

EARLY LIFE CO-EXPOSURE TO PLASTICIZERS AND METALS DYSREGULATES UREA CYCLE AND CHOLINE METABOLISM WITH ADVERSE EFFECTS ON NEURODEVELOPMENT: A HIGH DIMENSION BIOLOGICAL ANALYSIS PARADIGM

Dimosthenis Sarigiannis^{1,2,3,*}, Nafsika Papaioannou^{1,2}, Spyros Karakitsios^{1,2,3}

¹ Aristotle University of Thessaloniki, Department of Chemical Engineering, Environmental Engineering Laboratory, University Campus, Thessaloniki 54124, Greece

² HERACLES Research Center on the Exposome and Health, Center for Interdisciplinary Research and Innovation, Balkan Center, Bldg. B, 10th km Thessaloniki-Thermi Road, 57001, Greece

³ School for Advanced Study (IUSS), Science, Technology and Society Department, Environmental Health Engineering, Piazza della Vittoria 15, Pavia 27100, Italy

(*sarigiannis@auth.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μελέτη των επιπτώσεων της συνέκθεσης σε φθαλικούς εστέρες και μέταλλα στη νευροανάπτυξη μέσω της εφαρμογής τεχνικών συστημικής βιολογίας σε in vitro μοντέλα. Πραγματοποιήθηκε έκθεση ηπατικών κυττάρων HepaRG σε δυο μίγματα φθαλικών εστέρων, οι συγκεντρώσεις των οποίων υπολογίστηκαν με την πλατφόρμα INTEGRA, αξιοποιώντας δεδομένα ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μεταγραφομική, πρωτεομική και μεταβολομική ανάλυση, καθώς και βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν με χρήση του λογισμικού GeneSpring v.14.9. Την εύρεση των βιοδεικτών με σημαντική στατιστικά διαφορική έκφραση συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δειγμάτων που εκτέθηκαν στα δυο προαναφερθέντα μίγματα με αυτά των δειγμάτων εσωτερικού ελέγχου ποιότητας, ακολούθησε η ανάλυση κατά συστάδες, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση των γονιδίων, των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών σε βιοχημικά μονοπάτια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μεταβολικών μονοπατιών η έκθεση σε φθαλικούς εστέρες και βαρέα μέταλλα οδηγεί σε διατάραξη μεταβολικών οδών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του κιτρικού οξέος, των φωσφολιπιδίων, και της χολίνης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη αυτή αποτελεί μέρος του μεγαλύτερου ευρωπαϊκού προγράμματος HEALS (Health and Environment-wide Associations based on Large population Surveys) για το εκθεσίωμα, δηλαδή τη μελέτη των επιπτώσεων της συνολικής έκθεσης κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου από τη στιγμή της σύλληψης του [1]. Η ερευνητική ομάδα του HEALS προτείνει τη λειτουργική ενσωμάτωση των δεδομένων από ομικές αναλύσεις (μεταγραφομική, πρωτεομική, μεταβολομική κτλ) για την εξαγωγή αιτιατών συσχετίσεων της έκθεσης και των επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία.

Κατά τη διάρκεια των προηγούμενων ετών, πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση 600 συνολικά δειγμάτων ούρων και πλάσματος από δυο προϋπάρχουσες μελέτες κοορτής (Repro και PHIME) με στόχο την εύρεση βιοδεικτών έκθεσης σε φθαλικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα. Η μελέτη REPRO PL αφορά την αξιολόγηση της επίδρασης της προγεννητικής έκθεσης, αλλά και της έκθεσης κατά τα πρώτα χρόνια ζωής, σε ένα σύνολο ρυπαντών στην παιδική νευροανάπτυξη. Τα δείγματα της συγκεκριμένης μελέτης συλλέχθηκαν από μητέρες-παιδιά που ζούσαν στην περιοχή Łódź της Πολωνίας. Αντίστοιχα, τα δείγματα της μελέτης PHIME συλλέχθηκαν από μητέρες-παιδιά που ζούσαν στην Ελλάδα, την Κροατία, και τη Σλοβενία. Η μελέτη PHIME είχε ως στόχο την εύρεση συσχετίσεων μεταξύ της προγεννητικής έκθεσης στον υδράργυρο/μεθυλδράργυρο και τη νευροανάπτυξη. Τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων ερευνών υπέδειξαν αρνητική επίδραση της προγεννητικής συνέκθεσης σε 11 μεταβολίτες φθαλικών εστέρων και βαρέα μέταλλα, στη γνωστική, κινητική, και λεκτική ανάπτυξη των παιδιών.

