



Univerza v Ljubljani
Fakulteta za *farmacijo*

ANJA RIJAVEC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017



Univerza v Ljubljani
Fakulteta za *farmacijo*

ANJA RIJAVEC

**VPLIV RESVERATROLA IN NJEGOVIH ANALOGOVI NA AKTIVNOST
TIROIDNIH RECEPTORJEV, IZRAŽENIH V CELICAH GH3.TRE-Luc**

**THE INFLUENCE OF RESVERATROL AND ITS ANALOGS ON THE
MODULATION OF THYROID HORMONE RECEPTORS,
EXPRESSED IN GH3.TRE-Luc CELL LINE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo sem pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm., ter somentorstvom mlade raziskovalke asist. Maše Kenda, mag. farm., pripravila na Fakulteti za farmacijo na Univerzi v Ljubljani.

Iskreno se zahvaljujem mentoricama prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., ter mladi raziskovalki asist. Maši Kenda, mag. farm., za vso pomoč, potrpežljivost in usmerjanje, predvsem pa za vse predano znanje.

*Za pomoč in skupno osvajanje znanja se zahvaljujem tudi sodelavcu Vitu.
Grazie, Vito!*

Zahvala gre tudi vsem, ki ste mi brezpogojno stali ob strani vsak trenutek preteklih študijskih let.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm., in somentorstvom asist. Maše Kenda, mag. farm., na Fakulteti za farmacijo na Univerzi v Ljubljani.

Ljubljana, 2017

Anja Rijavec

KAZALO

| | |
|--|-----|
| KAZALO SLIK | iv |
| KAZALO PREGLEDNIC | iv |
| KAZALO PRILOG | iv |
| POVZETEK | v |
| ABSTRACT | vi |
| SEZNAM OKRAJŠAV | vii |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Endokrini sistem in njegovi motilci | 2 |
| 1.1.2. Ščitnica in tiroidni hormoni | 2 |
| 1.1.3. Hormonski motilci | 3 |
| 1.2. Tiroidni receptorji | 4 |
| 1.2.1 Struktura tiroidnih receptorjev | 4 |
| 1.2.2. Interakcije tiroidnih receptorjev z DNA | 5 |
| 1.3. Resveratrol | 6 |
| 1.3.1. Fizikalno-kemijske lastnosti resveratrola | 7 |
| 1.3.2. Farmakokinetika resveratrola | 7 |
| 1.3.3. Farmakodinamika resveratrola | 8 |
| 1.3.3.4. Resveratrol, rakava obolenja in protivnetno delovanje | 8 |
| 1.3.3.5. Resveratrol in srčno-žilna obolenja | 10 |
| 1.3.3.6. Protivnetni učinki resveratrola | 10 |
| 1.3.4. Toksičnost resveratrola | 11 |
| 1.4. Analogi resveratrola | 11 |
| 2. NAMEN NALOGE | 13 |
| 3. MATERIALI IN METODE DE LA | 14 |
| 3.1. Materiali | 14 |
| 3.1.1. Testirane spojine | 14 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2. Priprava raztopin testiranih spojin | 14 |
| 3.1.3. Celična linija: GH3.TRE-Luc | 16 |
| 3.2. Osnove dela s celicami | 16 |
| 3.2.1. Reagenti, uporabljeni pri delu s celicami..... | 17 |
| 3.3. Odmrzovanje celic..... | 18 |
| 3.4. Gojenje celic | 19 |
| 3.5. Presajanje celic | 19 |
| 3.6. Štetje celic | 20 |
| 3.6.1. Izračun števila in volumna celic | 21 |
| 3.7. Nasajanje celic..... | 21 |
| 3.8. Dodajanje testiranih spojin celicam..... | 22 |
| 3.9. Test citotoksičnosti z resazurinom – <i>test viabilnosti</i> | 22 |
| 3.10. Luciferazni test | 23 |
| 3.11. Statistična obdelava podatkov | 24 |
| 4. REZULTATI IN RAZPRAVA | 25 |
| 4.1. Citotoksičnost spojin – rezultati testa viabilnosti..... | 26 |
| 4.2. Agonistično in antagonistično delovanje spojin na tiroidne receptorje – rezultati luciferaznega testa | 29 |
| 5. SKLEP..... | 33 |
| LITERATURA..... | 36 |
| PRILOGE..... | a |
| Priloga 1:..... | a |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Kemijski strukturi: trans-resveratrola (levo) ter cis-resveratrola (desno). Konformacijski prehod pod navedenimi pogoji imenujemo fotoizomeracija (prirejeno po 50). | 7 |
| Slika 2: Strukturne razlike analogov (ZMP spojin) z resveratrolom (42). | 12 |
| Slika 3: Shema mrežne razdelitve hemocitometra. Štejemo (žive) celice v označenih kvadrantih, celice na robovih upoštevamo glede na zgornja navodila (prirejeno po 56). | 20 |
| Slika 4: Reakcija redukcije resazurina v viabilnih celicah (57). | 22 |
| Slika 5: Reakcija luciferina do oksiluciferina, pri kateri nastane bioluminiscenca (prirejeno po 58). | 23 |
| Slika 6: Predstavitev rezultatov testa viabilnosti - testiranje agonističnega učinka spojin. | 27 |
| Slika 7: Predstavitev rezultatov testa viabilnosti - testiranje antagonističnega učinka spojin. | 28 |
| Slika 8: Predstavitev rezultatov luciferaznega testa - testiranje agonističnega učinka spojin. | 30 |
| Slika 9: Predstavitev rezultatov luciferaznega testa - testiranje antagonističnega učinka spojin. | 31 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: Končne koncentracije ZMP spojin na plošči; sivo označene koncentracije smo prilagodili (zmanjšali) zaradi slabe topnosti spojin v DMSO. | 14 |
| Preglednica 2: Strukture v testiranju uporabljenih ZMP spojin ter resveratrola. | 15 |
| Preglednica 3: Strukture v testiranju uporabljenih kontrolnih spojin. | 16 |

KAZALO PRILOG

| | |
|---|---|
| Priloga 1: Shema nasaditve in tretiranja celic. | a |
|---|---|

POVZETEK

Pozitivnim učinkom antioksidativnih spojin je bilo v zadnjih letih posvečene veliko pozornosti, tudi med laičnimi potrošniki. Zaradi številnih mehanizmov, preko katerih vpliva na zdravje, je postal resveratrol priljubljena učinkovina, tako v prehrani, kot prehranskih dopolnilih in kozmetičnih izdelkih. Po vnosu v telo izkazuje dokazano pozitivne učinke na inhibicijo rakavih obolenj, zmanjšuje tveganje za srčno-žilne bolezni ter deluje protivnetno. Deluje antioksidativno, zato se uporablja tudi v kozmetičnih izdelkih za nanos na kožo, saj varuje pred radikali. Resveratrol in njegovi analogi pa bi se zaradi svoje kemijske strukture lahko vezali na hormonske receptorje ter tako delovali kot hormonski motilci – tudi na tiroidne receptorje. Vezava motilca ima lahko agonistični ali antagonistični učinek na receptor in s tem spremeni odziv tkiva na stanje okolice – ali pa se spremeni sintezna pot tiroidnih hormonov ali tiroidnih receptorjev. Naravna tiroidna hormona sta trijodtironin ter tetrajodtironin, ki ju proizvaja ščitnica. Izvedene so bile številne študije toksičnosti resveratrola na glodalcih, ki niso pokazale neželenih učinkov, prav tako jih niso pokazale študije na prostovoljcih. Velik problem pa je biorazpoložljivost resveratrola v organizmu, ki je zelo nizka, zato pripravljajo analoge resveratrola.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da resveratrol in njegovi analogi iz skupine spojin ZMP (v koncentracijah 5, 10, 20 in 25 μM , odvisno od testirane spojine) niso toksične za celično linijo GH3.TRE-Luc, nekatere pa pripomorejo k inhibiciji nadaljne rasti in razmnoževanja (resveratrol v koncentraciji 25 μM , ZMP-21 (25 μM) ter ZMP-24 (10 in 25 μM)).

Agonistični učinek na tiroidnih receptorjih glede na rezultate naše raziskave izkazujejo ZMP-23 (5 in 10 μM), antagonističnega pa ZMP-15 (10 in 15 μM), ZMP-17 (20 μM), ZMP-20 (25 μM) ter resveratrol v koncentracijah 10 in 25 μM .

Potrdili smo, da pri analogih resveratrola sicer lahko predvidevamo podobne učinke in delovanje kot pri resveratrolu, pa vendar vsakršna razlika v strukturi pomeni tudi potencialno drugačne učinke in potrebne odmerke za izražanje toksičnosti.

KLJUČNE BESEDE: *resveratrol, analogi resveratrola, hormonski motilci, tiroidni receptor, celična linija GH3.TRE-Luc*

ABSTRACT

In recent years, people, even the lay consumers, have paid a lot of attention to the positive effects of the antioxidative compounds. The various mechanisms through which it affects our health have contributed to the popularity of the substance resveratrol, which is now a desired ingredient not only in food but also in dietary supplements and cosmetic products. Resveratrol intake has demonstrably positive effects on the inhibition of the cancer diseases, reduces the risk of cardiovascular diseases and has an anti-inflammatory effect. Because of its antioxidant properties (it protects the skin from the reactive species), it is also used in skincare products. Due to their chemical structure, resveratrol, and its analogs could bind with hormone receptors as well as with thyroid receptors and thus act as endocrine disrupters. When the endocrine disrupter binds to the receptor, it can result in agonistic or antagonistic effect and change the tissue's response to the environmental conditions. Furthermore, the binding of the disruptor with the thyroid receptor can also block the binding of the natural hormone and have the antagonistic effect. Alternatively, it can change the synthetic route of the thyroid hormones or thyroid receptors. Triiodothyronine and tetraiodothyronine are hormones produced by the thyroid. Neither the various studies conducted on rodents nor the human volunteer studies showed any adverse effects of resveratrol, because the actual bioavailability of resveratrol in the organism is very low.

The results have shown, that resveratrol and his analogs (tested in concentrations 5, 10, 20 and 25 μM , it depends on the compound) do not appear cytotoxic to GH3.TRE-Luc cell line, but some of the compounds can inhibit further grow and proliferation of the cell line.

According to our research, ZMP-23 (5 and 10 μM) expresses agonistic potential. Antagonistic potencial on the thyroid receptor is expressed by ZMP-15 (10 and 15 μM), ZMP-17 (20 μM), ZMP-20 (25 μM) and resveratrol in concentrations 10 and 25 μM .

We have confirmed, that every change of the chemical structure of the resveratrol analog means potential change in the effect of the compound, but in general we can expect similar effects as with resveratrol.

KEYWORDS: *resveratrol, resveratrol analogs, endocrine disruptors, thyroid receptor, GH3.TRE-Luc cell line.*

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|----------------------|---|
| RSV | resveratrol |
| TR | tiroidni receptor |
| T₃ | trijodtironin |
| T₄ | tetrajodtironin/tiroksin |
| EDTA | Endocrine Disrupter Testing & Assessment Task Force Delovna skupina za preizkušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev |
| OECD | Organisation for Economic Cooperation and Development Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| RXR | retinoidni X receptor |
| TRE elementi | na tiroide odzivni elementi |
| UV | ultravijolični žarki |
| HAT | encimi histonske transacetilaze |
| HDA | encimi histonske deacetilaze |
| LPH | laktaza florizin hidrolaza |
| COX1 | ciklooksigenaza-1 |
| COX2 | ciklooksigenaza-2 |
| LDL | protein nizke gostote |
| ODC | ornitinska dekarboksilaza |
| ROS | reaktivne kisikove spojine |
| DMSO | dimetil sulfoksid |
| LAF | komora z laminarnim pretokom zraka |
| BPA | bisfenol A |
| PBS | fosfatni pufer |
| ATP | adenozin trifosfat |
| CCLR | lizirni pufer za celične kulture |

1. UVOD

Z naraščanjem zavedanja in poučenosti potrošnikov o pozitivnih učinkih delovanja antioksidantov se je oglaševanje in uporaba le-teh v kozmetičnih izdelkih močno povečala. Med uporabniki je široko znano, da redno vnašanje in nanašanje izdelkov z visoko vsebnostjo antioksidantov ščiti organizem pred posledicami radikalov – tako v smislu varovanja zdravja, kot tudi ohranjanja in ponovnega pridobivanja zdravega in mladostnega videza kože. Antioksidanti zmanjšujejo odmiranje celic epidermisa in dermisa ter spodbujajo njihovo hitrejšo regeneracijo, hkrati pa tudi varujejo pred boleznimi srca in ožilja (1, 2). Vsi našteti učinki se v omejenem obsegu resnično izkazujejo. Med bolj znanimi antioksidativnimi spojinami se v zadnjih letih pojavlja resveratrol. Poleg varovanja srčno-žilnega sistema in pozitivnih učinkov na izgled kože, resveratrol najde svoje mesto tudi med iskalci t.i. “večne mladosti” (3). Pripravki z njegovo vsebnostjo se namreč pojavljajo v tradicionalni azijski medicini, ki se med Evropejci pogosto povezuje z dolgim življenjem in daljšo navidezno mladostjo pripadnikov azijskih ljudstev (2).

Resveratrol kot učinkovina, ki površno poučenemu uporabniku obljublja izjemne učinke na dolžino in kvaliteto življenja, je med potrošniki zaželen v vsakovrstnih izdelkih za izboljšanje izgleda in delovanja organizma. Posledično mora biti stroki v interesu posvečanje tudi drugi, splošno manj preučeni plati resveratrola in njegovih derivatov – morebitnim toksikološkim učinkom na delovanje celic različnih tkiv človeškega telesa. Številne študije so že opredelile in ovrednotile potencialno toksičnost resveratrola in sorodnih spojin na različne sisteme – med njimi na estrogenski, androgeni in glukokortikoidni sistem (2).

Prav tako obstaja sum delovanja resveratrola kot hormonskega motilca tudi na tiroidni sistem. Na del omenjene problematike se nanaša tudi predmet našega preučevanja. Osnovni namen te diplomske raziskave je bil preučiti učinek resveratrola in njegovih analogov na modulacijo tiroidnega receptorskega sistema.

Omenjene spojine namreč po svoji kemijski strukturi omogočajo vezavo na vezavno mesto tiroidnih receptorjev, kar pomeni, da lahko pričakujemo motnje v delovanju tiroidnega hormonskega sistema in jih v nadaljevanju tudi predstavljamo.

1.1. Endokrini sistem in njegovi motilci

Endokrini sistem predstavlja vse žleze organizma, ki izločajo hormonske signalne molekule neposredno v sistem krvnih obtočil. Kri jih nato ponese po celotnem organizmu, do oddaljenih tarčnih tkiv, ki se na prejet signal ustrezno odzovejo. Nasprotje endokrinemu hormonskemu sistemu je eksokrini sistem, ki skrbi za izločanje hormonov izven krvnega obtoka (4, 5).

Hormonski sistem je, prav tako kot živčni, informacijski signalni sistem. Od živčnega se razlikuje v uporabljenih signalnih molekulah ter hitrosti delovanja. Na jedrne receptorje se vežejo hormoni peptidne narave, derivati aminokislin, derivati maščobnih kislin, izoprenski derivati ali steroidne molekule. Njegov odziv je veliko počasnejši od živčnega, čas do ustreznega odgovora tkiva lahko traja od nekaj ur do več dni, tudi sam odziv je navadno podaljšan (4).

Endokrine žleze praviloma sestavljajo otočki sekrecijskih celic, tesno prepredenih s kapilarami in limfatičnim ožiljem. Celica produkt izloči v intersticijski prostor, od koder sledi resorpcija v krvni obtok - ta mora biti čim hitrejša, zato so endokrini tkiva močno ožiljena (5). Čeprav hormoni s krvjo potujejo po celotnem organizmu, delujejo le na specifične ciljne celice. Te imajo v svoji celični membrani receptorje, ki jih prepoznajo in vežejo, ter s tem sprožijo odzivno kaskado. Hormon lahko vstopi v celico, ali aktivira sekundarni prenašalec (6). Med glavne endokrine žleze spadajo epifiza in hipofiza, trebušna slinavka, ovariji in testisi, priželjci, nadledvični žlezi ter ščitnica (4).

