

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA OVIJAČ
DIPLOMSKO DELO
UNIVERZITETNI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA OVIJAČ
VREDNOTENJE METABOLIZMA, ENDOKRINIH
UČINKOV IN REPRODUKCIJSKE TOKSIČNOSTI
IZBRANIH CINAMATOV IN SILICO

IN SILICO EVALUATION OF METABOLISM,
ENDOCRINE EFFECTS AND REPRODUCTIVE TOXICITY
OF SELECTED CINNAMATES

Ljubljana, 2018

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju,izr. prof. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za strokovno usmerjanje, pomoč in podporo pri izdelavi diplomskega dela. Hvala bližnjim družinskim članom in najboljšim prijateljem, ki so me podpirali in spodbujali tekom študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Kaja Ovijač

Predsednica komisije: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Naraša Karas Kuželički, mag. farm.

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. UV-FILTRI V KOZMETIČNIH IZDELKIH.....	1
1.2. CINAMATI KOT UV-FILTRI.....	1
1.2.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI	2
1.2.2. ABSORPCIJA IN PENETRACIJA	2
1.2.3. IZPOSTAVLJENOST	3
1.2.4. TOKSIČNI UČINKI	4
1.3. ENDOKRINI SISTEM	5
1.3.1. RECEPTORJI.....	5
1.3.2. MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA	6
1.3.3. MEHANIZMI DELOVANJA MOTILCEV ENDOKRINEGA SISTEMA ...	7
1.4. REPRODUKCIJSKA TOKSIČNOST	7
1.5. <i>IN SILICO</i> METODE	8
1.5.1. (Q)SAR MODELI IN EKSPERTNI SISTEM	9
1.5.2. <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE METABOLIZMA.....	9
1.5.3. <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE ENDOKRINIH UČINKOV.....	10
1.5.4. <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE REPRODUKCIJSKE TOKSIČNOSTI ...	11
2. NAČRT ZA DELO	12
3. METODE IN MATERIALI	13
3.1. IZBRANI CINAMATI	13
3.2. NEGATIVNA IN POZITIVNA KONTROLA	13
3.3. UPORABLJENI RAČUNALNIŠKI PROGRAMI IN SPECIFIKACIJA NASTAVITEV	14
3.3.1. PROGRAM ZA NAPOVEDOVANJE METABOLIZMA.....	14
3.3.2. PROGRAMA ZA NAPOVEDOVANJE ENDOKRINE TOKSIČNOSTI... 15	
3.3.3. PROGRAMI ZA NAPOVED REPRODUKCIJSKE TOKSIČNOSTI.....	17
3.4. POTEK DELA Z UPORABLJENIMI METODAMI.....	19
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	20
4.1. METABOLIZEM PREISKOVANIH CINAMATOV	20
4.1.1. 2-ETILHEKSIL METOKSICIANMAT	20
4.1.2. IZOAMIL METOKSICINMAT	30
4.1.3. DISKUSIJA	36
4.2. ZBRANI METABOLITI	38
4.3. ENDOKRINO DELOVANJE	46

4.3.1. REZULTATI PROGRAMA ENDOCRINE DISRUPTOME.....	46
4.3.2. REZULTATI PROGRAMA VEGA - Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model.....	49
4.3.3. DISKUSIJA VEZAVE NA RECEPTORJE	51
4.4. REPRODUKCIJSKA TOKSIČNOST	57
4.4.1. REZULTATI PROGRAMA VEGA - Developmental Toxicity model.....	57
4.4.2. REZULTATI PROGRAMA VEGA - Developmental/Reproductive Toxicity model.....	57
4.4.3. REZULTATI PROGRAMA TEST.....	58
4.4.4. REZULTATI PROGRAMA DEREK NEXUS.....	58
4.4.5. DISKUSIJA.....	61
5. SKLEPI	64
6. VIRI IN LITERATURA	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Napovedna shema metabolizma EHMC; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	21
Slika 2: Napovedna shema metabolizma produkta E1; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	22
Slika 3: Napovedna shema metabolizma produkta E2; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	23
Slika 4: Napovedna shema metabolizma produkta E3; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	24
Slika 5: Napovedna shema metabolizma produkta E4; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	25
Slika 6: Napovedna shema metabolizma produkta E5; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	26
Slika 7: Napovedna shema metabolizma produkta E6; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	27
Slika 8: Napovedna shema metabolizma produkta E7; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	28
Slika 9: Napovedna shema metabolizma produkta E8; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	29
Slika 10: Napovedna shema metabolizma produkta E9; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	30
Slika 11: Napovedna shema metabolizma IAMC; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	31
Slika 12: Napovedna shema metabolizma produkta I1; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	32
Slika 13: Napovedna shema metabolizma produkta I2; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	33
Slika 14: Napovedna shema metabolizma produkta I3; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	33
Slika 15: Napovedna shema metabolizma produkta I4; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	34
Slika 16: Napovedna shema metabolizma produkta I5; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.	35