Σκοπός, λοιπόν, αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη *in vitro* μοντέλων για την απόκτηση μηχανιστικής αντίληψης του τρόπου επίδρασης της συνέκθεσης σε φθαλικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα στην εμφάνιση νευροαναπτυξιακών διαταραχών.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα HepaRG εκτέθηκαν σε δυο μείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων που αποτελούνταν από φθαλικό δι(2-αιθυλοεξυλο) εστέρα (DEHP), φθαλικό δισονοξύλιο (DiNP), φθαλικό βουτυλεστέρα (BBP), μεθυλυδράργυρο και ολικό υδράργυρο. Οι συγκεκριμένοι ρύποι επιλέχθηκαν γιατί βρέθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε δείγματα προερχόμενα από τις μελέτες REPRO PL και PHIME. Οι αποτελεσματικές *in vitro* συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών υπολογίστηκαν μέσω εκτίμησης από δεδομένα ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης, χρησιμοποιώντας την υπολογιστική πλατφόρμα INTEGRA [2].

Κυτταροκαλλιέργεια αποτελούμενη από 30.000 κύτταρα/cm², πολλαπλασιάστηκε για 2 εβδομάδες σε Williams' Media E εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μόσχου (fetal calf serum, FCS), 50μM ημηλεκτρική υδροκορτιζόνη, 4 μg/mL ινσουλίνη, 500 UI/mL πενικιλίνη στρεπτομυκίνη και 2mM γλουταμίνη. Για να προκληθεί διαφοροποίηση, 1,5% DMSO προστέθηκε στο μέσο. Τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν πλήρως εντός 15 ημερών. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα υποβλήθηκαν σε κατεργασία με θρυψίνη και σπάρθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 6 φρεατίων με πυκνότητα 210.000 κύτταρα/cm². Εβδομήντα δύο ώρες αργότερα, το μέσο άλλαξε και 48 ώρες αργότερα, άρχισαν οι θεραπείες με τα μείγματα ρυπαντών που προαναφέρθηκαν.

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις ρυπαντών στα δύο μείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την προσομοίωση της ημι-χρόνια έκθεσης σε φθαλικούς εστέρες και βαρέα μέταλλα κατόπιν μοντελοποίησης με την υπολογιστική πλατφόρμα INTEGRA.

Ρυπαντής	Μίγμα 1	Μίγμα 2
DEHP	2,5nM	25nM
DiNP	5nM	50nM
BBzP	0,2nM	2nM
PbNO ₃	30nM	300nM
THg	1μg/mL	10μg/mL
MeHg	1μg/mL	10μg/mL