1.1.2. Ščitnica in tiroidni hormoni

Ščitnica (*glandula thyreoidea*) obdaja sprednji del sapnika in leži tik pod grlom. Sestavljata jo dva režnja, povezana s pecljem (*isthmus*). Žleza je ovita v vezivno kapsulo, ki sega v notranjost in žlezni parenhim razdeljuje v režnje. Parenhim vsebuje folikule, kamor tiroidne celice izločajo in skladiščijo homogeno hormonsko tekočino. Ščitnica je edina endokrini žleza, ki hormone tvori in shranjuje, ter nato počasi sprošča. Ščitnične folikule obdajajo parafolikularne celice ali celice C (6).

Folikularne celice ščitnice izločajo dva tiroidna hormona:

- trijodtironin (3,3',5'-trijodo-L-tironin) oziroma T_3 ,
- njegov prekursorski hormon tiroksin/tetrajodtironin (3,5,3',5'-tetrajodo-L-tironin) oziroma T_4 .

Hormona nastajata iz aminokislina tirozin (4-hidroksifenilalanin).

Hormona sta primarno odgovorna za regulacijo celičnega metabolizma, oksidacijo glukoze in sintezo beljakovin (6, 7). T_3 in T_4 delno sestavlja jod, zato pomanjkljiv vnos joda vodi v zmanjšano produkcijo. Neprekinjena stimulacija ščitnice s tirotropinom, ki ga imenujemo tudi THS hormon – izloča ga adenohipofiza ob nizki koncentraciji T_3 in T_4 v krvi – pa povzroči nabrekanje ščitnice, pojav je znan kot golšavost. Golšavost se lahko pojavi tudi pri hipertiroidizmu (6). Večinsko prisoten v krvi je T_4 , ki ima daljšo razpolovno dobo kot T_3 (razmerje v krvi med njima se giblje med 14:1 in 20:1). T_4 se pod vplivom dejodinaz (tiroksin 5'-dejodinaza) sproti pretvarja v potentnejšo obliko T_3 . Dejodinaze strukturno vsebujejo selen, zato je za normalno izločanje in delovanje tiroidnih hormonov v prehrani nujna tudi zadostna količina selena (7).

1.1.3. Hormonski motilci

Hormonski motilci so spojine, ki so v določenih odmerkih sposobne interferiranja z endokrinim sistemom. Njihova prisotnost v organizmu lahko posredno povzroči številne nepravilnosti, od malignih tumorjev do razvojnih nepravilnosti ploda pri noseči materi. Najbolj kritično obdobje izpostavljenosti je od nastanka zigote naprej, ko poteka diferenciacija celic. Zanjso so ključna hormonska in proteinska ravnovesja v okolju celice, ki jih motilci rušijo (8). Hormonske motilce povezujejo s težavami v zgodnjem razvoju možganov (rezultirajo v težavah kognitivnega razvoja; motnjah v pozornosti in procesih učenja), motnjami spolnega razvoja (v smislu feminizacije moških oziroma malizacije ženskih spolnih procesov) ter razvojem karcinomskih celičnih sprememb (rak dojk, prostate, ščitnice in drugih tkiv) (9).

V grobem ločimo tri različne načine delovanja hormonskih motilcev na organizem:

- posnemanje/delno posnemanje hormonskih molekul, kar potencialno rezultira v prekomerni stimulaciji hormonskih receptorjev tarčnega tkiva - agonistični učinek;
- vezava na jedrni receptor in s tem blokada vezave endogenega hormona - normalni hormonski signal ni prejet, posledično se tkivo ne odzove na spremenjeno situacijo v okolju (ali se odzove v premajhnem obsegu) - antagonistični učinek;
- povzročitev spremembe sintezne poti hormonskih molekul ali hormonskih receptorjev oziroma njihovega shranjevanja in transporta (10).

Danes med motilce delovanja endokrinega sistema vključujemo vse spojine, ki lahko vplivajo na sintezo, sekrecijo, transport, vezavo na receptorje ter/ali eliminacijo endogenih hormonov – posledica je motnja v ohranjanju homeostaze organizma (11).

Endocrine Disrupter Testing and Assessment Task Force (EDTA), ki deluje v okviru organizacije Economic Cooperation and Development (OECD), je opredelila smernice vrednotenja in testiranja spojin kot hormonskih motilcev. Smernice še vedno dopolnjujejo, opredeljene pa so že za področja testiranja vpliva na steroidogenezo, estrogenske in androgene receptorje ter tudi že za tiroidne receptorje.

Testiranja so razdeljena na 5 nivojev:

1. opredelitev spojin glede na že obstoječe, iz drugih virov pridobljene podatke;
2. pridobitev podatkov z uporabo *in vitro* presejalnih testov;
3. pridobitev podatkov z uporabo *in vivo* specifičnih testov;
4. *in vivo* pridobitev podatkov o neželenih učinkih;
5. *in vivo* testiranja skozi več generacij testnih organizmov (12, 13).

Poleg opredeljenih validiranih smernic obstajajo tudi številne nevalidirane testne usmeritve (12), kar nam skupno omogoča testiranje vpliva različnih spojin na različne sisteme, tudi resveratrola in analogov na tiroidni hormonski sistem.

1.2. Tiroidni receptorji

Receptorji tiroidnih hormonov spadajo v široko družino nuklearnih (jedrnih) receptorjev, kamor spadajo tudi receptorji steroidnih hormonov. Delujejo kot hormonsko aktivirani transkripcijski faktorji, torej ob aktivaciji modulirajo gensko ekspresijo. V nasprotju z omenjenimi steroidnimi hormonskimi receptorji, tiroidni receptorji vežejo DNA molekulo v odsotnosti hormona, kar vodi v represijo transkripcije. Vezava hormona na receptor pa povzroči konformacijsko spremembo, ki rezultira v spremenjeni funkciji - receptor postane transkripcijski aktivator (14, 15, 16).

1.2.1 Struktura tiroidnih receptorjev

Proteine receptorjev za tiroidne hormone (TR) sesalcev kodirata dva gena, in sicer THRA (TR-alfa) in THRB (TR-beta). Do sedaj prepoznavamo štiri različne izooblike tiroidnih hormonskih receptorjev: *alfa-1*, *alfa-2*, *beta-1* in *beta-2* (16):

Kot preostali jedrni receptorji, tudi tiroidni receptorji izkazujejo tri funkcionalne domene:

- transaktivacijska domena na aminskem koncu: interagira z drugimi transkripcijskimi faktorji in tako formira kompleks, ki ima sposobnost represije ali aktivacije transkripcije (med alfa in beta izooblikami se razlikuje);

- domena za vezavo na DNA: omogoča vezavo na DNA promotor;
- domena za vezavo liganda ter dimerizacijska domena na karboksilnem koncu proteina.

Domene za vezavo na DNA različnih receptorskih izooblik so si strukturno zelo podobne, preostale domene pa se razlikujejo in posledično tudi vežejo različne ligande. Tako alfa-2 izooblika receptorja ne veže trijodtironina.

Različne izooblike tiroidnih receptorjev se izražajo glede na vrsto tkiva in njegovo stopnjo razvoja. Skorajda vse vrste celic izražajo alfa-1, alfa-2 in beta-1 izooblike, medtem ko se beta-2 praktično nahajajo samo v tkivu hipotalamusa, zgodnji hipofizi ter razvijajočemu se ušesnemu tkivu. Tudi v razvijajočem se možganskem tkivu je najprej izražena vrsta receptorjev alfa-1, takoj po rojstvu pa se začne pospešeno izražanje beta receptorjev. Beta receptorji nato sodelujejo v aktivaciji tudi številnih drugih genov, pomembnih v možganskem razvoju (npr. gen za osnovni mielinski protein) (14, 15, 16).

Strukturna raznolikost receptorjev z različno prisotnostjo glede na vrsto tkiva in stopnjo razvoja le-tega kaže na izjemno kompleksnost uravnavanja fizioloških učinkov prek tiroidnih hormonov. Vpliv kakršnihkoli motilcev nanje povzroči resne spremembe v delovanju tarčnega tkiva, ki vodijo v različne bolezenske in maligne spremembe na katerikoli razvojni stopnji organizma (15, 16).

1.2.2. Interakcije tiroidnih receptorjev z DNA

Aktivirani receptorji se vežejo na kratke, ponavljajoče se sekvence DNA, imenovane na tiroidne hormone odzivni elementi ali TRE (angl. thyroid response elements). TRE sestavljata dve zaporedji AGGTCA, ločeni s štirimi nukleotidi. Zaporedji se lahko pojavita kot neposredni ponovitvi, palindroma ali nasprotni ponovitvi. Domena za vezavo na DNA vsebuje dvakrat po štiri cisteinske ostanke (vsak od njih kelira en cinkov ion) ter tako tvori zanke, znane kot "cinkovi prsti" ("zinc fingers").

Del prvega cinkovega prsta interagira neposredno z nukleotidi v velikem žlebu DNA, medtem ko drugi interagira z nukleotidi v malem žlebu. Tiroidni hormonski receptorji se lahko na TRE vežejo kot monomeri, homodimeri ali heterodimeri z retinoidnim X receptorjem (RXR) - jedrni receptor, ki veže 9-cis-retinojsko kislino (14, 15).

Tiroidni receptorji se vežejo na TRE DNA neglede na to, ali so zasedeni s T₃ ali ne, kar rezultira v različnih odzivih.

Če se veže nezaseden receptor, je spodbujena represija transkripcije gena, medtem ko je ta aktivirana, če se veže receptor z ligandom (14, 15).

- Nezaseden receptor: transaktivacijska domena nezasedenega receptorja, kot heterodimera z RXR, zavzema konformacijo, ki promovira interakcijo še z drugimi transkripcijskimi korepresorskimi molekulami. Del tega korepresorskega kompleksa izkazuje HDA aktivnost (HDA - encimi histonske deacetilaze), ki jo povezujemo z nastankom kompaktne, "utišane" oblike kromatina. Skupni učinek delovanja je represija transkripcije dotičnega gena.
- Zaseden receptor: vezava T_3 na receptor inducira konformacijsko spremembo, ki onemogoča vezavo korepresorskega kompleksa, omogoča pa vezavo koaktivatorskih proteinov. Ta izkazuje HAT aktivnost (HAT - encimi histonske transacetilaze), ki pripomore k odvijanju kromatina in tako v prepisovalno obliko DNA.

Vsi proteini, ki sodelujejo v obeh omenjenih kompleksih, še vedno niso preučeni. Velja tudi omeniti, da glede na zgornjo shemo delovanja obstajajo tudi določene izjeme (primer je že prej omenjeni alfa-2 receptor, ki v odsotnosti T_3 ne deluje kot represor) (16).

1.3. Resveratrol

Resveratrol (trans-3,4',5-trihidroksitilben) je rastlinski polifenol, natančneje fitoaleksin - ima sorazmerno majhno molekulsko maso in v rastlinah deluje protimikrobno. Fitoaleksini se sintetizirajo kot odgovor na delovanje stresnih dejavnikov – povečajo njeno odpornost na stres (kot posledico izpostavitve UV sevanju, pesticidom, težkim kovinam ipd.) ter varujejo tudi pred bakterijskimi, glivičnimi in virusnimi okužbami (17).

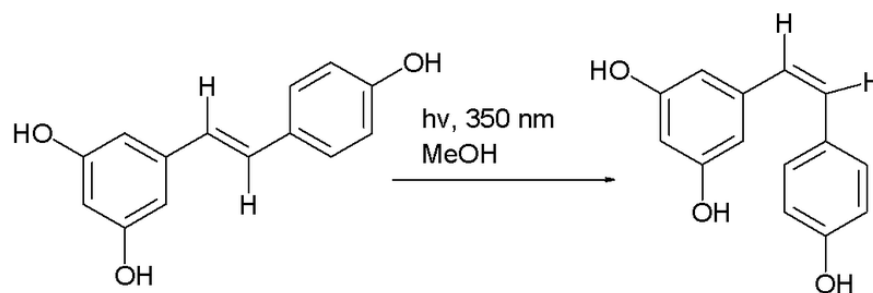
Resveratrol je kot fitoaleksin med drugim prisoten v grozdju (pretežno v lupini grozdne jagode in posledično tudi v rdečem vinu, saj se lupin pred vinsko fermentacijo ne odstrani), v manjših količinah pa tudi v oreščkih in brusnicah, pa tudi v trdoživem japonskem dresniku. Poleg antioksidativnih izkazuje tudi potencialne kemopreventivne lastnosti z inhibitornim vplivom na vse tri glavne stopnje razvoja rakavega obolenja (inicijacijo, promocijo in progresijo) (18). Resveratrol klasificiramo tudi kot stilbenoid, derivat stilbena (19). V rastlinah ga najdemo predvsem v obliki trans-resveratrol-3-O- β -D-glukozida, pod imenom piceid (20).

1.3.1. Fizikalno-kemijske lastnosti resveratrola

Resveratrol enoznačno opisuje kemijska formula $C_{14}H_{12}O_3$. Molekulo sestavljata dva aromatska obroča, ki sta povezana z etilensko vezjo. Njena vrtljivost omogoča, da se molekula nahaja v trans ali cis izomerni obliki (v rastlinah se večinsko nahaja v trans obliki).

Izkazuje dobro topnost v organskih topilih (etanol 50 g/L), ter veliko slabšo v vodi (0.03 g/L). Molska masa trans-resveratrola je 228.25 g/mol, tališče doseže med 253-255 °C. (21). Izoliran trans resveratrol izkazuje izgled belega prahu z rumenkastim podtonom. Ostaja stabilen pri pogojih 75 % vlažnosti, 40 °C in prisotnosti zraka, zato ni prezahteven za skladiščenje.

To pomeni, da prenese tudi pogoje dolgotrajne fermentacije in zorenja vina ter zato ostane aktiven v zrelem rdečem vinu (22).



Slika 1: Kemijski strukturi: trans-resveratrola (levo) ter cis-resveratrola (desno). Konformacijski prehod pod navedenimi pogoji imenujemo fotoizomeracija (prirejeno po 50).

1.3.2. Farmakokinetika resveratrola

Resveratrol se v hrani nahaja večinoma v obliki glikona. Če ga dajemo peroralno, v lumnu tankega črevesja ne more neposredno pasivno difundirati skozi epitelij, ampak se veže z aktivnim glukoziidnim prenašalcem. Ko preide fosfolipidni dvosloj enterocitne celice, se lahko s prenašalca sprosti po dveh mehanizmih: v citosolu reagira z encimom β -glukozidaza; ali reagira z encimom LPH (laktaza florizin hidrolaza), usidranem v membrani enterocita. Sproščen resveratrol je tako na voljo za absorpcijo v kri, vendar se ne absorbira ves v tankem črevesju. Preostanek potuje v debelo črevo, kjer se s pomočjo bakterijskih encimov pretvori v dihidroresveratrol. Kot tak se lahko naknadno absorbira ali pa izloči.

Po absorpciji se lahko v jetrnih mikrosomih metabolizira do glukuronida in sulfata. Iz jeter se resveratrol in produkti presnove izločijo v žolč ter nato v črevesje, sledi ponovna pot do jeter.

Nato so na voljo za absorpcijo v sistemski krvni obtok, kjer se pretežno vežejo na albumine (približno 90 % prostega resveratrola in 50 % presnovkov se veže na beljakovine, preostali delež pa na krvne celice). Kri ga zanese do različnih tkiv, kjer se lahko akumulira (ledvice, jetra, pljuča, možgani, debelo in tanko črevo) (23).

V študiji na prostovoljcih, ki je temeljila na aplikaciji 500 mg resveratrola dnevno 13 tednov, so resveratrol zaznali tudi v cerebrospinalni tekočini. Ugotovitev nakazuje, da lahko prehaja krvno-možgansko bariero (25).

Resveratrol se po peroralni aplikaciji večinoma izloča z urinom v obliki presnovkov. Najučinkovitejši način aplikacije pa ni peroralno zaužitje, temveč bukalna ali sublingvalna aplikacija (23). Kljub temu, da se absorbira približno 70 % peroralno apliciranega resveratrola, zaradi intenzivne jetrne glukuronizacije in sulfatacije biološko razpoložljiva ostane zelo nizka koncentracija – ki pa se lahko akumulira v epitelnih celicah gastrointestinalnega trakta (24).