Slika 17: Napovedna shema metabolizma produkta I6; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.....	36
Slika 18: Metaboliti, ki so jih zaznali v <i>in vitro/in vivo</i> raziskavah in smo jih napovedali tudi z <i>in silico</i> metodo.	38
Slika 19: Metabolit 53 s srednjo verjetnostjo vezave na AR in metabolit 7 z veliko verjetnostjo vezave na agonistično konformacijo AR an.	51
Slika 20: Strukturna formula bucalutamida.	51
Slika 21: Strukturna formula endogenega agonista AR 4,5-dihidrotosterona.	52
Slika 22: Strukturna formula endogenega agonista ER 17 β -estradiola (E2).	54
Slika 23: Primeri metabolitov, ki se vežejo na receptor TR α ali TR β s srednjo vezavno verjetnostjo.	55
Slika 24: Strukturna formula endogenih ligandov TR trijodtironina (T3) in tiroksina (T4).	56
Slika 25: Strukturna formula endogenega liganda GR kortizola.....	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Strukturne formule, CAS številke in SMILES kode 2-etilheksil metoksicinamata in izoamil metoksicinamata.....	13
Preglednica II: Strukturni formuli, CAS številki in SMILES kodi za timol in bisfenol A.	14
Preglednica III: Zbrani metaboliti EHMC in IAMC za nadaljnjo raziskavo endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti.	38
Preglednica IV: Rezultati vezave EHMC, IAMC, pozitivne in negativne kontrole na različne hormonske receptorje s programom Endorine Disruptome; legenda: rdeča-največja vezavna verjetnost, oranžna-velika vezavna verjetnost, rumena-srednja vezavna verjetnost in zelena-majhna verjetnost vezave.....	47
Preglednica V: Rezultati vezave metabolitov na različne hormonske receptorje s programom Endorine Disruptome; legenda: rdeča-največja vezavna verjetnost, oranžna-velika vezavna verjetnost, rumena-srednja vezavna verjetnost in zelena-majhna vezavna verjetnost.	48
Preglednica VI: Rezultati programa VEGA za EHMC, IAMC, pozitivne in negativne kontrole za napoved endokrine toksičnosti preko ER; legenda: rdeča-spojina je aktivna, zelena-spojina ni aktivna, ●●● visoka zanesljivost (spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ●● srednja zanesljivost (spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela), ● nizka zanesljivost (spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela), oznaka E - v bazi modela obstajajo dodatni eksperimentalni podatki.....	49
Preglednica VII: Rezultati programa za napoved endokrine toksičnosti metabolitov preko ER; legenda: rdeča-spojina je aktivna, zelena-spojina ni aktivna, ●●● visoka zanesljivost (spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ●● srednja zanesljivost (spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela), ● nizka zanesljivost (spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela), oznaka E - v bazi modela obstajajo dodatni eksperimentalni podatki.....	50
Preglednica VIII: Rezultati programa Derek Nexus, VEGA in TEST za EHMC, IAMC, pozitivne in negativne kontrole za napoved različnih vidikov reprodukcijske toksičnosti; legenda: rdeča-spojina je toksična, zelena-spojina ni toksična, ●●● visoka zanesljivost (spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ●● srednja zanesljivost (spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela), ● nizka zanesljivost (spojina se	

nahaja izven območja uporabnosti modela), negativni znak (-) – ni podanega opozorila o reproduktivni toksičnosti. 59

Preglednica IX: Rezultati programa Derek Nexus, VEGA in TEST za metabolite za napoved različnih vidikov reprodukcijske toksičnosti; legenda: rdeča - spojina je toksična, zelena - spojina ni toksična, ●●● visoka zanesljivost (spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ●● srednja zanesljivost (spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela), ● nizka zanesljivost (spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela), negativni znak (-) – ni podanega opozorila o reproduktivni toksičnosti, oznaka E - v bazi modela obstajajo dodatni eksperimentalni podatki. 59

POVZETEK

Zaradi škodljivih učinkov UV sevanja narašča ozaveščenost o uporabi kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem, ki kot aktivne sestavine vsebujejo UV-filtre. Te lahko najdemo tudi v drugih kozmetičnih izdelkih, zato smo jim pogosto izpostavljeni. Zaradi njihove razširjene uporabe se nahajajo tudi v podtalnici, odpadnih vodah in rekah. Pojavlja se vprašanje ali so te sestavine varne za zdravje ljudi in uporabo na njih. V diplomski nalogi smo z *in silico* metodami vrednotili endokrino in reprodukcijsko toksičnost izbranih cinamatov in njihovih metabolitov. Dobljene rezultate smo primerjali z že objavljenimi *in vitro* ter *in vivo* študijami. Izbrana cinamata sta 2-etilheksil metoksicinamat in izoamil metoksicinamat. Oba sta kot UV-filtra dovoljena tako na evropskem kot tudi ameriškem trgu. V večini se v kozmetičnih izdelkih uporablja 2-etilheksil metoksicinamat, izoamil metoksicinamat pa redkeje. Raziskovanja smo se lotili s pomočjo *in silico* metodologije, ki bi lahko v prihodnosti nadomestila *in vitro* ter *in vivo* raziskave in s tem zmanjšala poizkuse na živalih. Potencialne metabolite izbranih cinamatov in njihove metabolne poti smo napovedali s programom Meteor Nexus. Napovedane metabolite smo uporabili za nadaljnje raziskave. S programom Endocrine Disruptome ter VEGA (Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model) smo napovedali vezavno afiniteto cinamatov in njihovih metabolitov na 12 različnih jedrnih receptorjev. S programom Derek Nexus, VEGA (Developmental Toxicity model) in TEST pa smo napovedali različne vidike reprodukcijske toksičnosti izbranih cinamatov in njihovih metabolitov. Pri napovedi s programom Meteor Nexus so se napovedi za nekatere metabolite dobro ujemale z literaturnimi podatki. Večine napovedanih metabolitov v literaturi nismo zasledili, zasledili pa smo metabolite, ki jih program ni napovedal. Pri preučevanju endokrinih učinkov je program napovedal srednjo verjetnost vezave enega ali obeh cinamatov in vseh ali samo nekaterih metabolitov na tiroidni receptor, androgenski receptor v antagonistični konformaciji in glukokortikoidni receptor. Za estrogenski receptor je napovedal neaktivnost. Rezultati o napovedi reprodukcijske in razvojne toksičnosti so bili za oba cinamata neenotni, enotni pa le za metabolit 2-EH, kar potrjujejo tudi obstoječe študije. *In silico* metode so se izkazale za uporabne v začetnih fazah raziskovanja ali pa nam pomagajo pri obdelavi velike količine podatkov. V tem trenutku pa se na njih še ne moremo zanesti v takšni meri, da bi z njimi nadomestili *in vivo* in *in vitro* raziskave. V prihodnosti bo potrebna njihova nadgradnja in strokovna presoja o dobljenih rezultatih.