Τα ίδια κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία σε παράλληλες πλάκες για την παρασκευή δειγμάτων για τις διαφορετικές αναλύσεις οπics. Για την παρασκευή των δειγμάτων για την μεταγραφομική ανάλυση, το μέσο αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 350 μL ρυθμιστικού διαλύματος RLT με 10% β-μερκαπτοαιθανόλη σε κάθε ένα από τα 6 φρεάτια της πλάκας καλλιέργειας. Τα δείγματα καταψύχθηκαν στους - 20 ° C μέχρι την εκχύλιση RNA. Το RNA εκχυλίστηκε με χρήση του κιτ RNeasy Mini (Qiagen) σε αυτοματοποιημένο Qiacube. Η παρασκευή δειγμάτων για πρωτεομική και μεταβολική ανάλυση συμπεριέλαβε πλύση κυττάρων 5 φορές με παγωμένο PBS, ακολουθούμενη από προσθήκη 150 μL πρωτεϊνικού ρυθμιστικού διαλύματος (8M ουρία, 0.1% SDS, 50mM όξινο ανθρακικό αμμώνιο) σε κάθε φρεάτιο πλάκας καλλιέργειας. Το προϊόν λύσης φυγοκεντρήθηκε στα 13000 g για 30 λεπτά στους 4 ° C. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε έναν υγρό χρωματογράφο nanoAcquity (Waters) συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Η παρασκευή δειγμάτων για τη μεταβολομική μελέτη περιελάμβανε την προσθήκη 1 mL μεθανόλης ποιότητας LS/MS, ακολουθούμενης από 1 mL νερού LS/MS. Τα κύτταρα διαχωρίστηκαν με τη χρήση scraper κυττάρων και μεταφέρθηκαν σε ένα falcon των 15 ml. Προστέθηκαν 4 mL χλωροφορμίου ακολουθούμενα από έντονη ανακίνηση. Το μίγμα επώαστηκε για 30 λεπτά σε πάγο και προστέθηκαν 2mL νερό LS/MS. Μετά από φυγοκέντρηση στα 3000 g για

20 λεπτά στους 4 ° C, η ανώτερη και η κατώτερη φάση μεταφέρθηκαν αντίστοιχα σε σωλήνες Eppendorf των 1,5 ml και καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο. Για τη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μοντέλο LTQ Orbitrap Discovery MS με στήλη Acquility UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 μm, Waters, Milford, MA, Η.Π.Α.). Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 ° C πριν την ανάλυση.

Τα πρωτογενή αρχεία δεδομένων (.cel) που προέκυψαν από τη μεταγραφομική ανάλυση με χρήση του Affymetrix Human 2_0-st εισήχθησαν στο λογισμικό GeneSpring GX v.14.9 (Agilent Technologies). Ο αλγόριθμος RAM (Robust Multichip Mediation) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των δεδομένων. Τα δεδομένα .raw που προέκυψαν από την πρωτεομική ανάλυση υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το λογισμικό MaxQuant. Η μηχανή αναζήτησης Andromeda χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση στη βάση δεδομένων SwissProt Human χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες παραμέτρους: Ανοχή μάζας πεπτιδίου: 20 ppm και ανοχή μάζας θραύσματος: 0,6 Da. Συνολικά, 3350 πρωτεΐνες ποσοτικοποιήθηκαν από έναν μέσο όρο 11800 αναγνωρισμένων πεπτιδίων ανά δείγμα. Το αρχείο .csv των 3350 προσδιορισμένων πρωτεϊνών εισήχθη στο λογισμικό GeneSpring GX για περαιτέρω στατιστική ανάλυση. Οι μεταβολίτες προσδιορίστηκαν με χρήση του λογισμικού MZMine v2.31. Μετά την εισαγωγή των δεδομένων, επιλέχθηκαν οι κορυφές μάζας, ευθυγραμμίστηκαν, και ακολούθησε αποσυνέλιξη με χρήση του αλγόριθμου Wavelet (XCMS) για την εξάλειψη του θορύβου, εξαγώντας έτσι μόνο τις βιολογικά σχετικές πληροφορίες. Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων HMDB και Metlin θέτοντας ανοχή μάζας 5ppm. Τέλος, περισσότεροι από 1000 μεταβολίτες εισήχθησαν στο GeneSpring GX για περαιτέρω ανάλυση.