Izkazane tkivne koncentracije so nizke kljub sorazmerno velikim vnesenim odmerkom. Številne *in vitro* poskuse, ki so rezultirali v obetavnih učinkih resveratrola na človeški organizem, težje potrdimo *in vivo*. (26).

1.3.3. Farmakodinamika resveratrola

Kljub majhni biorazpoložljivosti, resveratrol izkazuje določene protektivne učinke na živalskih modelih (glodalci). Posredno in neposredno je dokazana potencialna terapevtska učinkovitost tudi pri človeku, predvsem na že omenjenih področjih preprečevanja rakavih obolenj, srčno žilnih boleznih ter vnetnih procesov (1).

1.3.3.4. Resveratrol, rakava obolenja in protivnetno delovanje

Že 1997 so bile zaključene prve raziskave na glodalcih, ki so poročale o zmožnostih zaviranja nastanka rakavih obolenj na različnih stopnjah s pomočjo resveratrola. Tretiranje živali s spojino je rezultiralo v 98 % zmanjšanju števila kožnih tumorjev, kar je spodbudilo nadaljnje raziskovanje. Dnevni odmerki 40 mg/kg telesne mase glodalca, na primer, so povečali možnost preživetja živali s subkutanim nevroblastomom z 0 na 70 %. Kljub temu, da večina *in vivo* študij na živalih potrjuje kemoprotektivne učinke resveratrola, so se pojavile tudi izjeme. Aplikacija 1-5 mg/kg telesne mase glodalca dnevno ni imela nobenega učinka na zaviranje rasti ali metastaziranje raka prsi, kljub temu da so ga predhodni poskusi *in vitro* predvidevali. Velikost odmerkov, metoda aplikacije, vrsta tumorja ter druge komponente prehrane zelo vplivajo na končni učinek tretiranja. V splošnem pa takšno zdravljenje veliko obljublja, klinična testiranja potekajo tudi že na ljudeh (1).

Resveratrol verjetno izkazuje kemoprotektivne učinke zaradi zaviranja encimske aktivnosti obeh oblik ciklooksigenaze. Epidemiološke raziskave kažejo, da dolgotrajno zaviranje ciklooksigenaze občutno zmanjša tveganje za nastanek rakavih obolenj. Zavirano je izražanje encima COX1 (ciklooksigenaza-1) ter/ali COX2 (ciklooksigenaza-2) na mRNA nivoju. COX2 modulira celično proliferacijo in apoptozo celic čvrstih tumorjev ter hematoloških malignih obolenj. V večini normalnih tkiv ni prisotna; v večjih količinah se pojavlja v aktiviranih makrofagih, nastaja pa tudi v karcinomskih novotvorbah in ima osrednjo vlogo pri nastanku tumorjev (27). Nadpovprečno izražanje COX2 je bilo zaznано v tumorskih tvorbah različnih tkiv, kot so rak prsi, pankreasa in pljuč (28-31). Raziskave kažejo, da bi COX2 lahko igrala vlogo v različnih stopnjah napredka rakavega obolenja – s povečano proliferacijo transformiranih celic ter zaviranjem njihove programirane celične smrti (29). Povečana ekspresija COX2 rezultira v povečani ekspresiji prostanglandina E2 (PGE2). Izvedene so bile številne študije na temo vpliva PGE2 na razvoj in napredovanje rakavih obolenj v različnih tkivih. Raznolikost PGE2 receptorjev in njihovih različnih signalnih poti kaže, da je protitumorsko delovanje PGE2 odvisno od tipa celice in tipa izraženega PGE2 receptorja. Do sedaj je znano, da so različne signalne poti, ki igrajo vlogo v tumorski progresiji, povezane s PGE2 – kar razloži, zakaj je zaviranje COX2 dobra strategija v protirakavi terapiji. Raziskovanja na tem področju še potekajo in vsi mehanizmi še niso povsem pojasnjeni (32).

Resveratrol poleg COX2 zavira še en pomemben dejavnik za transformacijo celic, encim ornitinska dekarboksilaza (ODC), prek zaviranja protein kinaze C. Resveratrol posledično inhibira tudi angiogenezo (fiziološki proces nastajanja novih krvnih žil iz že obstoječih (33), ki je ključna za rast čvrstih tumorjev. Še večjo učinkovitost izkazuje v kombinaciji z že znanimi zaviralci ODC (kot je difluorometilornitin), kar dokazuje protitumorno učinkovanje resveratrola preko številnih komplementarnih mehanizmov (1).

Znani začetniki rakavih obolenj so tudi ROS (reaktivne kisikove spojine), ki lahko z neposredno vezavo poškodujejo DNA in druge makromolekule. *In vivo* resveratrol dokazano povečuje antioksidativno sposobnost plazme in zmanjšuje lipidno peroksidacijo, vendar ni znano, ali gre za neposredni učinek ali posledico povečane ekspresije endogenih antioksidativnih encimov. V splošnem pa resveratrol izkazuje dokaj nizko antioksidativno sposobnost v primerjavi z drugimi sorodnimi spojinami, tudi prisotnimi v rdečem vinu.

Uspešno pa kelira bakrove ione, ki povzročajo oksidacijo proteina LDL (“low-density protein”), kar zmanjšuje pojavnost srčno-žilnih bolezni in miokardnega infarkta (1).

1.3.3.5. Resveratrol in srčno-žilna obolenja

Epidemiološke študije kažejo, da ima uživanje ekstraktov grozdnih jagod (ki vsebujejo resveratrol) povzroča širjenje žil, zmanjšuje agregiranje trombocitov, zavira aterosklerozo, zmanjšuje lipidno peroksidacijo in ureja serumsko koncentracijo holesterola in trigliceridov (1).

Z zmanjševanjem trombocitne agregacije, resveratrol sodeluje v preprečevanju krvnih strdkov, ki mašijo žile ter povzročajo infarkt miokarda oziroma kap. To je verjetno posledica COX1 v trombocitih (povzroča indukcijo trombocitne agregacije in vazokonstrikcije) pred COX2, ki je obratno inhibitor agregacije in induktor vazodilatacije. Pod določenimi pogoji postane inaktivacija COX1 v trombocitih ireverzibilna (življenjska doba trombocitov je ~10 dni), kar omogoča dolgotrajni *in vivo* efekt. Po istem mehanizmu naj bi svoje protektivne lastnosti za srčno-žilni sistem izkazovala tudi acetilsalicilna kislina (aspirin) (1).

1.3.3.6. Protivnetni učinki resveratrola

Vnetni procesi so ključni pri patologiji artritisa, Chronove bolezni, psoriaze, sodelujejo pa tudi pri razvoju srčno-žilnih in rakavih obolenj. Pri produkciji provnetnih dejavnikov so ključni ciklooksigenazni encimi, zato se njihovi inhibitorji pogosto uporabljajo kot protivnetne zdravilne učinkovine.

Resveratrol v študijah na glodalcih učinkovito zmanjšuje akutne in kronične kemično inducirane edeme, lipopolisaharidno inducirana vnetja dihalnih poti, osteoarthritis ter pomaga pri preprečevanju zavrnitve alograftskih presadkov. Intravenozno apliciran resveratrol zmanjšuje vnetja povzročena z ishemijo/reperfuzijo, vpliv oksidantov generiranih s hipoksantinsko/ksantinsko oksidazo ali trombocite aktivirajočimi faktorji, ne pa tudi levkotrienov B. Prva tri stanja so namreč povezana z nastajanjem superoksidov, medtem ko levkotrien B povzroča vnetje prek mehanizma, nepovezanega s superoksidi. Resveratrol ima potencial za zdravljenje kroničnih vnetnih bolezni peroralno - ne poškoduje namreč želodčne sluznice, kot jo recimo aspirin. V nasprotju s supresivnimi učinki na vnetne procese, resveratrol spodbuja imunski odziv pri glodalcih tretiranih z dinitrofluorobenzenom in preprečuje imunosupresijo pri tretiranju z etanolom. Resveratrol pri glodalcih tudi preprečuje okužbo z virusi (herpes simplex virus-1 in 2), kar nakazuje, da je regulacija inflamatornih odzivov z resveratrolom dokaj kompleksna (1).

1.3.4. Toksičnost resveratrola

Študije toksičnosti pri glodalcih niso pokazale nobenih znakov akutne toksičnosti pri izpostavitvi enkratnemu peroralnemu odmerku 2 g/kg telesne mase, ne začasa življenja in ne pri obdukciji. Tudi po enkratni intravenski aplikaciji 80 mg/kg telesne mase ni bilo izkazanih toksičnih sprememb, kar je vodilo v zaključek, da je resveratrol varna spojina za uporabo (34). Prav tako ni prišlo do nobenih sprememb kliničnih, histoloških in hematoloških dejavnikov ali funkcionalnih ter patoloških sprememb notranjih tkiv pri večkratni izpostavljenosti (28-dnevna subakutna študija; odmerki 50, 150, 500 mg/kg telesne mase glodalca dnevno) (35).

Šele podobna 28-dnevna študija z uporabo pretiranega odmerka 3 mg/kg/dan je pokazala spremembe v določenih kliničnih znakih (zmanjšana telesna masa, dehidracija, anemija, levkocitoza, povišane vrednosti kreatinina, bilirubina, albumina) ter patološke spremembe na ledvicah. Na podlagi teh ugotovitev so prišli do sklepa, da tudi dolgotrajna izpostavljenost resveratrolu ne povečuje tveganja za potencialne neželene učinke (36).

1.3.4.1. Klinične študije

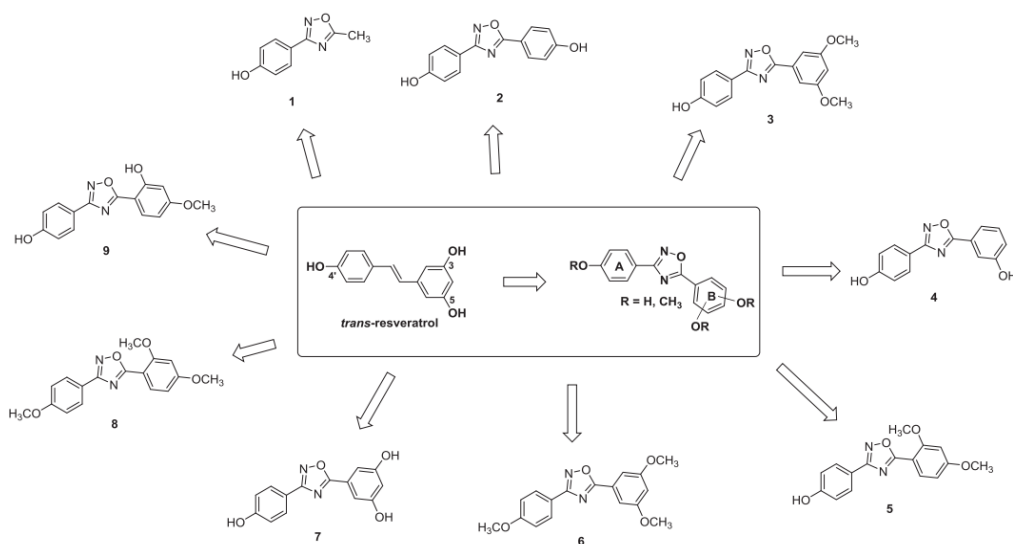
V dosedanjih študijah toksičnosti resveratrola pri človeku niso dokazali neželenih učinkov. Študija ocenjevanja varnosti trans-resveratrola pri peroralnem doziranju enkratnega odmerka 5 mg/kg telesne mase, ki je vključevala 10 zdravih prostovoljcev, ni pokazala neželenih učinkov (37). V 29-dnevni izpostavljenosti odmerku vsaj 1 g/kg/dan, pa so se pojavili neželeni učinki na gastrointestinalni trakt (slabost, abdominalna bolečina, diareja) (38). Blaga diareja se je pojavila tudi pri šestih od osmih kandidatov, ki so prejeli resveratrol dvakrat dnevno po 2 g/kg v 8-dnevni študiji (39).

Študije neželenih učinkov resveratrola med nosečnostjo ali laktacijo niso pokazale neželenih učinkov, vendar se vnos resveratrola z rdečim vinom nosečnicam odsvetuje - zaradi neželenih učinkov alkohola na plod v vseh stadijih nosečnosti (40, 41).

1.4. Analogi resveratrola

Resveratrol je stilbenski derivat z značilno konfiguracijo dvojnih vezi in fenolnih hidroksilnih skupin. Antioksidativne, protivnetne in druge preučevane lastnosti derivatov resveratrola so odvisne od strukture analogne spojine – prisotnosti hidroksi in metoksi skupin, vzorca OH substitucije in narave heterociklične ali etilenske povezave obeh fenilnih obročev – pri ZMP spojinah je to 1,2,4-oksadiazolni obroč. Slednji poveča rigidnost strukture spojine.

Uporabljene ZMP spojine imajo tako strukturo 3,5-difenil1,2,4-oksadiazola, ki ohranja prvotno geometrijo resveratrola z etilensko vezjo. Serija analogov se med seboj razlikuje v substituentih fenilnih obročev (42). Z ustreznimi spremembami v strukturi analogov resveratrola je mogoče doseči večjo stabilnost, biorazpoložljivost in plazemsko koncentracijo spojine po vstopu v organizem. Največjo *in vivo* stabilnost izkazujejo o-alkilirani analogi. Dimetileterni derivati (kot je pterostilben) so v glodalcih izkazali do 60 % višjo biorazpoložljivost od resveratrola, pri tem pa ohranili enako reaktivnost do peroksilnih radikalov (43).



Slika 2: Strukturne razlike analogov (ZMP spojin) z resveratrolom (42).

Resveratrol deluje zaviralno tudi na aromatazo, kar bi ob rednem jemanju lahko pripomoglo k zdravljenju hormonsko odzivnega raka dojke. Številne analoge so zato optimizirali v smer nesteroidnih inhibitorjev aromataze – v 3,5-dipiridil-1,2,4-tiadiazole, ki izkazujejo do 6000-krat višjo inhibitorno učinkovitost kot resveratrol. Resveratrol v splošnem izkazuje potencial zaviranja nastanka rakavih obolenj na različnih nivojih in preko več mehanizmov, zato gre tudi razvoj analogov v različne smeri (43).

O uporabljenih strukturnih analogih ZMP ni veliko podatkov, so pa na voljo informacije o drugih strukturnih analogih resveratrola. Raziskava, ki je preučevala vpliv resveratrola in analogov resveratrola na androgene receptorje, je dokazala, da sprememba hidroksilne skupine na mestu 3 in/ali 5 ali njena odsotnost zmanjša antagonistični učinek na receptor. Nasprotno, odstranitev OH skupine na mestu 4 ali njeno zaetrenje z metilno skupino, antagonistično delovanje povečata. V splošnem pa endokrino delovanje analogov ostaja podobno izvornemu resveratrolu. Spojine v tej študiji so bile testirane v najvišji koncentraciji 10 μ . Med vsemi testiranimi je bil najmočnejši inhibitor transkripcije 3,5-dihidroksi-4'-metoksistilben (44).

2. NAMEN NALOGE

Glede na strukturo, številne široko prisotne kemikalije izkazujejo lastnosti potencialnih hormonskih motilcev. Potrošniški način življenja narekuje vsakodnevno srečevanje z na stotine snovmi, ki imajo možnost vstopa v človeški organizem prek zelo različnih poti, tudi že pred rojstvom, vsekakor pa tekom celotnega življenja. Glede na tveganje za zdravje, ki ga prinaša rušitev hormonske homeostaze in frekvenco izpostavitve, je o marsikateri sporni spojini premalo znanega – poleg akutnih neželenih učinkov, ki so vidni takoj, obstaja tudi možnost dolgoletne akumulacije, vpliva na reproduktivni sistem ali indukcije karcinogeneze, ki na prvi pogled niso neposredno ali posredno povezane z določeno kemikalijo. Spojine, za katere obstaja sum potencialnega toksičnega delovanja, je zato potrebno ustrezno testirati ter se tako prepričati o njihovi varnosti.