KLJUČNE BESEDE: cinamati, *in silico* metode, metabolizem, endokrini toksičnost, reprodukcijska toksičnost

ABSTRACT

People are becoming more and more aware of the harmful effects of UV radiation, which results in increased use of cosmetic products for sun protection that contain UV filters as active ingredients. These can also be found in other cosmetic products, which is why we are often exposed to them. As they are so widely used, they can also be found in groundwater, waste water and rivers. The question is whether these ingredients are safe for people or they pose a threat to human health. This thesis evaluates the endocrine and reproductive toxicity of chosen cinnamates and their metabolites through *in silico* methods. The results are then compared with already published *in vitro* and *in vivo* studies. The chosen cinnamates are 2-ethylhexyl methoxycinnamate and isoamyl methoxycinnamate. Both are allowed as UV filters on the European as well as the American market. Most cosmetic products contain 2-ethylhexyl methoxycinnamate while the isoamyl methoxycinnamate is used less often. The research was done with the use of *in silico* methods which could in the future replace *in vitro* and *in vivo* research and reduce animal testing. The potential metabolites of the chosen cinnamates and their metabolic pathways were predicted with the Meteor Nexus program. The predicted metabolites were used for additional research. With the Endocrine Disruptome program and VEGA (Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model) we have predicted the binding affinity of cinnamates and their metabolites to 12 different nuclear receptors. With the use of the Derek Nexus program, VEGA (Developmental Toxicity model) and TEST we have predicted the different aspects of the reproductive toxicity of the chosen cinnamates and their metabolites. Predictions made with the Meteor Nexus program matched the data in literature for some of the metabolites. Most of the predicted metabolites however, could not be found in literature while we have found certain metabolites in literature that the program did not predict. While studying the endocrine effects, the program predicted medium level of likelihood of binding one or both cinnamates and all or some metabolites to the thyroid receptor, androgen receptor in the antagonist conformation and glucocorticoid receptor. The software predicted inactivity for the estrogen receptor. The results of the prediction for reproductive and developmental toxicity were inconclusive for both cinnamates and conclusive only for the 2-EH metabolite, which has also been confirmed by the existing studies. *In silico* methods have proven themselves useful in early stages of research or while processing large quantities of data. However, at this time

they are not reliable enough to be able to replace *in vivo* and *in vitro* research. In the future they will require further upgrades and expert evaluation of the obtained results.

KEYWORDS: cinnamates, *in silico* methodology, metabolism, endocrine toxicity, reproductive toxicity

SEZNAM OKRAJŠAV

2-EHA	2-etilheksanojska kislina
2-EH	2-etilheksanol
ADH	alkohol-dehidrogenaza
ADME	absorpcija, distribucija, metabolizem in eliminacija
ADH	alkohol-dehidrogenaza
AR	androgenski receptor
BPA	bisfenol A
CYP450	citokrom P450
ECHA	European Chemicals Agency (Evropska agencija za kemikalije)
EH	epoksid hidrolaza
EHMC	2-etilheksil 4-metoksicinamat
ER α , β	estrogenski receptor alfa in beta
FDA	Food and Drug Administration (Uprava za hrano in zdravila)
GC	plinska kromatografija
GR	glukokortikoidni receptor
GST	glutation-S-transferaza
GT	Glutamiltransferaza
HELN	celična linija pridobljena iz HeLa celic
HELN ER α	HELN celice, ki izražajo ER α
HELN ER β	HELN celice, ki izražajo ER β
IAMC	izoamil metoksicinamat
LXR α , β	jedrni X receptor alfa in beta
MLV	večslojni liposom
MoS	Margin of Safety (varna meja)
MS	masna spektrometrija
NAT	N-acetiltransferaza
NIS	natrijev/jodidni transporter
proTEH	Protirotropin
PPAR α , β , γ	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor alfa, beta in gama
RXR α	retinoidni X receptor alfa
SCC	znanstveni odbor za kozmetologijo

SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
SPF	Sun Protection Factor (zaščitni faktor)
SUL	majhni enoslojni liposom
SULT	Sulfotransferaza
T3	Trijodtironin
T4	Tiroksin
TR α , β	tiroidni receptor alfa in beta
UGT	uridindifosfat-glukuronoziltransferaza
US EPA	Agencija za varstvo okolja Združenih držav Amerike (The United States Environmental Protection Agency)
UV	Ultravijolični
(Q)SAR	(Quantitative) Structure–Activity Relationship (kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem)

1. UVOD

1.1. UV-FILTRI V KOZMETIČNIH IZDELKIH

Pomembno kategorijo kozmetičnih izdelkov predstavljajo izdelki za zaščito pred soncem. Prekomerna izpostavljenost ultravijoličnim žarkom lahko povzroči škodljive učinke, kot so kožno vnetje ali opekline, fotostaranje, imunosupresija, mutacije in kožni rak. Naraščajoče število bolezni povezanih s soncem je spodbudilo razvoj sredstev za zaščito pred soncem, predvsem sončnih krem. Glavne sestavine izdelka za zaščito pred soncem so UV-filtri (1). Poleg izdelkov za zaščito pred soncem se danes UV-filtri dodaja v kozmetične izdelke za vsakodnevno uporabo, kot so dnevne kreme, izdelki za nego las in ličila (1). „UV-filtri“ so snovi, ki so izključno ali pretežno namenjene zaščiti kože pred določenimi ultravijoličnimi žarki z absorpcijo, odbijanjem ali razprševanjem ultravijoličnih žarkov (2). V EU se v kozmetičnih izdelkih lahko uporablja 28 UV-filtrov, ki so navedeni v Aneksu VI Uredbe o kozmetičnih izdelkih (ES) št. 1223/2009. Navedeni UV-filtri pa se morajo uporabljati v skladu s pogoji uporabe iz navedene priloge (3).

Kreme za sončenje lahko vsebujejo organske (kemične) in anorganske (fizikalne) filtre. Anorganski filtri mikrometrskih velikosti delujejo tako, da odbijajo ali sipajo UV-svetlobo skozi celotno UVA in UVB območje. Organski filtri so razvrščeni na UVA- in UVB-filtri in za razliko od anorganskih filtrov absorbirajo UV-svetlobo. UV-filtri se skoraj vedno uporabljajo v kremah v kombinacijah, saj samostojno ne zagotavljajo dovolj visokega SPF. (4). SPF so uvedli 1962 in je postal svetovni standard za določanje učinkovitosti izdelkov za zaščito pred soncem. Opredeljen je kot razmerje med odmerkom UVR, ki povzroči prvi zaznaven eritem na koži, zaščiteni pred soncem z izdelkom, in odmerkom UVR, ki povzroči primerljiv eritem na nezaščiteni koži (5). Nizko zaščito predstavljata vrednosti SPF 6 in 10, srednjo vrednosti SPF 15, 20 in 25, visoko SPF 30 in 50 in zelo visoko zaščito predstavlja vrednost SPF 50+. Izdelki s SPF 50 zadržijo 98% UV žarkov, noben izdelek pa ne nudi 100% zaščite, zato so lahko izdelki z višjim SPF zavajajoči in dajejo potrošniku lažen občutek varnosti. Pri testiranju SPF se na kožo nanese 2 mg/cm^2 izdelka (6).