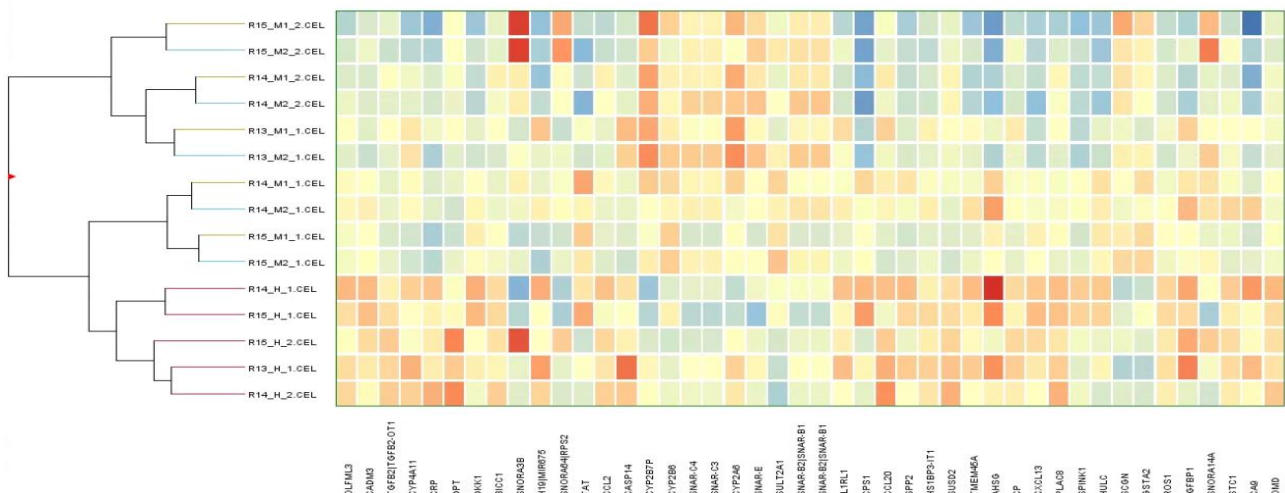
Η μετέπειτα βιοπληροφορική ανάλυση των προαναφερθέντων δεδομένων από τις ομικές αναλύσεις περιλάμβανε τον ποιοτικό έλεγχο, τη χρήση προηγμένων στατιστικών μεθόδων για την εύρεση των διαφοροποιημένων γονιδίων, πρωτεϊνών και μεταβολιτών, ανάλυση κατά συστάδες, καθώς και την ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών χρησιμοποιώντας το λογισμικό GeneSpring GX V.14.9 (Agilent Technologies). Η ανάλυση μεταβολής επιπέδων έκφρασης (fold-change) χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση βιοδεικτών με σημαντικά διαφοροποιούμενη έκφραση μεταξύ του μίγματος 1 και 2 αντίστοιχα, και του δείγματος ελέγχου. Ακολούθησε ανάλυση συστάδων (Hierarchical Clustering analysis) στο σύνολο των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων. Η ευκλείδεια απόσταση χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της απόστασης μεταξύ των ενδιάμεσων συμπλεγμάτων κατά τον υπολογισμό των βαθμών ομοιότητας. Η ομοιότητα μεταξύ συμπλεγμάτων για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε με βάση τη μέθοδο Ward. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανάλυση συστάδων των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών και μεταβολιτών. Σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, πρωτεΐνες και μεταβολίτες χαρτογραφήθηκαν σε διαθέσιμα μεταβολικά δίκτυα από τις βάσεις δεδομένων WikiPathways, BioCyC και KEGG. Η υπερεγεωμετρική κατανομή χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της τιμής p που καθορίζει την πιθανότητα να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των βιοδεικτών στη λίστα οντοτήτων και των μονοπατιών ($p \leq 0,1$, Ελάχιστη αντιστοίχιση ≥ 1). Για τη διόρθωση των τιμών p, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Benjamini και Hochberg, γνωστή και ως Ποσοστό Εσφαλμένων Ανακαλύψεων (False Discovery Rate, FDR).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μεταγραφομικής και πρωτεϊνικής, τα μεταβολικά μονοπάτια που περιγράφουν τον μεταβολισμό του φυλλικού οξέος και της ουρίας έχουν διαταραχθεί κατόπιν συνέκθεσης σε φθαλικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα. Η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και της ικανότητας του κυττάρου να αποτοξινώνεται, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε περίπτωση που ο εγκέφαλος εκτίθεται παρατεταμένα σε αυξημένο οξειδωτικό στρες λόγω της παρουσίας διεγερτικών αμινοξέων, των οποίων ο μεταβολισμός τελειώνει με την παραγωγή ROS, υπάρχει

αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης νευροαναπτυξιακής διαταραχής. Επιπρόσθετα, απορρύθμιση του κύκλου του κιτρικού οξέος, και του μεταβολισμού των αμινοξέων διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην παθογένεση του οξειδωτικού στρες, που μπορεί να είναι αποτέλεσμα έκθεσης σε φθαλικές ενώσεις και μέταλλα. Η συν-έκθεση σε φθαλικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της ικανότητας του κυττάρου να τις αποτοξινώνεται [3], γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης.

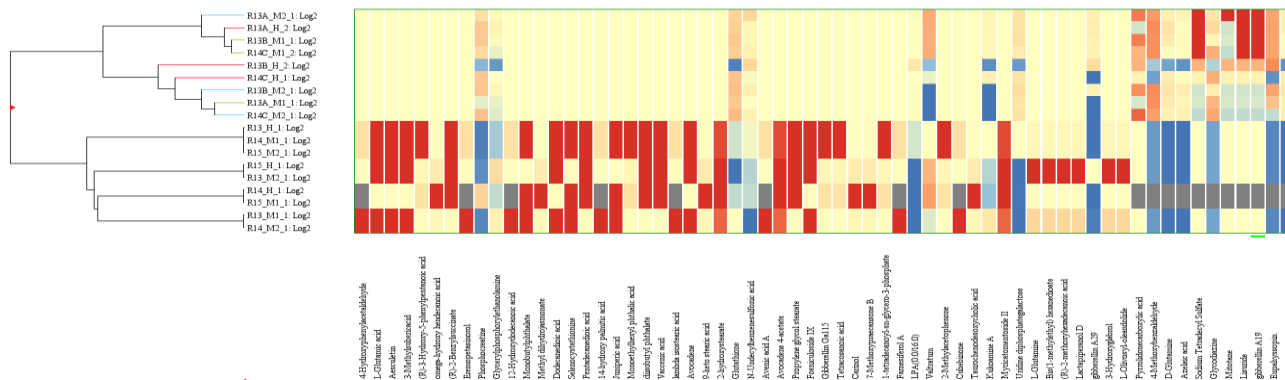
Η χολίνη διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους που αφορούν τόσο τη δομή όσο και τη μεταγωγή του σήματος εντός των κυττάρων, συμμετέχοντας έτσι στον σχηματισμό της πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (VLDL), των φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλοχολίνης και σφιγγομυελίνης) και της ακετυλοχολίνης (ACh) που ανήκει στην κατηγορία των νευροδιαβιβαστών. Επιπλέον, η χολίνη λειτουργεί ως δότης μεθυλίου, με αποτέλεσμα να αποτελεί σημαντικό παράγοντα της ρύθμισης της αντιγραφής του DNA, της λειτουργίας των πρωτεϊνών και τον μεταβολισμό των ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων. Κατόπιν κυτταρικής πρόσληψης, η χολίνη φωσφορυλιώνεται σε φωσφοχολίνη ή οξειδώνεται μη αναστρέψιμα σε βεταΐνη, η οποία λειτουργεί ως δότης μεθυλομάδων στην ομοκυστεΐνη, για την παραγωγή του βασικού αμινοξέος μεθειονίνη. Η χολίνη μπορεί να συντεθεί ενδογενώς με μεθυλίωση της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, μια διαδικασία που συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ, αλλά εμφανίζεται επίσης και στα νευρικά κύτταρα. Η έκθεση στον φθαλικό εστέρα DEHP και τους μεταβολίτες του μπορεί να προκαλέσει αύξηση της παραγωγής της φωσφατιδυλοχολίνης [4]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το επίπεδο 10 κατηγοριών λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των, φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλσερίνη, και σφιγγομυελίνη, αυξήθηκε σημαντικά κατόπιν έκθεσης σε φθαλικές ενώσεις, με την έκθεση σε MEHP και EHA να εμφανίζει γενικά υψηλότερες αυξήσεις σε σύγκριση με την έκθεση σε DEHP [5]. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας ενισχύουν τα προαναφερθέντα συμπεράσματα, αφού μετά την έκθεση σε φθαλικές ενώσεις και μέταλλα, η μεταβολική οδός της βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης I έχει διαταραχθεί σύμφωνα με την multi-omics ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών.



