A “Safety.” *American Journal of Public Health*, 99(S3), S559–S566.

Wehbe, Z., Nasser, S. A., El-Yazbi, A. F., Salam Nasreddine, & Eid, A. H. (2020). Estrogen and Bisphenol A in Hypertension. *Current Hypertension Reports*, 22(3).

Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C. S., Zoeller, R. T., & Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 178–198.

Wu, L.-H., Zhang, X.-M., Wang, F., Gao, C.-J., Chen, D., Palumbo, J. R., Guo, Y., & Zeng, E. Y. (2018). Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *The Science of the Total Environment*, 615, 87–98.

Xue, J., Liu, W., & Kannan, K. (2017). Bisphenols, Benzophenones, and Bisphenol A Diglycidyl Ethers in Textiles and Infant Clothing. *Environmental Science & Technology*, 51(9), 5279–5286.

Žalmanová, T., Hořková, K., Nevoral, J., Prokešová, Š., Zámotná, K., Kott, T., & Petr, J. (2016). Bisphenol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regrettable substitution – a review. *Czech Journal of Animal Science*, 61(No. 10), 433–449.

Αριστείδης Αντσακλής. (2010). Μαιευτική και γυναικολογία. Παρισιάνου Α.Ε.

ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΔΕΛΗΓΕΩΡΟΓΛΟΥ ΕΥΘΥΜΙΟΣ, ΠΑΠΑΝΤΩΝΙΟΥ ΝΙΚΟΛΑΟΣ,  
ΠΑΠΠΑ ΚΑΛΛΙΟΠΗ. (2017) . ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ. BROKEN HILL  
PUBLISHERS LTD