1.2. CINAMATI KOT UV-FILTRI

Organski UV-filtri obsegajo različne skupine spojin, najbolj pogosti so *para*-aminobenzoati, salicilati, cinamati, benzofenoni, dibenzoil metani, derivati kafe in benzimidazoli (7). V okviru naše naloge smo se osredotočili na cinamate, natančneje na 2-etilheksil metoksicinamat (EHMC) in izoamil metoksicinamat (IAMC).

1.2.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

EHMC je eden izmed najbolj pogosto uporabljenih cinamatov in se uporablja v kozmetičnih izdelkih za sončenje, in sicer v obliki *trans*-izomera (7). Njegova molekulska formula je $C_{18}H_{26}O_3$, molekulska masa pa znaša 290,03 g/mol. Gre za brezbarvno ali rahlo rumeno tekočino brez vonja. Vrelišče ima med 185-195 °C pri 1 mbar in tališče pri -25 °C. Topen je v vodi, alkoholu, propilen glikol monomiristatu in različnih oljih. Prvotno so ga razvili leta 1950 kot organski filter, ki absorbira UVB-žarke. Uporabo v farmacevtskih in kozmetičnih formulacijah je odobrila FDA (8). Maksimalna koncentracija v kozmetičnih izdelkih v Evropski uniji ne sme presegati 10%, v ZDA pa ne sme presegati 7,5% (9).

IAMC je prav tako organski UVB filter (10). Njegova molekulska formula je $C_{15}H_{20}O_3$, molekulska masa pa znaša 248,322 g/mol (8). Točko vrelišča ima pri $362,8 \pm 17,0$ °C pri 760 mmHg (11). Maksimalna koncentracija v kozmetičnih izdelkih v Evropski uniji in ZDA ne sme presegati 10% (2, 12).

1.2.2. ABSORPCIJA IN PENETRACIJA

EHMC se lahko po aplikaciji na kožo sistemsko absorbira, saj so ga zasledili tako v plazmi kot tudi urinu. V eni izmed študij so zdravim prostovoljcem aplicirali kremo za sončenje po celem telesu (nanos 2 mg/cm^2), ki je vsebovala 10% (m/m) EHMC. Povprečna koncentracija v plazmi pri ženskah je znašala 7 ng/mL in pri moških 16 ng/mL. Pri ženskah je maksimalna koncentracijav urinu znašala 6 ng/mL in pri moških 4 ng/mL (13). V podobnem eksperimentu na prostovoljcih, ki so si nanašali kremo z EHMC 2 tedna, so izmerili maksimalno plazemsko koncentracijo 10 ng/mL pri ženskah in 20 ng/mL pri moških (14). Med leti 2004 in 2006 so analizirali 54 vzorcev materinega mleka in v 46 vzorcih so zaznali UV-filtre. Njihovo prisotnost so povezali z uporabo izdelkov, ki so vsebovali UV-filtre. Koncentracije UV-filtrov, med katerimi je bil tudi EHMC, so znašale od 2,10 do 134,95 ng/g lipida. EHMC se je nahajal v 42 pozitivnih vzorcih (15). IAMC izkazuje nizko perkutano absorpcijo pri ljudeh. V *in vivo* testu kožne penetracije na podganah se je po 24 urah absorbiralo okoli 11% nanešenega IAMC v v/o emulziji. V *in vitro* raziskavi na prašičji koži je preiskovana snov ostala pretežno na površni koži. 83-94% IAMC se je nahajalo v roženi plasti (16).

Na penetracijo UV-filtra lahko vpliva tudi vehikel. V *in vitro* testu so preizkušali transdermalno penetracijo EHMC v različnih disperzijah na koži prašičjega ušesa, in sicer so testirali EHMC v liposomih (lipo/EHMC), EHMC v β -ciklodekstranu (β -CD/EHMC),

EHMC, ki je vgrajen v obeh sistemih in prosti EHMC. Pri formulaciji z lipo/EHMC so zaznali visoko količino EHMC v povrhnjici ($18,04 \pm 1,17 \mu\text{g}$) in nizko v dermisu ($9,4 \pm 2,36 \mu\text{g}$), kar nakazuje, da liposomi komunicirajo s celicami rožene plasti in spodbujajo zadrževanje v tej plasti (17). Testirali so tudi eksperimentalne formulacije, ki so bile sestavljene iz običajne emulzije o/v, večslojnimi liposomi (MLV) in majhnimi enoslojnimi liposomi (SUL). Penetracijo so preverjali z metodo odstranjevanja trakov. Ugotovili so, da je kopičenje EHMC v koži bistveno večje v primeru uporabe MLV kot pa v SUL in emulziji o/v. Večje količine EHMC so sicer pri vseh testiranih formulacijah pridobili iz zgornjih plasti kože kot pa iz globljih (18).

1.2.3. IZPOSTAVLJENOST

UV-filtrom smo lahko izpostavljeni najpogosteje preko kozmetičnih izdelkov, plastičnih in polimernih produktov, ki vključujejo igrače, preko barve in raznih olj, preko embalaže za hrano, čistilnih sredstev, detergentov in podobno. Ob preučevanju izpostavljenosti cinamatom smo zasledili glavni način izpostavljenosti preko kozmetičnih izdelkov, saj je EHMC eden izmed najbolj pogosto uporabljenih UV-filtrov na tem področju. Izpostavljenosti preko ostalih virov nismo zasledili, saj se v embalaži za hrano, plastičnih produktih in barvah nahajajo predvsem drugi UV-filtri. Prav tako tudi v ostalih virih nismo zasledili uporabe IAMC. Ta je v primerjavi z EHMC redkeje uporabljen kot UV-filter v kozmetičnih izdelkih. Nahaja se v 10 od 291 produktov (9 sončnih krem in 1 krema za obraz), ki jih je zajela študija (16).