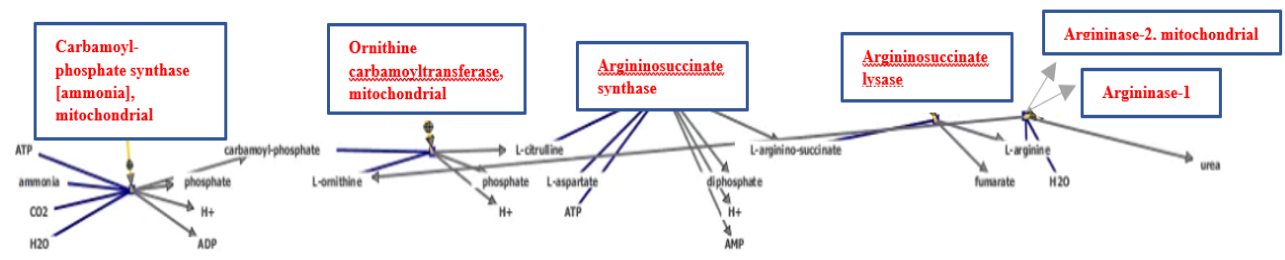
Σχήμα 1. Ανάλυση συστάδων των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων. Η δυσλειτουργία των H19, CYP2B6 και AHS9, που βρέθηκαν να έχουν διαφορετική έκφραση στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε φθαλικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα, έχει συνδεθεί με νευροαναπτυξιακές διαταραχές.



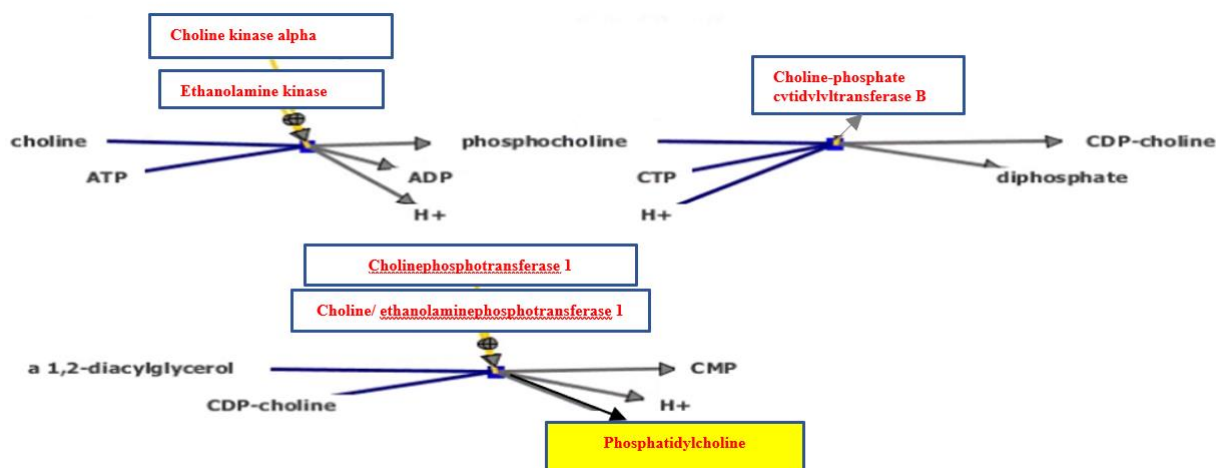
Σχήμα 2. Ανάλυση συστάδων των σημαντικά διαφορικά εκφρασμένων πρωτεϊνών. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες ήταν σημαντικά απορρυθμισμένες μετά από έκθεση στο M2, αλλά όχι στο M1, υποδηλώνοντας τη συσχέτιση της εμφάνισης νευροαναπτυξιακών προβλημάτων με την έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις φθαλικών ενώσεων και βαρέων μετάλλων.