Na resveratrol in njegove analoge so bile v zadnjih letih osredotočene že številne študije. Sam resveratrol ima namreč nizko biološko razpoložljivost, zato se je razvoj usmeril v analoge z izboljšanimi farmakokinetičnimi in farmakodinamičnimi lastnostmi. Veliko je bilo že raziskav njihovega delovanja na različne sisteme, tudi endokrinega, kot sta androgeni in glukokortikoidni, malo manj pa na tiroidni sistem in tiroidne receptorje. Glede na kemijske značilnosti obstaja sum interakcij receptorjev z resveratrolom in analogi, in s tem vplivanje na hormonalno signalno pot ob izpostavitvi.

Testirali bomo resveratrol in sedem njegovih derivatov (spojine ZMP) na celični liniji GH3.TRE-Luc. Gre za linijo transformiranih epitelijskih celic tumorja hipofize podgane, ki ima vstavljen reporterski plazmid za encim luciferazo. Ob dodatku luciferina se bo v primeru aktivnega gena za luciferazo (ustrezna viabilnost celic) pojavila bioluminiscenca, z merjenjem katere lahko linearno sklepamo na aktivnost tiroidnih receptorjev po izpostavitvi celic testiranim spojinam – določili bomo lahko morebitni agonistični ali antagonistični učinek.

Pred izvedbo smo si postavili naslednje hipoteze, ki jih bomo z rezultati potrdili ali zavrnili:

1. Resveratrol in ZMP spojine so nizko citotoksične za celično linijo GH3.TRE-Luc.
2. Resveratrol bo izkazal učinek na tiroidne receptorje (agonistični ali antagonistični).
3. Tudi vsi testirani analogi (ZMP spojine) bodo izkazali učinek na tiroidne receptorje.
4. Analogi resveratrola z zaetrenimi metoksi skupinami bodo imeli višji agonistični potencial na tiroidne receptorje kot resveratrol.

3. MATERIALI IN METODE DE LA

3.1. Materiali

3.1.1. Testirane spojine

Spojine ZMP so 1,2,4-oksadiazolni analogi resveratrola. Zamenjava etilenskega mosta med dvema aromatskima obročema z oksadiazolnim obročem poveča njihovo rigidnost. Od resveratrola se razlikujejo še v poziciji hidroksilnih skupin in njihovi zaetrenosti z metilno skupino.

Preiskovane učinkovine smo testirali načeloma v dveh izbranih koncentracijah: 25 μM ter 10 μM (končna koncentracija na plošči). Pri nekaterih pa smo nato koncentracijo še zmanjšali zaradi njihove slabše topnosti, in s tem preprečili obarjanje (kot predstavljeno v *Preglednici 1*). Uporabljene spojine so našteje in opisane v *Preglednici 2*.

Preglednica 1: Končne koncentracije ZMP spojin na plošči; sivo označene koncentracije smo prilagodili (zmanjšali) zaradi slabe topnosti spojin v DMSO.

| Spojina* | Uporabljene c | Spojina | Uporabljene c |
|----------|------------------------|-------------|----------------------|
| ZMP-15 | 25; 10 μM , | ZMP-23 | 10; 5 μM |
| ZMP-17 | 20; 10 μM | ZMP-24 | 25; 10 μM |
| ZMP-20 | 25; 10 μM | ZMP-25 | 25; 10 μM |
| ZMP-21 | 25; 10 μM | resveratrol | 25; 10 μM |

* čistota spojin je večja od 95 %

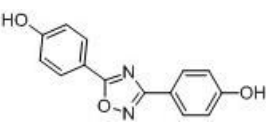
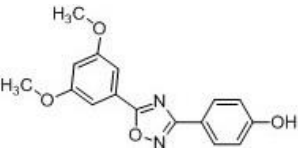
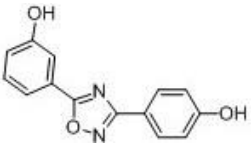
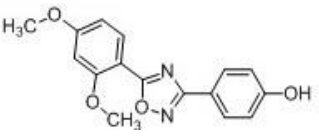
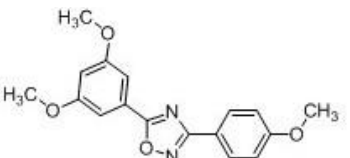
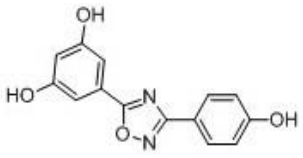
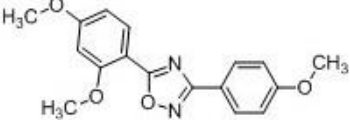
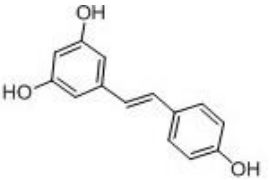
3.1.2. Priprava raztopin testiranih spojin

Osnovne raztopine spojin smo pred uporabo pripravili v epicah v koncentraciji (50 mM ter 20 mM). Na analitski tehtnici smo natehtali spojine ter jim nato dodali ustrezno količino topila (99,9 % DMSO). Pri raztapljanju smo si pomagali z vorteksiranjem in ultrazvočno kadičko. Osnovne raztopine smo po uporabi zamrznili in jih imeli za večkratno uporabo.

Pred uporabo smo osnovne raztopine redčili z medijem za testiranje (PCM medij, opisan kasneje), na končno koncentracijo z 0,1 % (v/v) DMSO. Končne koncentracije testiranih spojin so bile tako 25 μM ter 10 μM . Tako nizko koncentracijo DMSO je potrebno vzdrževati, saj koncentracije DMSO višje od 1 % delujejo citotoksično. Na koncu je vsaka mikrocentrifugirka vsebovala 0.999 mL medija ter 1 μL spojine raztopljene v DMSO.

Kot kontroli smo uporabljali trijodotironin (znan močan agonist delovanja tiroidnih receptorjev, endogeni hormon T3) ter bisfenol A (znan antagonist delovanja tiroidnih receptorjev), opisana v *Preglednici 3*.

Preglednica 2: Strukture v testiranju uporabljenih ZMP spojin ter resveratrola.

| Ime spojine | Kemijska struktura | MM (g/mol) |
|-------------|--|------------|
| ZMP-15 |  | 254,24 |
| ZMP-17 |  | 298,29 |
| ZMP-20 |  | 254,24 |
| ZMP-21 |  | 298,29 |
| ZMP-23 |  | 312,32 |
| ZMP-24 |  | 270,24 |
| ZMP-25 |  | 312,32 |
| resveratrol |  | 228,25 |

Kemikalije za pripravo ploščice za preučevanje agonističnega učinka smo redčili le v PCM mediju, medtem ko smo kemikalije za antagonistično ploščico redčili v PCM + T3 mediju.

Končna koncentracija T3 na antagonistični ploščici je bila 0,25 nM (dodajanje spojin celicam je opisano kasneje v poglavju 3.8. *Dodajanje testiranih spojin celicam*).

Preglednica 3: Strukture v testiranju uporabljenih kontrolnih spojin.

| Ime spojine | Oznaka | Kemijska struktura | MM (g/mol) |
|--|--------|--------------------|------------|
| <p>TRIJODTIRONIN 2-amino-3-[4-(4-hidroksi-3-jodofenoksi)-3,5-dijodofenil]propanojska kislina</p> | T3 | | 650,98 |
| <p>BISFENOL A 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan</p> | BPA | | 228,29 |

3.1.3. Celična linija: GH3.TRE-Luc

V testiranju smo uporabili celično linijo GH3.TRE-Luc. GH3 je linija transformiranih epiteljskih celic, natančneje tumorja hipofize podgane. Celice izražajo α - in β -tiroidne receptorje. Morfološko gre za adherentne celice, ki rastejo pritrjene na stene gojitvenega vsebnika (46).

Celična linija GH3.TRE-Luc pa vsebuje s transfekcijo vstavljen reporterski plazmid, ki kodira encim luciferazo. Tako pridobljena stabilna reporterska celična linija je primerna za testiranja spojin, ki jim preučujemo sposobnost modulacije transkripcijske aktivnosti α - in β -tiroidnih receptorjev. Linija omogoča preprosto in specifično testiranje spojin za agonistično in antagonistično delovanje na tiroidne receptorje ter dobro ponovljivost rezultatov (46).

Posledično je primerna za testiranje potencialnih endokrinih hormonskih motilcev na tiroidne receptorje. Pri delu s celično linijo GH3.TRE-Luc smo uporabili protokol, ki so ga pripravili razvijalci celične linije (47).

3.2. Osnove dela s celicami

Celoten potek testiranj smo izvajali v celičnem laboratoriju. Delo s celicami je potekalo v LAF komori – brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka, ki ob predpisanem načinu uporabe ščiti preizkusni material pred zunanjimi kontaminanti. Nenehni pretok zraka tudi odnaša za osebje potencialno nevarne delce v zraku, ki nastajajo med izvajanjem testiranj.

Pogoje dela aseptične samo ohranja, zato moramo vanjo vnašati samo ustrezno predhodno dekontaminirane materiale in pripomočke – ustrezno skladiščene morajo biti tudi vse uporabljene tekočine (voda, mediji, DMSO itd.), da ostanejo neoporečne. Pred pričetkom dela v LAF-komori mora biti ustrezno pripravljeno tudi osebje. To vključuje dezinfekcijo rok, uporabo rokavic (iz materiala, ki zagotavlja ustrezno stopnjo varnosti glede na izvajano delo), zaščitno haljo ter obutev, po potrebi pa tudi zaščitna očala. Poleg zagotavljanja ustreznih aseptičnih pogojev, dobra laboratorijska praksa omogoča tudi zaščito človeka.

Po zaključenem delu se vsi pripomočki, namenjeni enkratni uporabi, zavržejo. Z biološkim materialom kontaminirane odpadke se skladišči ločeno in predaja pristojnim institucijam za ustrezno uničenje. Delovno okolje vedno očistimo po postopku in zaključimo z razkuževanjem s 70 % etanolom. Po potrebi se čiščenja poslužujemo že med delom. Enako velja za vse pripomočke v LAF-komori. Tudi rokavice pred začetkom dela v komori vedno razkužimo s 70 % etanolom.

Postopek ponavljamo vsakič, ko delo prekinemo z iznosom materiala ali ko damo roke iz komore (48).

3.2.1. Reagenti, uporabljeni pri delu s celicami

Pri delu s celično linijo GH3.TRE-Luc smo uporabljali naslednje reagente:

- **gojitveni medij** (»growth medium«): v času gojenja celic oz. rasti celične kulture v pripravi na testiranja. Njegova sestava celicam omogoča optimalne pogoje za rast in razmnoževanje:
 - 1) 500 mL medija DMEM/F12 (31330-038; Gibco, ZDA)
(DMEM/F12 je osnovni medij, ki vsebuje aminokislino, anorganske soli, vitamine in druga hranila – na tržišču je na voljo v že pripravljeni obliki);
 - 2) 50 mL FBS (F6765-100, 16C075; Sigma-Aldrich, MO, ZDA) – fetalni goveji serum (»fetal bovine serum«);
 - 3) 5 mL raztopine antibiotikov »pen-strep« - 10.000 enot/mL penicilina in 10.000 µg/mL streptomocina (P0781-100; Sigma-Aldrich, MO, ZDA).

Medij smo zaščiten pred kontaminacijo shranjevali v hladilniku (približno 5 °C), pred uporabo pa smo ga segreli na približno 37 °C (preprečevanje temperaturnega šoka celic). V obdobju rasti smo ga menjevali na 2-3 dni.

- **PCM medij:** testni medij, ki ne vsebuje seruma. Pripravljali smo ga sproti in ga tako ohranjali svežega. Vsebuje naslednje komponente:
 - 1) 10 µg/mL inzulina (IO516-5; Sigma Chemical Co., St. Louis, UK);
 - 2) 10 µM etanolamina (110167-25; Sigma-Aldrich, Nemčija);
 - 3) 10 ng/mL natrijevega selenita (214485-5G; Sigma Chemical Co., St. Louis, UK);
 - 4) 10 µg/mL humanega apotransefrina (T2036-100; Sigma Chemical Co., St. Louis, UK);
 - 5) 500 µg/mL govejega serumskega albumina (1001520712, A2153-10G; Sigma Chemical Co., St. Louis, UK)
- **DMSO:** 99,9% (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- **PBS:** fosfatni pufer (14190-136; Gibco, ZDA);
- **tripsin:** cepljenje peptidnih vezi, služi razbitju adheziranega sloja celic na površini gojitvenega vsebnika (12604-013; Gibco, ZDA);
- **barvilo tripan-modro:** barvilo, ki ne prehaja intaktne celične stene, uporabno za štetje celic ter ugotavljanje viabilnosti (T8154; RNBC4313; Sigma-Aldrich, Nemčija).

3.3. Odmrzovanje celic

Celice GH3.TRE-Luc so bile shranjene zamrznjene v obliki suspenzije pri -80 °C. Krioviala z volumnom 1 mL je shranjevala suspenzijo s približno $3,6 \times 10^6$ celic (število celic). Predhodno smo pripravili centrifugirko z 9 mL ogretega gojitvenega medija. Kriovialo smo nato hitro odtalili v vodni kopeli s približno 37 °C, nato pa vsebino premestili v centrifugirko z gojitvenim medijem. Ključno je namreč, da vsebino krioviale čimprej redčimo, saj vsebuje citotoksično koncentracijo krioprotektanta (10 % DMSO, ki med zamrzovanjem prepreči rast kristalov, kar ohrani celico nepoškodovano). Celice nato centrifugiramo 5 minut pri 1000 obratih/min. Po končanem centrifugiranju supernatant s krioprotektantom odpipetiramo ter dodamo 5 mL svežega gojitvenega medija. Celoten postopek izvedemo čimprej in čim hitreje.

Vsebina centrifugirke je nato pripravljena za nasaditev v gojitveno posodo, primerno za gojenje celic v inkubatorju. Imeti mora reguliran dostop zraka. Glede na velikost posode moramo dodati ustrezno količino medija, da le-ta pomešan s celicami pokrije celotno dno vsebnika.

Celice nato inkubiramo v sterilnem inkubatorju, pri pogojih 37 °C, 5 % CO₂. Zračni ventil gojišča mora biti znotraj inkubatorja odprt, zunaj njega pa zaprt.

3.4. Gojenje celic

Za rast, razmnoževanje in preživetje celične linije je ključno zagotavljanje ustreznih optimalnih pogojev. Gojitveni vsebniki, ki jih uporabljamo, so navadno plastenke oblike T s perforiranim zračnim ventilom. Vrat posode je navadno oblike prilagojene rokovanju s pipeto. Obdelava notranje površine vsebnika omogoča celično adhezijo. Pred uporabo morajo biti sterilno shranjevani.

Gojitveni medij mora biti ustrezne sestave za uporabljano celično linijo (za GH3.TRE-Luc opisan v predhodnem poglavju) ter dovolj redno menjan – dodana indikatorska barvila povzročijo spremembo barve že izrabljenega medija. Glede na velikost vsebnika in število celic je potrebno zagotavljanje dovoljšne količine le-tega (med 7-10 mL, dno vsebnika mora biti vedno prekrito v celoti). Pred dodajanjem celicam mora biti ogret na približno 37 °C. Ostajati mora neoporečen, zato skrbimo za preprečevanje kontaminacije.

Inkubator, v katerem gojimo celice, mora neprestano zagotavljati ustrezne gojitvene pogoje (37 °C, 5 % CO₂), se pravi mora biti redno čistjen, vzdrževan ter imeti zagotovljen stalen vir električne energije. Pri rokovanju s celicami moramo vedno upoštevati pravila dobre laboratorijske prakse.