Pričakovano je, da smo v večini EHMC izpostavljeni preko kozmetičnih izdelkov, vendar so EHMC zaznali tudi v pitni vodi. Več študij je pokazalo prisotnost UV-filtrov v okolju in v pitni vodi tako v Evropi kot tudi ZDA. UV-filtri lahko prihajajo v vodno okolje preko sončne kreme, nanešene na kožo, ki se izpira med plavanjem v vodi, lahko pa tudi preko odplak in uporabe kozmetike, ki vključuje sončne kreme, preko prhanja in pranja perila, prav tako lahko prehajajo UV-filtri v vodno okolje preko industrijskih odpadnih vod (16, 19). V eni raziskavi so preučevali prisotnost petih različnih UV-filtrov, med drugim tudi EHMC, v različnih vzorcih čiste vode v Barceloni. V ustekleničeni mineralni vodi in v vodi iz pipe, očiščeni s smolo z ionskimi izmenjevalci, niso zaznali nobenega od preiskovanih UV-filtrov. Po drugi strani pa je voda iz pipe vsebovala 870 ng/l EHMC. Edini UV-filter, ki so ga zaznali v podtalnici, je bil EHMC in sicer v koncentraciji 770 ng/L . Koncentracije vseh petih UV-filtrov so bile odvisne od lokacije. Pri vseh so bile najvišje izmerjene koncentracije pridobljene iz reke Llobregat, ki je najbolj obremenjena

tako urbano kot tudi industrijsko. Ti rezultati so pokazali, da je v tem primeru primarni vir UV-filtrov v pitni vodi posledica posrednega vnosa iz odpadne vode in prav tako industrijskih odpadkov (20). Prav tako so preiskovali prisotnost UV-filtrov v dveh švicarskih jezerih, in sicer Zurich in Hüttnersee, med katerim Zurich predstavlja pomemben vir pitne vode. V jezeru Zurich so namerili 2-26 ng/L in v jezeru Hüttnersee 2-19 ng/L EHMC. Koncentracije UV-filtrov so bile različne glede na letni čas. Najvišje koncentracije so razumljivo izmerili v času poletja. Rezultati so pokazali, da je v tem primeru vnos preko odpadnih vod manj pomemben kot direkten vnos, vsaj v času poletja, ko se jezera uporabljajo za kopanje (19).

1.2.4. TOKSIČNI UČINKI

Koža načeloma dobro prenaša EHMC, saj je najpogostejši stranski učinek po topikalni aplikaciji le minimalna iritacija kože, v najslabšem primeru pa alergijski dermatitis. Vendar pa je kljub temu izpostavljenost človeških in mišjih celic EHMC zmanjšala njihovo stopnjo preživetja, kar kaže na to, da je EHMC toksičen za sesalske celice. Poročali so tudi o nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti v epidermisu kot posledica izpostavljenosti EHMC, kar lahko vodi do oksidativnih poškodb. Čeprav je EHMC spojina, ki ščiti pred UV-žarki, je prav tako lahko predmet fotodegradacije, kar lahko vodi do nastanka nevarnih fotoproduktov. Ob izpostavitvi sončni svetlobi se lahko *trans*-EHMC pretvori v *cis* izomer. Oba izomera lahko tvorita razgradnje produkte kot so 4-metoksibenzaldehid in 2-etilheksanol, lahko pa tvorita tudi različne ciklodimere kot sta gama-truksinat in alfa-truksilat. *Cis*- in *trans*-EHMC, 4- metoksibenzaldehid in oba ciklodimera so toksični za celice, saj so v *in vitro* raziskavi zmanjšali celično živost tudi do 69%, odvisno od koncentracije. Po drugi strani pa 2-etilheksanol ni pokazal toksičnih učinkov, kar dokazuje, da imajo različni fotoprodukti različne učinke na celico (21). EHMC je na seznamu potencialnih motilcev endokrinega sistema (European Commission priority list of potential endocrine disruptors) in je tudi na seznamu SIN (Substitute it now). Leta 2012 je Danski center za endokrine motilce zbral in ocenil javno dostopne podatke o endokrinih učinkih snovi. Na podlagi te ocene se lahko EHMC smatra kot potencialni motilec endokrinega sistema, ki je lahko zaskrbljujoč tako za zdravje ljudi kot tudi za okolje (22). V skladu z uredbo REACH je snov na seznamu Tekoči akcijski načrt Skupnosti (The Community Rolling Action Plan (CoRAP)), z začetno skrbjo za učinke na endokrini sistem. To vodi do zahteve po večji količini podatkov, da se pojasni in opredeli ali je snov motilec endokrinega sistema v skladu z uredbo REACH ali ne. IAMC se ne nahaja na seznamu

potencialnih motilcev endokrinega sistema, prav tako ga ni na seznamu SIN. Leta 2013 je Danski center za endokrine motilce zbral podatke o IAMC in prišel do ugotovitve, da ni na voljo dovolj podatkov, da bi zaključili ali je snov motilec endokrinega sistema ali ne. V skladu z uredbo REACH se IAMC nahaja na seznamu CoRAP zaradi strukturne podobnosti z EHMC (16, 23).

1.3. ENDOKRINI SISTEM

Endokrini sistem je sestavljen iz številnih žlez, ki izločajo hormone. Njegova naloga je uravnavanje notranjega okolja telesa. Hormoni stimulirajo biološke reakcije v naših celicah (24). Vsak hormon ima določeno funkcijo in se sprosti iz določene endokrine žleze. Sproščeni hormon nato potuje po krvi, da pride do tarčne celice, ki jo prepoznajo preko specifičnih receptorjev, na katere se vežejo. Receptorji nato izzovejo vrsto kemičnih reakcij znotraj celice (npr. povečano ali zmanjšano izražanje genov). Ko je naloga opravljena, se mora proizvodnja hormonov ustrezno zmanjšati, da se prepreči njihovo nadaljnje delovanje na celice. Na ta način hormoni nadzorujejo različne telesne funkcije, kot so dihanje, presnova, reprodukcija, senzorično dojetanje, premikanje, spolni razvoj in rast. Hormoni delujejo med seboj usklajeno, s čimer dosežejo ravnotežje v telesu, ki ga imenujemo homeostaza (25, 26). Glavne žleze, ki sestavljajo endokrini sistem, so hipotalamus, hipofiza, česarika, ščitnica, obščitnica, nadledvična žleza, trebušna slinavka, timus, pri moških testisi in pri ženskah jajčniki. Obstajajo tudi druga tkiva v telesu, ki sproščajo hormone, vendar to ni njihova glavna naloga. Mednje sodijo maščobno tkivo, ledvica in srce (27).