Σχήμα 3. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης συστάδων των σημαντικά διαφορικά μεταβολιτών, 37 και 35 μεταβολίτες εμφάνισαν μειωμένη έκφραση στην περίπτωση των M1 και M2 αντίστοιχα, ενώ 37 και 39 μεταβολίτες εμφάνισαν αυξημένη έκφραση στην περίπτωση των M1 και M2 αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου.



Σχήμα 4. Διαταραγμένος κύκλος ουρίας σύμφωνα με την multi-omics ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών. Η έκφραση των αργινάση-1, αργινάση-2 (μιτοχονδριακής), συνθετάσης αργινουκκινάτης, συνθάσης καρβονυλίου-φωσφορικού (μιτοχονδριακού), καρβαμούλοτρανσφεράσης της ορνιθίνης (μιτοχονδριακής) και αργινοσουλινικής λυάσης, ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική (fold-change >1.5) μετά την συνέκθεση σε φθαλικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα.



Σχήμα 5. Τα *in vitro* μοντέλα επιβεβαίωσαν τη διατάραξη της βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης I μετά από συν-έκθεση σε φθαλικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα. Η έκφραση της χολινο-φωσφορικής κυτιδυλοτρανσφεράσης A και της φωσφατιδυλοχολίνης ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική (*fold-change* >1.5), οδηγώντας στην απορρύθμιση του μονοπατιού της βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης I.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά η multi-omics ανάλυση μεταβολικών οδών αποκάλυψε ότι η ταυτόχρονη έκθεση σε φθαλικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα οδηγεί στη διατάραξη του κύκλου ουρίας, αλλά και στη διατάραξη του μεταβολισμού της χολίνης, και κατ'έπείταση της φωσφατιδυλοχολίνης. Η ταυτοποίηση των προαναφερθέντων οδών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς έχουν τακτοποιηθεί και σε ανθρώπινα δείγματα από τις μελέτες REPRO PL και PHIME και έχουν συσχετιστεί με εξασθενημένη ψυχοκινητική ανάπτυξη σε παιδιά ηλικίας τριών έως έξι ετών. Εν κατακλείδι, η ταυτόχρονη έκθεση σε πλαστικοποιητές και μέταλλα διαταράσσει τις βιοχημικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή αναπνοή κατά τη διάρκεια κρίσιμων αναπτυξιακών σταδίων που συνδέονται κλινικά με νευροαναπτυξιακές διαταραχές.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Health and Environment-wide Associations based on Large population Surveys.-[HEALS]».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] C. P. Wild. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 14 (2005) 1847-1850.
- [2] D. A. Sarigiannis, Karakitsios S. P., Handakas E., Simou K., Solomou E., Gotti. *Food Chem. Toxicol.* 98 (2016) 134-147.
- [3] Nagwa A. Meguid, Ghozlan Said A. S., Mohamed Magda F., Ibrahim Marwa K., Dawood Reham M., Din Noha G. Bader El, Abdelhafez Tawfeek H., Hemimi Maha, Awady Mostafa K. El. *Biomarker insights* 12 (2017). 1177271917691035-1177271917691035.
- [4] P. A. Fowler, Bellingham M., Sinclair K. D., Evans N. P., Pocar P., Fischer B., Schaedlich K., Schmidt J. S., Amezaga M. R., Bhattacharya S., Rhind S. M., O'Shaughnessy P. J. *Molecular and cellular endocrinology* 355 (2012) 231-239.
- [5] Y. Xu, Knipp G. T., Cook T. J. *Archives of toxicology* 80 (2006) 293-298.