3.5. Presajanje celic

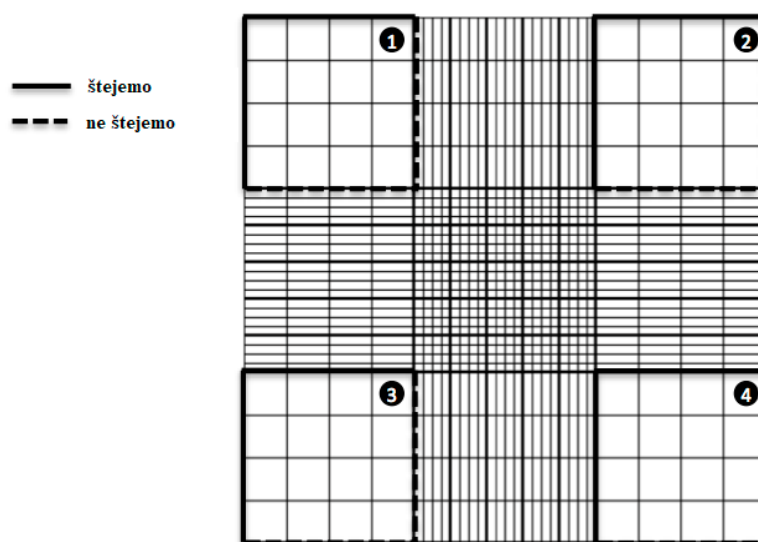
Konfluenca celične kulture je potrebno redno spremljati. Ko celice dosežejo približno 80 % konfluenca, jih je potrebno tripsinizirati ter presaditi. Tako jim ponovno omogočimo dovolj prostora za nadaljno razrast. V povprečju smo celice presajali v nove vsebnike enkrat tedensko. Le po prvi nasaditvi, takoj po odmrzovanju, smo jim omogočili več časa za vzpostavitev normalne dejavnosti. Pri presajanju potrebujemo zeleno število novih vsebnikov (glede na število celic v kulturi), ter gojitveni medij, tripsin ustrezne koncentracije in PBS. Vse tekočine na vodni kopeli segrejemo na 37 °C. Pazljivi smo pri tripsinu, saj z višanjem temperature pada njegova aktivnost. Vsebnik s celicami iz inkubatorja preselimo v LAF-komoro. Najprej odstranimo izrabljen medij ter celice speremo s 5 mL PBS pufra. S tem odstranimo metabolite in komponente govejega seruma, ki zmanjšajo delovanje tripsina. Encim s cepitvijo vezi povzroči odlepljanje celic s sten vsebnika, ter prekine njihove medsebojne povezave. Celice so tako zopet prosto suspendirane.

Proces pospešimo z inkubiranjem vsebnika za 30 sekund s prisotnim tripsinom, nato pa tripsin odpipetiramo ter ponovno inkubiramo vsebnik za 3 minute pri 37 °C.

Uspešnost tripsinizacije nato preverimo pod svetlobnim mikroskopom in po potrebi postopek podaljšamo ali ponovimo. Celicam nato dodamo 10 mL PCM medija, s tem redčimo in zavremo delovanje tripsina ter tako preprečimo njegovo potencialno nadaljnje destruktivno delovanje na celice. Vsebino iz vsebnika prenesemo v dovolj prostorno centrifugirko ter centrifugiramo 5 minut pri 1000 obratih/min. Opazujemo pojav pelete iz celic na dnu centrifugirke, ki nam potrdi prisotnost celic. Odstranimo medij, dodamo 9 mL svežega PCM in s pipetiranjem ter vorteksiranjem resuspendiramo peleto. Nato pripravimo celice za štetje.

3.6. Štetje celic

Če želimo izvedeti približno število celic v volumnu suspenzije, ki ga imamo na voljo, moramo celice prešteti. Postopek je lahko avtomatiziran, mi pa smo ga izvajali na klasičen način. Če želimo celice videti pod svetlobnim mikroskopom, jih moramo zaradi njihove prosojnosti obarvati. V ta namen uporabimo barvilo tripan-modro. Ta obarva celično steno, ampak je ne prehaja, če je le-ta nepoškodovana. Odvzamemo 80 μ L barvila ter ga dodamo 80 μ L predhodno pripravljenih celic (oz. pripravimo zmes v razmerju 1:1). Zmes nato napipetiramo pod krovno stekelce na hemocitometer v ustreznem volumnu glede na prostornino hemocitometra. S pomočjo mreže ter kvadrantne razdelitve na hemocitometru lahko celice enostavno preštejemo ter preračunamo njihovo množino. Barvilo pa nam, poleg povečanega kontrasta, omogoča opazovanje tudi viabilnosti – žive celice (z intaktno membrano) ostajajo neobarvane, medtem ko se mrtve obarvajo temno modro.



Slika 3: Shema mrežne razdelitve hemocitometra. Štejemo (žive) celice v označenih kvadrantih, celice na robovih upoštevamo glede na zgornja navodila (prirejeno po 56).

3.6.1. Izračun števila in volumna celic

Število vseh celic iz tripsinizirane kulture po štetju izračunamo po spodnjem postopku:

$$[c] \text{ celic}(\text{celic}/\text{mL}) = N \cdot 10^4$$

*N: povprečno število celic v dveh kvadrantih

S presajanjem celic želimo doseči nižjo konfluentnost kulture, zato moramo poznati približno število celic pri želenem odstotku konfluente novega presada:

- **80 % konfluenta** (vsebnik, pripravljen za testiranje v naslednjih dneh): 6×10^6 celic
- **20 % konfluenta** (vsebnik, pripravljen za nadaljnje gojenje): $1,5 \times 10^6$ celic

Volumen celic iz starševske kulture, ki ga nasadimo v nova vsebnika, izračunamo po spodnji enačbi:

$$V_{\text{suspensije}}(\text{mL}) = N(\text{st.celic}(\text{konfluenta})) / c(\text{st.celic}/\text{mL})$$

*N: priporočeno število celic pri željeni konfluenci

Dobljen volumen je volumen suspenzije starševske kulture, ki jo odpipetiramo v nov vsebnik in bo zagotovila razrast hčerinske kulture izbrane konfluente. Dodamo še ustrezno količino svežega gojitvenega medija in vsebnika postavimo v inkubator.

3.7. Nasajanje celic

Drugi dan 80 % konfluentni kulturi odstranimo gojitveni medij, jo speremo s PBS ter dodamo PCM medij (brez seruma). 20 % konfluentni samo menjamo gojitveni medij.

Tretji dan lahko testni vsebnik ponovno tripsiniziramo ter preštejemo celice. Nato pripravimo mikrotitrne ploščice, ki jih bomo nasadili – po načrtu v *preglednici 4*.

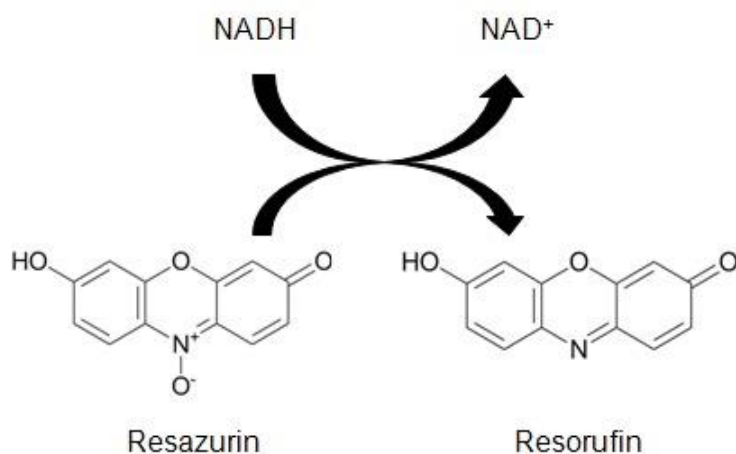
Tako za test citotoksičnosti kot za luciferazni test smo uporabili bele mikrotitrne ploščice Microlon Lumitrac 600 (Greiner bio-one, Kremsmünster, Avstrija). Vsaka ploščica ima 96 vdolbin, za testiranje agonističnega ter antagonističnega učinka potrebujemo dve ploščici. Vsaka vdolbina omogoča 100 μ L celične suspenzije, zato je potrebno pripraviti dovoljšen volumen suspenzije. Izračunanemu volumnu dodamo še količino gojitvenega medija za ustrezno koncentracijo celic (10^5 celic/mL). Suspenzijo v vdolbine nanese avtomatsko multikanalno pipeto v LAF-komori. Ploščici nato vrnemo v inkubator za približno 1-2 uri oziroma dokler ne pripravimo ustreznih koncentracij spojin za testiranje. Inkubacija lahko traja tudi dlje, vendar 1-2 uri zadostujeta.

3.8. Dodajanje testiranih spojin celicam

Po opisanem postopku v poglavju 3.1.1. *Testirane spojine* nato pripravimo sveže redčitve posameznih testiranih kemikalij v dogovorjenih koncentracijah. Vsako spojino pripravimo v dveh različnih koncentracijah (nižji in višji), ter dveh različnih PCM medijih (brez ali z T3, podrobneje opisano v poglavju 3.10. *Luciferazni test*). Isto koncentracijo vsake testirane spojine smo nato nanegli v tri paralelne vdolbine v vsako po 100 μ L raztopine) po načrtu v *prilogi 1*. Plošče z dodanimi spojinami zopet postavimo v inkubator za 24 ur. Test citotoksičnosti ter luciferazni test tako lahko izvedemo šele naslednji dan. Časovne postavke 24 ur se poskušamo čim točneje držati.

3.9. Test citotoksičnosti z resazurinom – *test viabilnosti*

Resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on 10-oksid) je modro barvilo, ki pod virom svetlobe šibko fluorescira. Uporablja se kot indikator poteka redoks reakcij v testih celične viabilnosti (v živih, metabolno aktivnih celicah potekajo številne redoks reakcije) (49, 50). Reakcija poteka, dokler se vse molekule ireverzibilno ne pretvorijo v rožnato obarvan *resorufin*, kar je razvidno iz slik 4 in 5. Žive, metabolno aktivne celice reducirajo resazurin do resorufina, mrtve celice pa seveda tega ne naredijo (51).



Slika 4: Reakcija redukcije resazurina v viabilnih celicah (57).

Zaradi ohranjanja aktivnosti resazurina test viabilnosti izvajamo v LAF-komori z ugasnjenimi lučmi. Vdolbine na mikrotitrskih ploščicah smo napolnili z 10 μ L 400 μ M resazurina v PBS, jih pokrili z aluminijasto folijo in inkubirali nadaljni 2 uri.

Resorufin fluorescira pri $\lambda=590$ nm, intenzivnost fluorescence pa povezujemo s številom viabilnih celic.

Viabilnost lahko določimo tudi z merjenjem absorbance pri $\lambda = 573$ nm (absorpcijski maksimum resorufina), dobljena vrednost absorbance je sorazmerna s številom živih celic. Spojina je citotoksična, ko je viabilnost celic manjša od 80 % v primerjavi z netretiranimi celicami (celice v mediju z DMSO) (51).

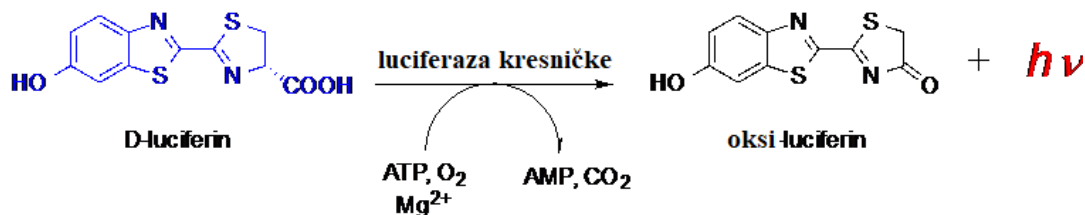
Po inkubiranju smo izmerili fluorescenco pri $\lambda = 530$ nm ter $\lambda = 590$ nm. Kot ozadje smo posneli fluorescenco PCM medija brez celic, kar smo upoštevali pri preračunavanju. Vse vrednosti smo nato normalizirali na 0,1 % DMSO v PCM.

Če je bila viabilnost večja od 80 %, smo na ploščici nadaljevali z luciferaznim testom.

3.10. Luciferazni test

Spojine, ki delujejo na tiroidne receptorje, po dodatku celicam sprožijo pot sinteze specifičnih proteinov – ti so odgovorni za končni izid testiranja. Pri *in vitro* testiranjih se končni izid določa posredno, preko merljivih parametrov. Parametri, ki jih merimo, pa so v neposredni povezani s koncentracijo preiskovane spojine oziroma jakostjo njenega delovanja (52, 53).

Tovrstni test je tudi luciferazni test. Luciferaza je encim, ki katalizira oksidacijo luciferina do oksiluciferina (kofaktorja sta ATP in ion magnezija) – pri čemer se pojavi bioluminiscenca. Reakcija poteka preko hidroperoksidnega intermedata, ki pri končnem razpadu odda luminiscenco (52).



Slika 5: Reakcija luciferina do oksiluciferina, pri kateri nastane bioluminiscenca (prirejeno po 58).

Luciferazni test temelji na izražanju reporterskega gena, ki kodira zapis za luciferazo. Aktivacija sproži transkripcijo in nadaljnjo pot do nastanka encima. Če nastane aktiven encim, začne s katalizo substrata in pojavi se bioluminiscenca, ki jo lahko merimo (52, 53).

Poleg preiskovanih spojin smo pri testiranju uporabili tudi kontrole. Kot negativno kontrolo smo uporabili gojitveni medij (ne pride do aktivacije transkripcije), kot pozitivni kontroli pa 0,25 nM T3 (agonist za tiroidne receptorje) ter 52,70 μM BPA (antagonist za tiroidne receptorje). Kot kontrolo topila smo uporabili 0,1 % DMSO v PCM.

Pri testiranju agonističnega delovanja smo celice izpostavili le preiskovanim spojinam in tako agonistični potencial določali neposredno. Pri testiranju antagonizma pa smo poleg spojin celicam dodali še 0,25 nM T3 ter tako antagonistični učinek določali posredno (preko zmanjšanja učinka agonističnega T3).

Po testu viabilnosti smo na mikrotitrskih ploščicah (če so imele celice ustrezno viabilnost) izvedli še luciferazni test. Zaostalo vsebino smo odstranili iz vdolbin, ter jih sprali s 100 μ L PBS pufru. Tudi tega smo odstranili, nato pa dodali po 20 μ L lizirnega pufru CCLR (Cell Culture Lysis Reagent, Promega, Madison, WI, ZDA) in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Slednji je povzročil lizo celic in s tem propustnost njihovih membran za luciferin. Nato smo lahko dodali luciferazni substrat (35 μ L) ONE-Glo™ Luciferase Assay Buffer + Substrate (Promega, Madison, WI, ZDA). Takoj smo pomerili luminiscenco po navodilih protokola.

3.11. Statistična obdelava podatkov

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli s programoma Microsoft Excel ter GraphPad Prism. Pripravili smo tri neodvisne ponovitve testiranja, vsako ponovitev smo izvedli na novi pasaži celic. Vsak vzorec smo na ploščico nanegli v triplicatu. Podatke smo prikazali kot povprečno vrednost neodvisnih ponovitev.

Rezultate preiskovanih spojin in kontrol smo primerjali z enostranskim ANOVA testom – test, ki z analizo variance ugotavlja, ali med tremi ali več skupinami neodvisnih vzorcev obstajajo statistično pomembne razlike – preverjali smo razlike med povprečji ponovitev iste spojine v višji koncentraciji (25, 20 ali 10 μ M), v nižji koncentraciji (10 ali 5 μ M) ter kontrolo (0,1 % DMSO v PCM). Analiza variance velja kot zelo robustna metoda. Z njeno uporabo preprečimo lažno signifikantnost. Odstopanja od kontrole so bila statistično značilna pri verjetnosti, da sta vzorec in kontrola enaka, manjši od 5 % (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). Rezultate smo normalizirali glede na kontrolo (0,1 % DMSO v PCM), katere vrednost je predstavljala 100 %. Normaliziranim povprečnim vrednostim smo določili standardne deviacije ter jih nato grafično predstavili.