1.3.1. RECEPTORJI

V splošnem lahko receptorje delimo na 5 glavnih skupin. Poleg jedrnih receptorjev poznamo še štiri skupine integralnih membranskih receptorjev, in sicer: encimsko vezani receptorji, citokinski receptorji, z G-proteini vezani receptorji in ionski kanalčki. Jedrni receptorji so transkripcijski faktorji, ki jih regulirajo ligandi. Ker se nahajajo znotraj celice, morajo hormoni po svoji naravi biti lipofilni, da lahko brez težav prehajajo celične membrane (28). Spodaj je navedenih 12 jedrnih receptorjev, na katere smo se osredotočili pri analizi:

- **Androgenski receptor (AR):** je primarni receptor za testosteron in dihidrotestosteron. Njegova glavna naloga je razvoj in vzdrževanje moškega spolnega fenotipa.

- **Estrogenski receptor alfa (ER α):** je receptor za 17 β -estradiol. Nahaja se v endometriju, rakavi celici dojke, jajčnih celicah in hipotalamusu.
- **Estrogenski receptor beta (ER β):** je receptor za 17 β -estradiol, fitoestrogeni, 5 α -androstan-3 β in 17 β -diol. Nahaja se v ledvicah, možganih, kosteh, srcu, pljučih, črevesni sluznici, prostati in endotelijskih celicah.
- **Glukokortikoidni receptor (GR):** je receptor za kortizol. Spada med 3-ketosteroidne receptorje. Uravnava razvoj, presnovo in imunski odziv.
- **Jetrni X receptor alfa in beta (LXR α in LXR β):** sta receptorja za oksisterole. So pomembni regulatorji homeostaze holesterola, maščobnih kislin in glukoze.
- **S peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor alfa (PPAR α):** je receptor za nenasičene maščobne kisline in eikozanoide. Njegova glavna funkcija je regulacija metabolizma, razvoja, celične diferenciacije in karcinogeneze. Uravnava tudi metabolizem lipidov v jetrih.
- **S peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor beta (PPAR β):** sodeluje pri razvoju raka, debelosti, diabetesa in ateroskleroze.
- **S peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor gama (PPAR γ):** je receptor za prostaglandin J2, lizofosfatidno kislino in polinenasičene maščobne kisline. Sodeluje pri razvoju raka, debelosti, diabetesa in ateroskleroze. Njegova glavna vloga je regulacija metabolizma glukoze in shranjevanje maščobnih kislin.
- **Retinoidni X receptor alfa (RXR α):** je receptor za 9-*cis*-retinojsko kislino in dokozaheksaenojsko kislino. Tvori heterodimere s peroksisomskim proliferatorjem aktiviranimi receptorji, receptorji vitamina D in drugimi. Na ta način RXR α regulira transkripcijo tarčnega gena njegovega partnerja.
- **Tiroidni receptor alfa in beta (TR α in TR β):** njun naravni ligand je trijodotironin. Regulirata metabolizem, srčni utrip in igrata ključno vlogo pri razvoju (29).

1.3.2. MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA

US EPA je opredelila motilce endokrinega sistema kot »eksogene snovi, ki motijo sintezo, izločanje, transport, vezavo, aktivacijo ali odstranitev hormonov prisotnih v telesu, ki so odgovorni za vzdrževanje homeostaze, razvoja, razmnoževanja in vedenja.« Vendar pa okolje organizma ni sestavljeno samo iz zunanjih dejavnikov, ampak tudi iz notranjih. Na primer, če se človeku lasten endogeni hormonski sistem aktivira ali inaktivira ob nepravem času lahko to moti endokrini sistem. Drugi primer je, da lahko okolje, v katerem se nahaja

sesalski plod, vpliva na endokrine procese. Tako je potrebno okolje opredeliti tako, da ne vključuje samo eksogenih snovi kot navaja US EPA, temveč tudi notranje izločke, kot so neprimerni endogeni in materini hormoni (30).

Motilce endokrinega sistema najdemo v okolju, zraku, vodi, hrani, izdelkih za osebno nego, elektroniki, kmetijstvu, itd. Povezujejo jih z zdravstvenimi težavami, kot so neplodnost, nenormalno delujoči spolni organi, zgodnja puberteta, moteno delovanje živčnega sistema, moteno delovanje imunskega sistema, težave z dihanjem, debelost, moteno delovanje srca, motena rast itd. S takšnimi snovmi lahko pridemo v stik kjerkoli. Lahko jih vdihnemo, zaužijemo, lahko se absorbirajo preko kože, se prenesejo iz matere na plod preko posteljice ali se prenesejo iz matere na otroka z dojenjem (31).

1.3.3. MEHANIZMI DELOVANJA MOTILCEV ENDOKRINEGA SISTEMA
Endogeni hormoni delujejo preko več mehanizmov. Klasičen mehanizem vključuje vezavo hormona na receptor. Interakcija hormon-receptor z ostalimi kofaktorji v celici aktivira ali inaktivira transkripcijo tarčnega gena. Enak ligand lahko sicer aktivira različne tarčne receptorje in komunicira s popolnoma drugačnimi kofaktorji, odvisno od fenotipa tarčne celice. Poleg tega hormonsko signaliziranje vključuje tudi sintezo, razgradnjo ali inaktivacijo hormonov s specifičnimi encimi, ki so prav tako lahko tarča motilcev endokrinega sistema. Če se motilec endokrinega sistema ne metabolizira dovolj hitro, lahko ostane biološko dostopen dlje časa, saj je večina lipofilnih in se zato lahko skladiščijo v maščobah. Endogeni hormoni se vežejo tudi na proteine v krvi in tako se zmanjša njihova biološka aktivnost (njihova sposobnost delovanja na receptorjih). Motilci endokrinega sistema se ne smejo vezati na iste vezavne proteine, saj bi s tem povečali biološko aktivnost hormonov. Kadar se sprašujemo o potencialnem mehanizmu delovanja motilcev endokrinega sistema, je potrebno upoštevati vse potencialne tarče in poti. Poleg tega smo redko izpostavljeni le eni sami snovi, ki bi motila endokrini sistem. Običajno gre za kompleksno zmes več snovi. Rezultati osnovnih znanstvenih študij so pokazali, da lahko izpostavljenost motilcem endokrinega sistema v zelo majhnih odmerkih, dolgoročno vpliva na naše zdravje (30).