Test ANOVA pa nam ne pove, katere od testiranih skupin so signifikantno različne od drugih ampak samo, da razlika obstaja. Katera skupina podatkov je signifikantno različna od drugih lahko ugotovimo izvedbo katerega izmed primernih post hoc testov. Mi smo uporabili Dunnettov test. Analizo podatkov smo izvedli v programu GraphPad Prism 7 (različica 7.03).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Raziskave toksikološkega učinka spojin v vsakodnevni rabi zagotovo pomenijo pomemben del varovanja zdravja in okolja ter zagotavljanja visokega nivoja kvalitete življenja. Številni odkriti pozitivni učinki vnašanja in nanašanja resveratrola kot sestavine različnih prehrabnih in kozmetičnih izdelkov so botrovali porastu uporabe te spojine. Zaradi ugotovljene nizke biorazpoložljivosti resveratrola po vnosu v organizem se je napredek na tem področju usmeril v razvoj analogov z izboljšanimi farmakokinetičnimi lastnostmi. Strukturne spremembe spojin pa poleg (na nekaterih področjih) ugodnih novih lastnosti lahko prinašajo tudi spremembe v toksikološkem profilu spremenjene snovi – nenehno preučevanje in raziskovanje na področju varnosti je tako nujno. Pri spojinah, ki smo jim kronično izpostavljeni, pa še toliko bolj.

Raziskav o delovanju resveratrola in njegovih analogov s spremenjenimi strukturnimi in posledično farmakokinetičnimi lastnostmi na različne endokrine sisteme je bilo že kar nekaj, malo manj pa jih je bilo osredotočenih na tiroidni sistem in tiroidne receptorje (59, 60). Glede na kemijske značilnosti resveratrola in analogov, obstaja sum interakcij s tiroidnimi receptorji in s tem vpliv na hormonalno signalno pot ob izpostavitvi. Naše raziskovalno delo je bilo zato osredotočeno na vpliv resveratrola in njegovih analogov na tiroidni sistem.

Testirali smo resveratrol in sedem njegovih derivatov (spojin ZMP) na celični liniji GH3.TRE-Luc. Gre za linijo transformiranih epitelijskih celic tumorja hipofize podgane, ki ima vstavljen reporterski plazmid za encim luciferazo. Ob dodatku luciferina se je v primeru aktivnega gena za luciferazo (ustrezna viabilnost celic) pojavila bioluminiscenca, z merjenjem katere smo lahko linearno sklepali na aktivnost tiroidnih receptorjev po izpostavitvi celic testiranim spojinam – določili smo lahko morebitni agonistični ali antagonistični učinek spojin na tiroidne receptorje.

Test citotoksičnosti ter luciferazni test smo izvedli ločeno za agonistično in antagonistično delovanje spojin – na eni mikrotitrski ploščici za testiranje agonizma ter drugi za testiranje antagonizma resveratrola ter njegovih analogov ZMP. Spojine v izbranih koncentracijah (5, 10, 20 in 25 μM) smo za testiranje agonističnega delovanja ob nanosu na ploščico redčili le v PCM mediju ter tako agonizem določali neposredno, za testiranje antagonističnega delovanja pa v PCM + T3 mediju, kar pomeni, da smo antagonistični učinek določali posredno prek zmanjšanja agonističnega učinka T3.

Kot kontroli smo uporabili T3 (znan močan agonist na tiroidnih receptorjih) za agonistično delovanje ter BPA (znan močan antagonist na tiroidnih receptorjih) na ploščici za testiranje antagonizma – koncentracije so opisane v poglavju 3.1.1. *Testirane spojine*.

4.1. Citotoksičnost spojin – rezultati testa viabilnosti

Viabilnost celične linije GH3.TRE-Luc po tretiranju z resveratrolom in analognimi spojinami ZMP smo preverjali s testom citotoksičnosti z resazurinom, kot je opisano v poglavju 3.9. *Test citotoksičnosti z resazurinom – test viabilnosti*.

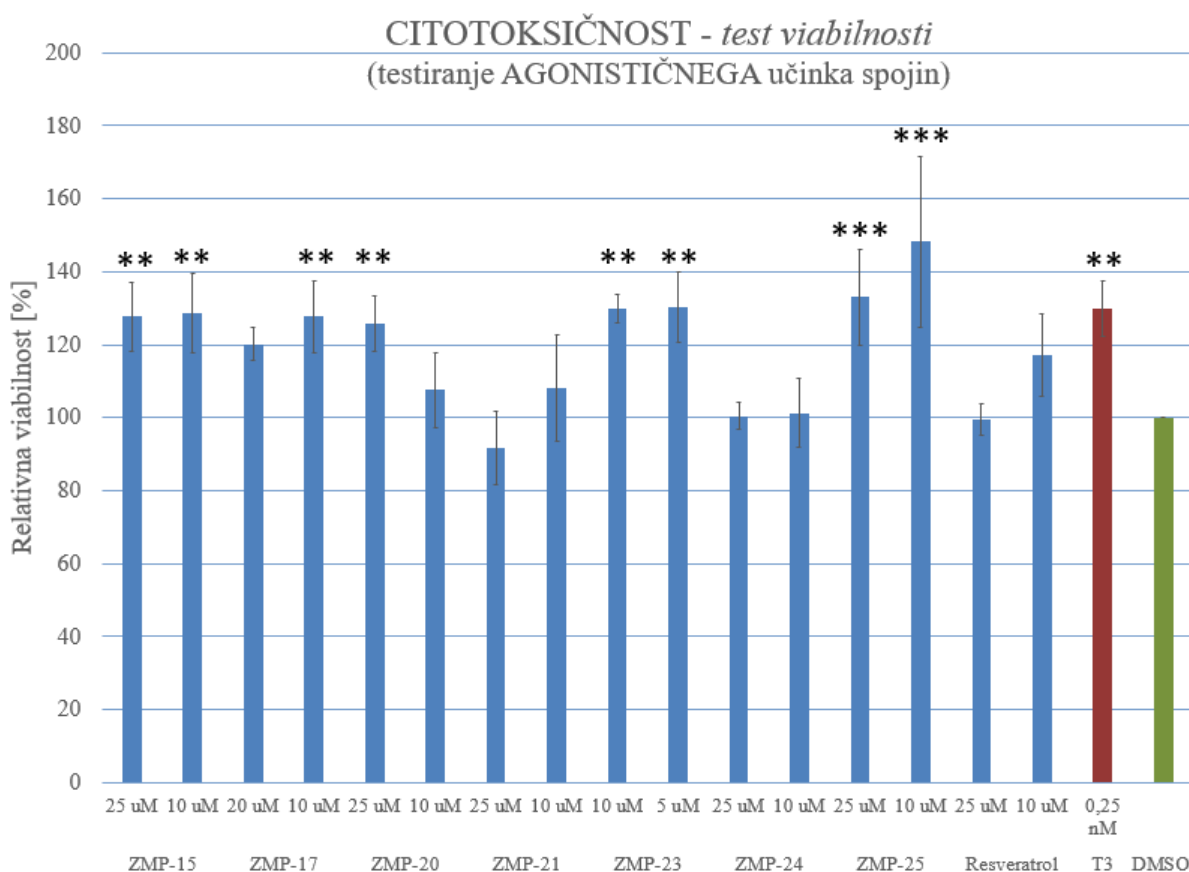
Rezultati naše raziskave, predstavljeni *na sliki 6* nakazujejo, da nobena spojina ZMP v nobeni preizkušani koncentraciji (to so bile 5, 10, 20 ali 25 μM) ne deluje citotoksično – viabilnost celic v primerjavi s kontrolo (celice + medij z DMSO) ni manjša od 80 %. Rezultati so normalizirani na kontrolo vehikla (0,1 % DMSO v mediju). Sicer je znano, da je DMSO citotoksičen (v koncentraciji nad 1 %), vendar so bile vse naše uporabljene koncentracije DMSO vsaj 10 krat nižje.

Večina spojin presega mejo 100 % viabilnosti, kar nakazuje, da spojine ne inhibirajo rasti celic, ampak jim omogočajo celo povečano razmnoževanje. Izjema je resveratrol v višji koncentraciji (25 μM), kjer viabilnost ostaja okrog 100 % (torej približno enaka kot na začetku), podobno tudi spojina ZMP-24 v obeh koncentracijah (10 in 25 μM). Med spojino ZMP-24 in resveratrolom opazimo strukturno enakost v številu in razporeditvi hidroksilnih skupin na obeh osnovnih fenilnih obročih, zato so rezultati pričakovani.

Nekoliko nižjo viabilnost (91,6 %) v primerjavi z ostalimi ZMP spojinami izkazuje tudi ZMP-21 v višji koncentraciji (25 μM). Viabilnost je v tem primeru nižja od 100 %, vendar vseeno ne moremo reči, da je spojina v koncentraciji 25 μM citotoksična, saj ni nižja od 80 %. Najvišjo viabilnost opazimo pri spojini ZMP-25, ki dosega okrog 140 % pri obeh koncentracijah (10 in 25 μM). V primerjavi z resveratrolom ima spojina v svoji strukturni formuli vse hidroksilne skupine zamenjane z metoksi skupinami, le da se te na prvem fenilnem obroču namesto na meta mestih nahajata na orto in para mestu. Spojina ZMP-23, ki je naslednja po obsegu viabilnosti, ima prav tako hidroksilne skupine menjane z metoksi skupinami, le da te ostajajo na meta mestih prvega fenilnega obroča. Sledita spojini ZMP-15 in ZMP-17, ki imata tako kot resveratrol na drugem fenolnem obroču hidroksilno skupino. ZMP-17 ima na prvem fenolnem obroču hidroksilne skupine zamenjane z metoksi skupinami na meta mestih, ZMP-15 pa ima samo eno hidroksilno skupino na para mestu.

Vsi analogi se od resveratrola razlikujejo tudi po povezavi obeh glavnih fenilnih obročev – pri resveratrolu je to etilenska povezava, v analogih pa je nadomeščena z 1,2,4-oksadiazolnim obročem. Glede na rezultate je mogoče, da več hidroksilnih skupin pomeni nižjo viabilnost, menjava z metoksi skupinami pa viabilnost pri GH3 celicah zviša.

Namen našega testa viabilnosti ni bilo kvantitativno preučevanje zaviranja viabilnosti spojin, ampak zgolj ugotavljanje, ali so spojine citotoksične (ali viabilnost pade pod 80 % glede na DMSO), da smo lahko ocenili, ali je smiselno nadaljevati z luciferaznim testom ter pri katerih koncentracijah. Upoštevati je potrebno tudi standardno deviacijo – možen odklon rezultatov od prikazane vrednosti. Kljub upoštevanju možnega odklona še vedno ugotavljamo, da nobena testirana spojina ni izkazala citotoksičnosti pri testiranih koncentracijah. T3 kot kontrolna spojina za agonistično delovanje prav tako ni izkazala citotoksičnih učinkov.



Slika 6: Prestavitev rezultatov testa viabilnosti - testiranje agonističnega učinka spojin.

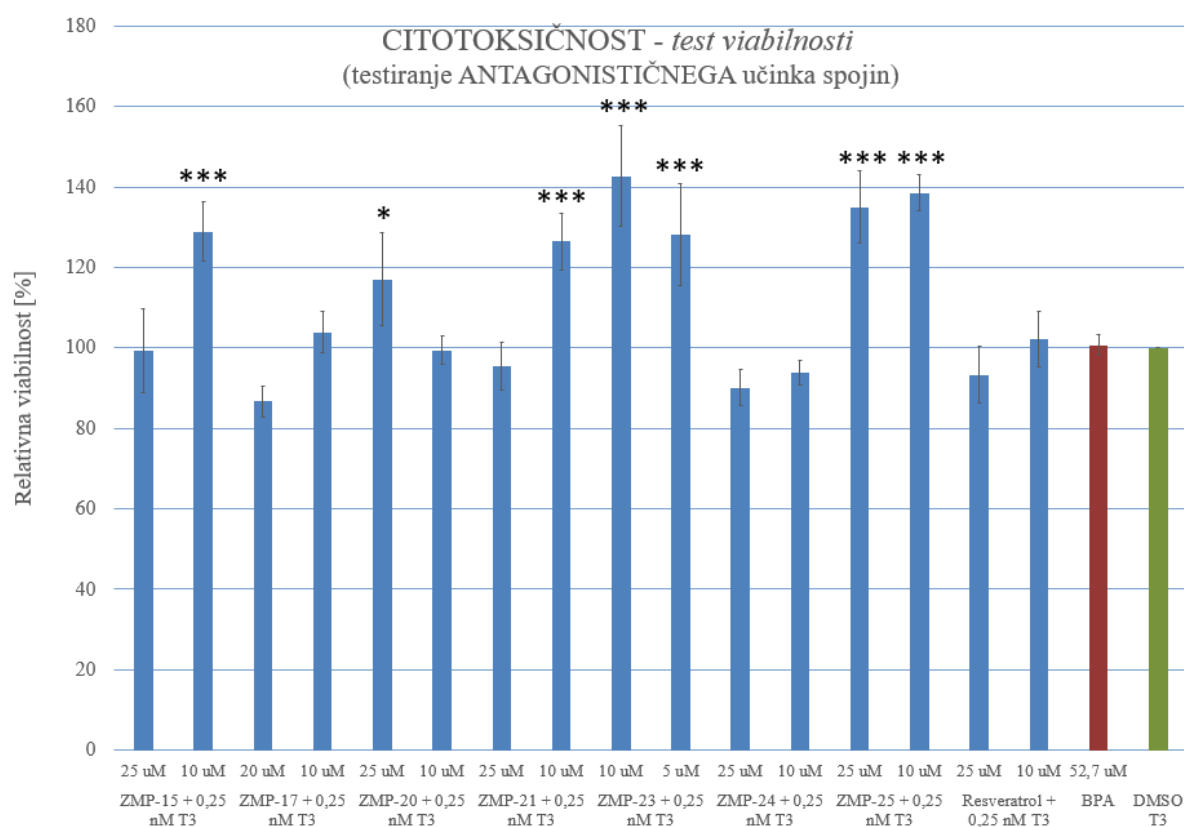
Odstopanja od kontrole (0,1 % DMSO; na sliki označen kot »DMSO«) so bila statistično značilna pri verjetnosti, da sta vzorec in kontrola enaka, manjši od 5 %

(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.001$).**

Tudi stanje na ploščici za preučevanje antagonizma ne odstopa bistveno glede na agonistično ploščico, kot je prikazano na *sliki 7*. Izkazana je opazno nižja viabilnost pri ZMP-17 (86,6 %), tudi pri ostalih spojinah (vključno z resveratrolom) se razlikuje, vendar ne bistveno.

V splošnem je izkazana nekoliko nižja viabilnost, vendar vseeno ne pade pod 80 %. Medij na antagonistični ploščici vsebuje tudi 0,25 nM T3, kar lahko vpliva na rezultat viabilnosti – vsi rezultati na antagonistični ploščici so zato normalizirani na 0,1 % DMSO+T3.

Vpliv DMSO ter T3 na viabilnost pri testiranih spojinah se tako minimalizira. Na rezultate pa lahko vplivajo številni dejavniki – tako med samo izvedbo testa, izvedbo meritve ter tudi pasaža celične linije GH3.



Slika 7: Predstavitev rezultatov testa viabilnosti - testiranje antagonističnega učinka spojin.

Odstopanja od kontrole (0,1 % DMSO+T3; na sliki označen kot »DMSO T3«) so bila statistično značilna pri verjetnosti, da sta vzorec in kontrola enaka, manjši od 5 %

(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.001$).**

4.2. Agonistično in antagonistično delovanje spojin na tiroidne receptorje – rezultati luciferaznega testa

Luciferazni test temelji na izražanju reporterskega gena v GH3.TRE-Luc, ki kodira zapis za encim luciferazo. Reporterski gen ima HRE («hormone response element») regijo, na katero se veže tiroidni receptor z ligandom v obliki dimera. Receptor ima vlogo transkripcijskega faktorja in z vezavo sproži transkripcijo in nadaljnjo pot nastanka encima luciferaze. V prisotnosti agonista tiroidnega receptorja se tiroidni receptor veže na HRE regijo in poteče transkripcija gena – ko pa agonist ni prisoten transkripcija gena za encim luciferazo ne poteče. Vezava antagonista na tiroidne receptorje pa ovira vezavo znanega agonista T3 in tako zmanjša izražanje encima. Tiroidni receptorji se sicer lahko vežejo na DNA ne glede na to, ali so zasedeni s T3 ali ne, kar rezultira v različnih odzivih. Če se veže nezaseden receptor, je spodbujena represija transkripcije gena, medtem ko je ta aktivirana, če se veže receptor z ligandom (14, 15).