1.4. REPRODUKCIJSKA TOKSIČNOST
Reprodukcijska toksičnost predstavlja poseben del toksikologije, ki vključuje kakršnekoli učinke kemikalij in aktivnih snovi na reprodukcijo sesalcev (32). Je nevarnost, ki je povezana z nekaterimi kemičnimi snovmi, ki na nek način motijo normalno reprodukcijo

in vključuje škodljive učinke na spolno delovanje ter na plodnost pri odraslih moških in ženskah kot tudi na razvojno toksičnost pri potomcih. Razvojna toksičnost predstavlja škodljive učinke, povzročene med nosečnostjo ali kot posledica izpostavljenosti staršev, ki se kažejo v katerem koli življenjskem obdobju organizma. Dobro znana skupina snovi, ki je toksična za razvoj, so teratogene snovi, ki povzročajo okvare ob rojstvu s toksičnimi učinki na zarodek ali plod. Prenatalni test se uporablja za oceno potencialne razvojne toksičnosti in se običajno izvaja na podganah ali zajcih ženskega spola. Preizkušano snov se lahko daje na različne načine, običajno odvisno od poti izpostavljenosti pri človeku. Breje živali se nato ubije, plod pa se preučuje za zunanje, visceralne in skeletne spremembe. Dvogeneracijska študija pa vključuje neprekinjeno doziranje starševske generacije in njenih potomcev s preizkušano snovjo za dve celotni generaciji do prekinitve doziranja mladičev F2 pri treh tednih starosti. Ocenjuje se končne točke, kot so plodnost, rast, preživetje potomcev, doseganje razvojnih točk in morebitne posledice zaradi endokrinih učinkov (33).

Neuspešnost zanositve in negativni izidi nosečnosti so pogosto posledica dejavnikov, kot so podhranjenost, hipertermija. Poleg tega lahko izpostavljenost biotoksinom, kemičnim strupom, sevanju ali številnim drugim faktorjem vodi do neplodnosti, spontanega splava ali prirojenih napak. En sam faktor ali njihova kombinacija imajo lahko škodljive učinke na moško ali žensko reprodukcijsko delovanje, na materino posteljico ali delovanje po zanositvi. Reprodukcijska toksičnost je zelo zapletena, in to zaradi neprestanih sprememb, ki se dogajajo v materini posteljici in plodu. Na splošno je znano, da so organizmi, ki se še razvijajo, zaradi omejenih obrambnih mehanizmov, bolj občutljivi na toksične učinke snovi kot odrasli. Prepričljivi so dokazi, da lahko izpostavljanje ploda toksičnim snovem škoduje razvoju ploda ali pride do kasnejšega razvoja bolezni kot so metabolični sindrom, diabetes, Alzheimerjeva bolezen ali Parkinsonova bolezen (34).

1.5. *IN SILICO* METODE

Kot alternativne metode tradicionalnim *in vivo* toksikološkim testiranjem so se za izboljšanje našega razumevanja tveganja toksičnosti in nevarnosti snovi, pomembnih za javno zdravje in zdravje živali, ob že prav tako uveljavljenih *in vitro* metodah pojavile tudi inovativne in visoko učinkovite *in silico* metode. Slednje vključujejo računalniško napovedovanje toksičnosti, modeliranje, podatkovno rudarjenje in orodja za presejanje. Z *in silico* metodami lahko zmanjšamo obseg eksperimentov na živalih, izvajamo analize z

nizkimi stroški in so splošno priznane kot orodja za odkrivanje novih informacij, ki lahko služijo kot pomoč pri oceni tveganja (35). Prednost *in silico* metod je, da jih lahko uporabimo za hitre napovedi za veliko skupino spojin, poleg tega jih lahko uporabimo za napovedi za spojine, ki še niso bile sintetizirane (32). Sprejete so bile številne pobude za začetek uporabe *in silico* metod kot alternativnih metod za toksikološke znanosti (35).

1.5.1. (Q)SAR MODELI IN EKSPERTNI SISTEM

(Q)SAR in ekspertni sistemi sta dve glavni neodvisni *in silico* metodi za napovedovanje toksičnosti. QSAR je kvantitativni odnos med kemijsko strukturo in njenim biološkim/toksikološkim učinkom z uporabo kemijskih deskriptorjev, pridobljenih iz molekulske strukture, SAR pa pomeni kvalitativni odnos med določeno kemijsko strukturo in njenim biološkim/toksikološkim učinkom. Pri SAR je pojav specifičnih podstruktur odgovoren in potreben za biološki/toksikološki učinek. Torej (Q)SAR študije temeljijo na teoretičnih predpostavkah in ne zajemajo izvajanja poizkusov.

Ekspertni sistemi so definirani kot katerikoli formalni sistemi, ki napovedujejo toksičnost spojin. Vsi ekspertni sistemi za napovedovanje toksičnosti temeljijo na eksperimentalnih podatkih. Ekspertne sisteme razdelimo na dva podrazreda. Prvi so osnovani na znanju ali pravilih, ki nadalje temeljijo na osnovi strukturnih značilnosti, ki so povezane z določeno toksičnostjo. Tipičen primer takšnega sistema je DEREK. Drugi je računalniško ali statistično osnovan ekspertni sistem, za katerega je potreben obsežen niz podatkov spojin z znano toksičnostjo, ki izhaja iz strukturnih značilnosti, ki so močno povezane z določeno toksičnostjo. Tipičen primer takšnega sistema je MultiCASE (32).

1.5.2. IN SILICO NAPOVEDOVANJE METABOLIZMA

Toksikokinetika poda informacije o penetraciji spojine in njeni usodi v telesu. Vključuje možnost pojava metabolitov, daje torej podatke o absorpciji, porazdelitvi, presnovi in izločanju spojine (ADME) (36). Metabolizem je proces, pri katerem telo pretvori ksenobiotike v manj toksično, bolj polarno obliko, ki jo je mogoče zlahka izločiti. Včasih pa se lahko zgodi, da so metaboliti celo bolj toksični od izhodne spojine. Prva faza metabolizma, ki se pretežno katalizira z encimsko družino citokromov P450 (CYP), vključuje reakcije oksidacije dušikovih ali žveplovih funkcionalnih skupin, alifatsko ali aromatsko hidrosilacijo, deaminacijo ali dealkilacijo. Reakcije druge faze zajemajo konjugacije oz. pripenjanje polarnih molekul (npr. glukuronska kislina, sulfat) na substrat,

kar omogoči še lažje izločanje nastalega polarnega metabolita. Encime metabolizma najdemo v vseh tkivih telesa, vendar prevladujejo v jetrih, ledvicah in črevesju (37).