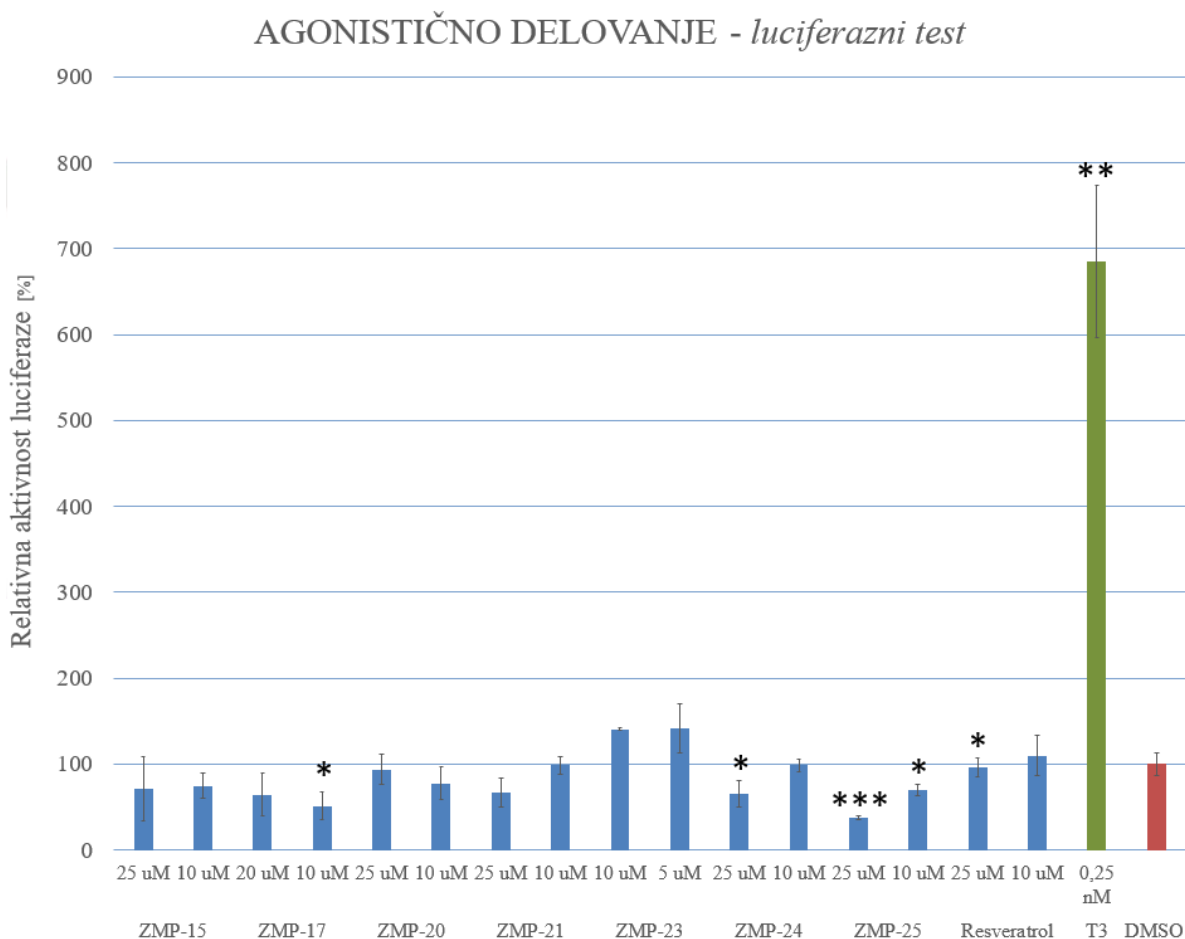
Luciferazni test smo izvedli, kot je opisano v poglavju 3.10. *Luciferazni test*. Agonistični učinek resveratrola in ZMP spojin smo testirali neposredno. Na *sliki 8* najprej opazimo visok agonistični učinek kontrole T3, ki je znan endogeno prisoten agonist – gre za tiroidni hormon trijodtironin. Glede na 0,1 % DMSO v mediju je njegov agonistični potencial kar sedemkrat višji. Meja za izkazovanje agonističnega potenciala je 130 % izražanje encima glede na 0,1 % DMSO. Glede na rezultate torej agonistični učinek izraža ZMP-23 v obeh koncentracijah (pri 5 μ M in verjetno tudi pri 10 μ M – visoka standardna deviacija rezultatov), vse ostale ZMP spojine pa v teh testnih pogojih ne izkazujejo agonističnega delovanja.

Glede na strukturo ZMP-23 lahko sklepamo, da strukturna menjava etilenskega mostu z oksadiazolnim obročem pomeni manjši agonistični učinek na tiroidne receptorje – s tega vidika torej tudi manjši potencial analogov za motenje homeostaze tiroidnega hormonalnega sistema.

Strukturno se ZMP-23 od resveratrola razlikuje v zamenjavi hidroksilnih skupin z metoksi skupinami. To lahko vpliva na logP (višja lipofilnost), kar bi pomenilo, da preostale strukturno različne spojine niso vstopile v celico v dovolj visoki koncentraciji, da bi lahko vplivale na jedrne receptorje.

Iz rezultatov na *sliki 8* je razvidna količina luminiscence je pri merjenju agonističnega delovanja spojin.

Med meritvijo ozadja in rezultata za spojine je razlika med njima ponekod tako nizka, da dobimo rezultate z visoko standardno deviacijo – test je manj občutljiv za določanje agonizma kot antagonizma. Med meritvijo ozadja in rezultata za spojine je razlika med njima ponekod tako nizka, da dobimo rezultate z visoko standardno deviacijo.



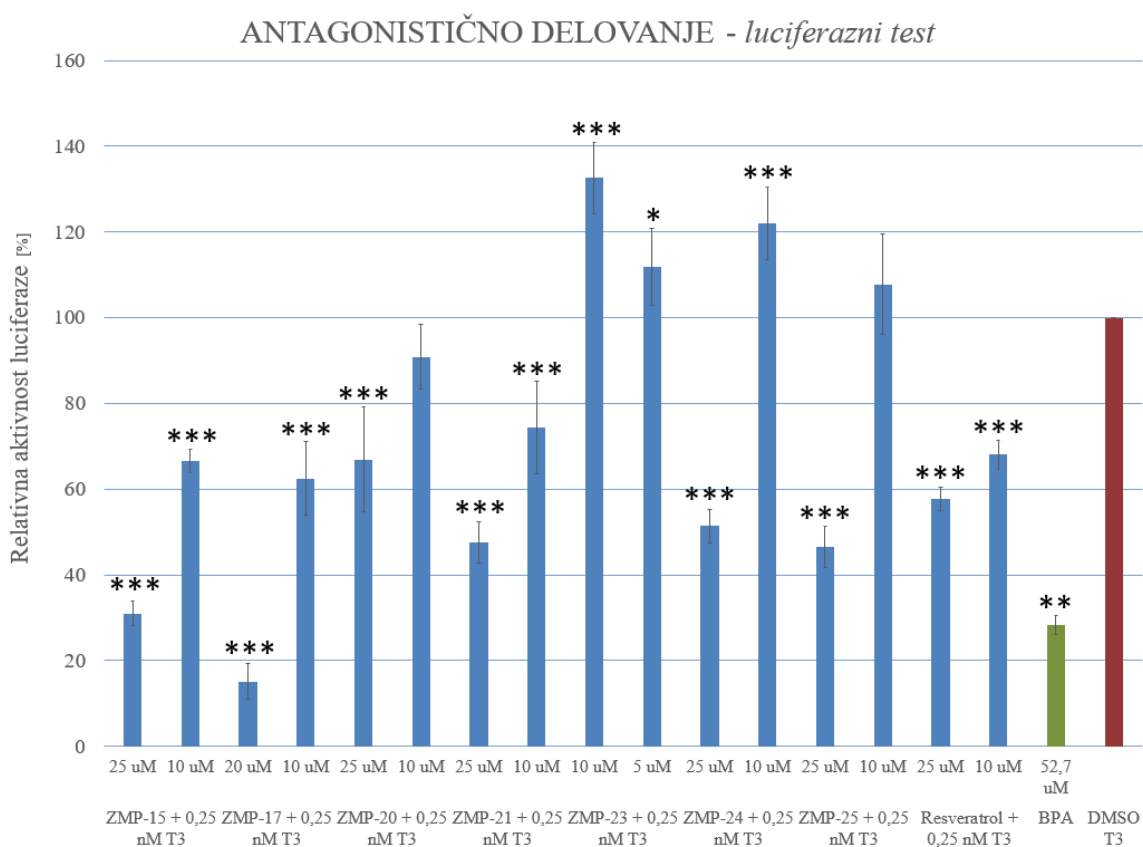
Slika 8: Predstavitev rezultatov luciferaznega testa - testiranje agonističnega učinka spojin.

Statistična signifikanca: $p < 0.05$ (); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)*.

Antagonistični potencial spojin smo preučevali posredno, prek zmanjšanja agonističnega učinka T3 povzročene zaradi prisotnosti testiranih spojin. Rezultati so predstavljeni na *sliki 9*. Brez prisotnosti znanega agonista namreč ne bi mogli oceniti antagonističnega učinka na receptor. T3 omogoča ocenjevanje učinka antagonista, saj test temelji na zaznavanju sposobnosti spojin, da znižajo luminiscenco, inducirano z znanim agonistom T3.

Kot kontrolo antagonističnega delovanja spojin smo uporabili BPA, znan antagonist, in pričakovano celice ob njegovi prisotnosti izražajo zelo malo encima (nizka izmerjena vrednost bioluminiscence) – aktivnost prisotnega T3 je zmanjšana na približno 70 %. O spojini kot antagonistu lahko govorimo, če zmanjša aktivnost T3 dodanega v mediju za 30 % - torej je aktivnost spojine manj kot 70 % glede na 0,1 % DMSO s T3 – 100 % pomeni aktivnost T3 brez prisotnega antagonista.

Glede na rezultate naše raziskave antagonistični učinek izkazujejo spojine ZMP-15 v koncentracijah 25 in 10 μ M, ZMP-17 (20 μ M), ZMP-21 (25 μ M), ZMP-24 (25 μ M), ZMP-25 (25 μ M) in resveratrol (25 μ M). Antagonistični učinek verjetno izkazujejo tudi ZMP-17 (10 μ M) ZMP-20 (25 μ M), ZMP-21 (10 μ M) in resveratrol (10 μ M), vendar zaradi velikega standardnega odklona rezultatov tega ne moremo signifikantno potrditi.



Slika 9: Predstavitev rezultatov luciferaznega testa - testiranje antagonističnega učinka spojin.

Statistična signifikanca: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***).

Opazen je tudi razkorak med antagonističnim učinkom iste spojine v nižji in višji izbrani koncentraciji, ki ga najbolj opazimo pri ZMP-17, ZMP-24 in ZMP-25.

Zaključimo lahko, da tako resveratrol kot njegovi analogi izkazujejo antagonistični učinek na tiroidni receptor, jakost učinka pa s koncentracijo narašča. Ker učinek sledi trendu tudi pri nižanju koncentracije spojin, bi to mogoče lahko nakazovalo na obstoj koncentracije »varne« za uporabo, ki ne bi bistveno interferirala s hormonsko homeostazo organizma (z upoštevanjem, da so bila testiranja izvedena na celični liniji GH3.TRE-Luc).

Ob interpretaciji rezultatov testiranih spojin z luciferaznim testom, kjer smo uporabili ONE-Glo™ luciferazni reagent pa moramo upoštevati tudi opozorilo, ki ga vsebuje priložen protokol izvajalca – ta jasno navaja, da resveratrol (v testirani koncentraciji 10 μ M) izkazuje inhibitorni učinek na luciferazo. To bi pomenilo, da je bioluminiscentni odziv lahko zmanjšan tudi po drugi poti, ne samo prek učinka spojin na tiroidni receptor, kar pomeni lažni antagonizem. Protokol za uporabljeni reagent navaja še, da je ONE-Glo™ luciferazni reagent na slednji učinek odpornejši kot drugi sorodni reagenti drugih proizvajalcev – reagent ohranja 86 % svoje aktivnosti v prisotnosti 10 μ M resveratrola. Potrebno je torej upoštevati inhibitorni učinek resveratrola na luciferazo prek sekundarne poti, ki ni povezana s tiroidnim receptorjem. Tega učinka tako ne moremo popolnoma izključiti tudi pri testiranih analogih resveratrola, kar pa bi lahko potrdili le s testom inhibicije izoliranega encima.

Kljub vsem omenjenim težavam pri vrednotenju učinkov analogov resveratrola v opisanem testu pa rezultati kažejo, da imajo nekateri potencial vpliva na homeostazo delovanja tiroidnega hormonskega sistema.

5. SKLEP

Rezultati naše raziskave so pokazali, da imajo vse testirane spojine potencial za interferiranje s hormonsko homeostazo organizma – izkazujejo lastnosti hormonskih motilcev.

Spojina ZMP-23 z veliko verjetnostjo izkazuje agonistično delovanje, medtem ko ZMP-15, ZMP-17, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 in resveratrol izkazujejo antagonistično delovanje na tiroidni receptor – jakost učinka narašča s koncentracijo.

V povezavi s hipotezami, postavljenimi na začetku naloge, so rezultati eksperimentalnega dela omogočili sledeče ugotovitve:

- 1.) Testirali smo spojine ZMP-15, ZMP-17, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-23, ZMP-24, ZMP-25 ter resveratrol, katerih koncentracije smo izbrali na podlagi podatkov o uporabljenih koncentracijah v drugih sorodnih študijah – to sta bili koncentraciji 10 in 25 μM . Zaradi izkazane citotoksičnosti smo znižali koncentraciji ZMP-17 na 10 in 20 μM , ZMP-23 pa na 5 in 10 μM zaradi obarjanja v testnem sistemu v primeru uporabe višjih koncentracij.
- 2.) Potrdili smo hipotezo, da so **resveratrol in izbrane ZMP spojine nizko toksične za celično linijo GH3.TRE-Luc** – glede na rezultate testa viabilnosti lahko zaključimo, da spojine za linijo GH3.TRE-Luc celo niso toksične, nekatere pa nekoliko pripomorejo k zaviranju nadaljnje rasti in razmnoževanja celic (v primeru resveratrola v koncentraciji 25 μM , ZMP-21 (25 μM) ter ZMP-24 (10 in 25 μM)).
- 3.) Hipotezo, da bo **resveratrol izkazal učinek na tiroidne receptorje (agonistični ali antagonistični)**, verjetno lahko potrdimo – resveratrol je v koncentraciji 25 μM dosegel 57,8 % izražanje luciferaze, v koncentraciji 10 μM pa 68,0 % ($\pm 3,4$ %) izražanje luciferaze glede na 0,1 % DMSO+T3 – kar pomeni, da resveratrol v testiranih koncentracijah izkazuje antagonistični učinek na tiroidni receptor. Ugotovitev pa velja le za testirane koncentracije – hipoteza je bila postavljena preveč splošno, zato jo težko v celoti potrdimo. Agonističnega učinka ni izkazal.
- 4.) Hipotezo, da bodo **tudi vsi testirani analogi (ZMP spojine) izkazali učinek na tiroidne receptorje (agonistični ali antagonistični)**, verjetno lahko potrdimo. Mejo za agonistično delovanje spojine (130 % izražanje encima glede na 0,1 % DMSO v mediju) so na luciferaznem testu dosegle spojine:

- ZMP-23 (10 μ M): 140,5 % - lahko potrdimo agonistično delovanje;
- ZMP-23 (5 μ M): 141,5 % \pm 29,0 % - zelo visok SD, ne moremo zagotovo potrditi agonističnega delovanja;

Ostale spojine niso izkazale agonističnega delovanja, so pa nekatere izkazale antagonistični potencial - meja za izkazovanje antagonističnega potenciala je znižanje aktivnosti T3 dodanega v mediju za 30 % - aktivnost spojine mora pasti na največ 70 % glede na DMSO+T3:

- ZMP-15 (25 μ M): 30,9 % - lahko potrdimo antagonistično delovanje;
- ZMP-15 (10 μ M): 66,6 % - lahko potrdimo antagonistično delovanje;
- ZMP-17 (20 μ M): 15,5 % \pm 4,1% - vendar je relativna standardna deviacija previsoka, zato ne moremo potrditi antagonističnega delovanja;
- ZMP-17 (10 μ M): 62,5 % \pm 8,5 % - visok SD, ne moremo zagotovo potrditi antagonističnega delovanja;
- ZMP-20 (25 μ M): 67,0 % \pm 12,2 % - visok SD; ne moremo zagotovo potrditi antagonističnega delovanja;
- ZMP-21 (25 μ M): 47,5 % \pm 4,8 % - lahko potrdimo antagonistično delovanje;
- ZMP-24 (25 μ M): 51,4 % \pm 3,9 % - lahko potrdimo antagonistično delovanje;
- ZMP-25 (25 μ M): 46,6 % \pm 4,9 % - lahko potrdimo antagonistično delovanje;
- resveratrol (25 μ M): 57,8 % \pm 2,8 % - lahko potrdimo antagonistično delovanje;
- resveratrol (10 μ M): 68,0 % \pm 3,4 % - zaradi SD ne moremo zagotovo potrditi antagonističnega delovanja.

Glede na naše rezultate verjetno vse testirane spojine izkazujejo agonistični ali antagonistični potencial na tiroidni receptor. Rezultati raziskav na drugih hormonskih sistemih, kot sta glukokortikoidni ali androgeni, prav tako kažejo na potencial spojin kot hormonskih motilcev. Vse naše testirane spojine (razen ZMP-23) izkazujejo tudi šibko glukokortikoidno delovanje na celično linijo MDA-kb2 – nobena pa ne izkazuje antiglukokortikoidnega delovanja (59).

Prav tako vse spojine (vključno z ZMP-23) v izbranih koncentracijah izkazujejo androgeno delovanje na celično linijo MDA-kb2, nobena pa ne izkazuje antiandrogenega delovanja (60).

5.) V zvezi s hipotezo, da imajo **analogi resveratrola z zaetrenimi metoksi skupinami višji agonistični potencial na tiroidne receptorje kot resveratrol**, smo ugotovili naslednje:

- strukturna menjava etilenskega mostu z oksadiazolnim obročem glede na naše rezultate testiranj pomeni manjši agonistični učinek na tiroidne receptorje;
- vezava metoksi skupine na drugem fenilnem obroču glede na naše rezultate poveča agonistični potencial spojine;
- zamenjava hidroksilnih skupin z metoksi skupinami lahko vpliva na logP (višja lipofilnost), kar bi lahko pomenilo, da preostale strukturno različne spojine niso vstopile v celico v dovoljšni meri, da bi lahko vplivale na jedrne receptorje.

Ugotovitve hipotezo potrjujejo, saj menjava hidroksilnih skupin z metoksi skupinami povečuje agonistični potencial – hkrati pa povečuje lipofilnost in s tem dostop spojine do samega jedra in tiroidnih receptorjev (slednje velja tudi za spojine z antagonističnim učinkom ob zamenjavi hidroksilnih skupin z metoksi skupinami).

LITERATURA

1. Baur, J. A. in Sinclair, D. A.: *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. Nature Reviews. 5, 2006.
2. University of Wisconsin-Madison. *Substance In Red Wine, Resveratrol, Found To Keep Hearts Young*. ScienceDaily. ScienceDaily, 2008. [datum ogleda: 31.7.2017]
Dostopno na: <https://www.sciencedaily.com/releases/2008/06/080604074908.htm>
3. Orallo, F.: *Trans-resveratrol: a magical elixir of eternal youth?* Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (La Coruña). Spain. 15. 1887-98, 2008.
4. Marieb, E.: *Anatomy & physiology*. Glenview, IL: Pearson Education Inc.. 615-655, 2014.
5. Štiblar Martinčič, D., Cör, A., Cvetko, E., Marš, T., Legan, M.: *Anatomija, histologija in fiziologija*. 2. izdaja. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani. Ljubljana. 83-92, 2008.
6. Dolinar, M., Cunk Manić, V., Tarman Šmit I.: *Anatomija in fiziologija človeka*. Podsmreka. 2015: 183-202, 2015.
7. Kendall, E. C., in Osterberg, A. E.: *The chemical identification of thyroxin*. J. Biol. Chem. 40. 265– 334, 1919.
8. Staff. *Endocrine Disruptors*. NIEHS. 2013. [datum ogleda: 20.7.2017]
Dostopno na: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>
9. Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., Zoeller R. T.: "*Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals*". *Endocrine Reviews*. 36 (6): 593–602, 2015.
10. Staff. *Endocrine Disruptors*. NIEHS. 2013. [datum ogleda: 20.7.2017]
Dostopno na: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>
11. Schvecnikov, K., Izzo, G., Landreh, L., Weisser, J., Söder, O.: *Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 1-10, 2010.
12. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guidance Document (GD) On Standardised Test Guidelines For Evaluating Chemicals For Endocrine Disruption: Case Studies Using Example Chemicals Series on Testing and Assessment*. No. 181, 2012.
13. OECD. *Work related to Endocrine Disruptors*. [datum ogleda: 20.7.2017]

- Dostopno na:
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>
14. Brent, G.A.: *Mechanisms of disease: The molecular basis of thyroid hormone action*. New Eng J Med. 331:847-853, 1994.
 15. Tsai, M., O'Malley, B. W.: *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. Annu Rev Biochem. 63:451-486, 1994.
 16. Zhang, J., Lazer, M. A.: *The mechanism of action of thyroid hormones*. Annu Rev Physiol 62:439-466, 2000.
 17. Ausubel, F. M.: *Isolation of phytoalexin-deficient mutants of Arabidopsis thaliana and characterization of their interactions with bacterial pathogens*. PNAS. 91 (19): 8955–8959, 1994.
 18. NIDDK. *Resveratrol*. 2013. [datum ogleda: 20.7.2017]
Dostopno na: <https://livertox.nlm.nih.gov/Resveratrol.htm>
 19. HMDB. *Showing metabocard for Resveratrol*. [datum ogleda: 20.7.2017]
Dostopno na: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB03747>
 20. Delmas, D., Aires, V., Colin, D. J., Limagne, E., Scagliarini, A., Cotte, A. K., Ghiringhelli, F.: *Importance of lipid microdomains, rafts, in absorbiton, delivery, and biological effects of resveratrol*. Annals of the New York Academy of Sciences. 1290: 90-97, 2013.
 21. PubChem. *Resveratrol*. [datum ogleda: 20.7.2017]
Dostopno na:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/resveratrol#section=Computed-Properties>
 22. Mattivi, F., Reniero, F., Korhammer, S.; Reniero, Korhammer.: *Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43 (7): 1820–3, 1995.
 23. Santos, A. C., Veiga, F., Ribeiro J. A.: *New Delivery Systems to Improve the Bioavailability of Resveratrol*. University of Coimbra. Portugal. Expert Opin Drug Deliv. (8):973-90, 2011.
 24. Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., Walle, U.K.; Hsieh; Delegge; Oatis, Jr.; Walle: *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*. Drug Metab. Dispos. 32 (12): 1377–82, 2004.
 25. Turner, R. S., Thomas, R. G., Craft, S., van Dyck, C.H., Mintzer, J., Reynolds, B. A., Brewer, J. B., Rissman, R. A., Raman, R., Aisen, P. S.: *Alzheimer's Disease*

- Cooperative Study: *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. Neurology.* 85 (16): 1383–91, 2015.
26. Ogas, T., Kondratyuk, T. P., Pezzuto, J. M.: *Resveratrol analogs: promising chemopreventive agents.* *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1290: 21-29, 2013.
 27. Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L. in Diederich, M.: *The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies.* *International Journal of Cell Biology.* 2010.
 28. DuBois, R.N., Abramson, S.P., Crofford, L. in drugi. *Cyclooxygenase in biology and disease.* *FASEB Journal,* vol. 12, no. 12., 1063–1073, 1998.
 29. Cao, Y. in Prescott, S.M. *Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer.* *Journal of Cellular Physiology,* vol. 190, no. 3., 279–286, 2002.
 30. Ristimaki, A., Sivula, J. in drugi. *Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer.* *Cancer Research,* vol. 62, no. 3., 632–635, 2002.
 31. Secchiero, P., Barbarotto, E., Gonelli, A. in drugi. *Potential pathogenetic implications of cyclooxygenase-2 overexpression in B chronic lymphoid leukemia cells.* *American Journal of Pathology,* vol. 167, no. 6., 1599–1607, 2005.
 32. Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L. in Diederichl, M. *The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies.* *International Journal of Cell Biology.* Vol. 2010, ID članka 215158, 21, 2010.
 33. Santulli, G.: *Angiogenesis insights from a systematic overview.* New York: Nova Science. 135-144, 2013.
 34. Juan, E. M., Vinardell, P. M., Planas, J. M.: *The Daily Oral Administration of High Doses of trans-Resveratrol to Rats for 28 Days Is Not Harmful.* *The Journal of Nutrition.* 132: 257-260, 2002.
 35. Williams, L. D., Burdock, G. A., Edwards, J. A., Beck, M., Bausch, J.: *Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals.* *Food and Chemical Toxicology.* 47:2170–2182, 2009.
 36. Crowell, J. A., Korytko, P. J., Morrissey, R. L., Booth, T. D., Levine, B. S.: *Resveratrol-Associated Renal Toxicity.* *Toxicological sciences.* 82: 614–619, 2004.
 37. Boocock, D. J., Faust, G. E., Patel, K. R., in drugi: *Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(6). 1246-1252, 2007.

38. Brown, V. A., Patel, K. R., Viskaduraki, M., in *drugi: Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis*. *Cancer Res.* 70(22). 9003-9011, 2010.
39. la Porte, C., Voduc, N., Zhang, G. in *drugi: Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects*. *Clin Pharmacokinet.* 49(7). 449-454, 2010.
40. Hendler, S. S., Rorvik, D. R., in *drugi: PDR for Nutritional Supplements*. 2nd edition. Thomson Reuters. 743-787, 2008.
41. American Academy of Pediatrics. Committee on Substance Abuse and Committee on Children With Disabilities. *Fetal alcohol syndrome and alcohol-related neurodevelopmental disorders*. *Pediatrics.* 106 (2 Pt 1). 358-361, 2000.
42. Gobec, M., Tomašič, T., Markovič, T., Mlinarič-Raščan, I., Sollner Dolenc, M. in Jakopin, Ž. *Antioxidant and anti-inflammatory properties of 1,2,4-oxadiazole analogs of resveratrol*. *Chemico-Biological Interactions*. Volume 240. 200-207, 2015.
43. Ogas, T., Kondratyuk, T.P., Pezzuto, J.M. Resveratrol analogs: promising chemopreventive agents. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1290: 21-29, 2013.
44. Iguchi, K., Toyama, T., Ito, T., Shakui, T., Usui, S., Oyama, M., Inuma, M., Hirano, K. *Antiandrogenic activity of resveratrol analogs in prostate cancer LNCaP cells*. *Journal of Andrology.* 33 (6): 1208-1215, 2012.
45. Patricia, M., Hinkle, M., Perrone, H. in Greer, T. L.: *Thyroid Hormone Action in Pituitary Cells*. Department of Pharmacology and Toxicology and the University of Rochester Cancer Center. University of Rochester School of Medicine and Dentistry. Rochester. Vol. 254, No. 10. 25. 3907-3911, 1979.
46. Freitas J., Cano, P., Craig-Veit, C., Goodson, M. L., Furlow, J. D., Murk, A. J.: *Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay*. *Toxicol In Vitro.* 25(1):257-66, 2011.
47. Freitas, J., Cano, P., Craig-Veit, C., Goodson, M.L., Furlow, J.D., Murk, A.J. *Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay*. *Toxicol In Vitro.* 25(1):257-66, 2011.
48. OECD. *Good Laboratory Practice (GLP)*. [datum ogleda: 31.7.2017]
Dostopno na: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/good-laboratory-practiceglp.htm>

49. Bueno, C., Villegas, M. L., Bertolotti, S. G., Previtali, C. M. Neumann, M. G., Encinas, M. V.: *The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction.* Photochemistry and Photobiology. 76 (4): 385–90, 2002.
50. Chen, J. L., Steele, T. W., in Stuckey, D. C.: *Modeling and application of a rapid fluorescence-based assay for biotoxicity in anaerobic digestion.* Environmental science & technology. 49(22), 13463-13471, 2015.
51. Riss, T.L., Moravec, A. R., Niles, L. A., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J. in drugi: *Cell Viability Assays Minor.* 2013. [datum ogleda: 31.7.2017]
Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
52. Promega. Technical Manual: *ONE-Glo™ Luciferase Assay System. Instructions for Use of Products.* 2016.
53. Allard, T. S. M. in Kopish, K. - Promega Corporation. *Luciferase Reporter Assays - Powerful, Adaptable Tools for Cell Biology Research.* 2008.
54. Forrest, D., Hallbook, F., Persson, H. in Vennstrom, B. *Distinct functions for thyroid hormone receptors α and β in brain development indicated by differential expression of receptor genes.* The EMBO Journal vol.10 no.2. 269-275, 1991.
55. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000300008
[datum ogleda: 15.8.2017]
56. <https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-protocol/> [datum ogleda: 15.8.2017]
57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F7/>
[datum ogleda: 15.8.2017]
58. <http://www.intrace-medical.com/probe-boutique/d-luciferin-potassium-salt-standad-purity/> [datum ogleda: 15.8.2017]
59. Račnik, Š. *Določanje vpliva resveratrola in njegovih analogov na glukokortikoidne receptorje.* Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani. 2014.
60. Črešnjovec, K. *Določanje vpliva resveratrola in njegovih analogov na glukokortikoidne receptorje.* Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani. 2015.

PRILOGE

Priloga 1:

Schema nasajanja in tretiranja celic s spojinami na mikrotitrski ploščici za testiranje agonističnega in antagonističnega učinka na izražanje tiroidnih receptorjev v celicah CH3.TRE-Luc. Na isti ploščici smo izvedli tako test citotoksičnosti kot luciferazni test. Robne vdolbine smo pustili prazne v izogib t.i. »robnemu efektu«.

Preglednica 4: Shema nasaditve in tretiranja celic.

| ANT | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----|---|--------|-------|------------|--------|-------|------------|--------|---------|------------|------------|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | ZMP-15 | 25 µM | T3 0,25 nM | ZMP-21 | 25 µM | T3 0,25 nM | ZMP-25 | 25 µM | T3 0,25 nM | medij | |
| C | | | 10 µM | T3 0,25 nM | | 10 µM | T3 0,25 nM | | 10 µM | T3 0,25 nM | celice + | |
| D | | ZMP-17 | 20 µM | T3 0,25 nM | ZMP-23 | 10 µM | T3 0,25 nM | RSV | 25 µM | T3 0,25 nM | sam medij | |
| E | | | 10 µM | T3 0,25 nM | | 5 µM | T3 0,25 nM | | 10 µM | T3 0,25 nM | DMSO | slepa (nič celic + medij DMSO) |
| F | | ZMP-20 | 25 µM | T3 0,25 nM | ZMP-24 | 25 µM | T3 0,25 nM | BPA | 52,7 uM | T3 0,25 nM | celice + | |
| G | | | 10 µM | T3 0,25 nM | | 10 µM | T3 0,25 nM | | DMSO | T3 0,25 nM | medij DMSO | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| AGO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----|---|--------|-------|---|--------|-------|---|--------|---------|----|------------|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | ZMP-15 | 25 µM | | ZMP-21 | 25 µM | | ZMP-25 | 25 µM | | medij | |
| C | | | 10 µM | | | 10 µM | | | 10 µM | | celice + | |
| D | | ZMP-17 | 20 µM | | ZMP-23 | 10 µM | | RSV | 25 µM | | sam medij | |
| E | | | 10 µM | | | 5 µM | | | 10 µM | | DMSO | slepa (nič celic + medij DMSO) |
| F | | ZMP-20 | 25 µM | | ZMP-24 | 25 µM | | T3 | 0,25 nM | | celice + | |
| G | | | 10 µM | | | 10 µM | | | DMSO | | medij DMSO | |
| H | | | | | | | | | | | | |