Metabolizem je najbolj raziskan med procesi ADME, saj lahko igra ključno vlogo pri toksičnosti spojine. Na tem področju so bili sprejeti številni pristopi modeliranja, ki vključujejo ekspertne sisteme, podatkovno rudarjenje, QSAR modele in protein-ligand povezovanje. Pogosto je poudarek na metabolizmu 1. faze. Analizirajo selektivnost za nekatere CYP izomere, nastanek metabolitov, relativne količine nastajanja metabolitov in mesta transformacije v molekuli. V primeru metabolizma se je pri modeliranju mogoče zanesti na strukturo encimov vključenih pri biotransformaciji, zato je pristop, ki temelji na strukturi, eden najbolj obetavnih za analizo metabolizma (38). Na voljo je širok nabor *in silico* modelov za napovedovanje. Modeli se gibljejo od začetnega rešetanja z visoko zmogljivostjo do podrobne tridimenzionalne analize vezave encimov, ki zahtevajo visoko raven računske moči. Izbira najprimernejšega modela je odvisna od narave poizvedbe (37). Lahko uporabimo modele, ki napovedujejo biotransformacijske poti, mesta metabolizma in odgovorne encime (npr.: ACD/Percepta Platform, ADMET Predictor, ChemTunes BioPath, CypScore, FAsT METaboliser, IMPACTS, MetaPred web server, MetaPrint2D, MetaSite, MEXAlert, SMARTCyp, StarDrop P450, VirtualToxLab, WhichCyp), modele, ki napovedujejo kinetiko (npr.: ADMET Predictor), modele, ki napovedujejo potencialne encimske inhibitorje (npr.: Biovia Pipeline pilot ADME-Tox, oCHEM) ali modele, ki napovedujejo nastale metabolite (npr.: ChemTunes/ToxGPS, META Ultra, Metabolexpert, MetaSite, Meteor Nexus, MetaPrint 2D-react, OECD QSAR Application Toolbox, TIMES) (39).

1.5.3. IN SILICO NAPOVEDOVANJE ENDOKRINIH UČINKOV

Motilci endokrinega sistema lahko vplivajo na različne proteine: na jedrne steroidne hormonske receptorje, kot so estrogenski, androgenski, glukokortikoidni in mineralokortikoidni receptorji ali na encime, ki sodelujejo pri sintezi in metabolizmu steroidnega hormona. Številne snovi so znane kot motilci endokrinega sistema, vendar je pri večini njihov mehanizem delovanja še vedno neznan (40). Zaradi raznolikosti in zapletenosti mehanizmov endokrinih motenj in omejenih podatkov, ki so na voljo za *in silico* modeliranje, se je večina raziskav osredotočila na motilce endokrinega sistema, ki delujejo preko estrogenskih in androgenskih receptorjev. Izbiramo lahko med več komercialno in prosto dostopnimi orodji za oceno potencialne toksičnosti spojin. Primera javno dostopnih QSAR orodij sta ADMET Predictor™ in MetaDrug™, primera

komercialno dostopnih QSAR orodij pa OCHEM in VEGA, in pred kratkim so razvili tudi odprto kodno orodja Endocrine Disruptome (41).

1.5.4. *IN SILICO* NAPOVEDOVANJE REPRODUKCIJSKE TOKSIČNOSTI

Ocena potencialne razvojne in reprodukcijske toksičnosti snovi je eden od pomembnih varnostnih vidikov, ki so ga uvedle mednarodne regulatorne agencije USEPA in ECHA. Uporaba *in silico* modelov za napovedovanje reprodukcijske toksičnosti je omejena, saj modeliranje takšnih zapletenih modelov predstavlja velik izziv zaradi kompleksnosti sistemov in procesov, ki sodelujejo pri razvoju in reprodukciji. Poleg tega reprodukcijska toksičnost ni končna točka in zajema več različnih motenj, vključno z motnjo rasti ploda, preživetje ploda in toksičnosti za visceralne organe. Še en ključni izziv za izgradnjo takšnih modelov predstavlja pomanjkanje empiričnih podatkov o razvojni in reprodukcijski toksičnosti. *In silico* pristop za napovedovanje reprodukcijske toksičnosti temelji na (Q)SAR modelih. Primer *in silico* programov so P&G, SARpy, CAESAR, CASE ultra tox, DEREK nexus, Leadscope model applier, itd. (42).

2. NAČRT ZA DELO

V diplomskem delu bomo uporabili različne *in silico* metode za napoved metabolizma, endokrine in reproduktivne toksičnosti EHMC in IAMC.

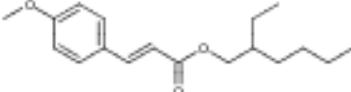
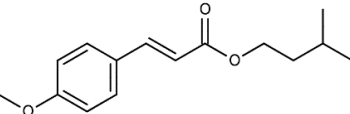
- a) Z uporabo programa **Meteor Nexus** bomo napovedali metabolizem izbranih cinamatov, nato pa bomo napovedane metabolite in osnovna cinamata uporabili za nadaljnje raziskave.
- b) Z uporabo **Endocrine Disruptome** in **VEGA** bomo napovedali vezavno afiniteto cinamatov in njihovih metabolitov na 12 različnih jedrnih receptorjev.
- c) Z uporabo programov **Derek Nexus**, **VEGA** in **TEST** bomo napovedali različne vidike reprodukcijske toksičnosti cinamatov in njihovih metabolitov.
- d) Dobljene rezultate bomo primerjali z že znanimi podatki iz literature (*in vitro*, *in vivo*) in ocenili napovedno moč programov.

3. METODE IN MATERIALI

3.1. IZBRANI CINAMATI

V diplomskem delu smo se pri oceni metabolizma, endokrine in reproduktivne toksičnosti osredotočili na izbrane cinamate, natančneje na EHMC in IAMC, ki se uporabljata v kozmetičnih izdelkih kot UV-filtra. Njuna najvišja dovoljena koncentracija znaša v izdelkih, pripravljenih za uporabo v EU, 10% (2). V preglednici so prikazane njihove strukturne formule, CAS številke in SMILES kode.

Preglednica I: Strukturne formule, CAS številke in SMILES kode 2-etilheksil metoksicinamata in izoamil metoksicinamata.

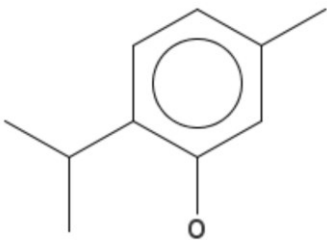
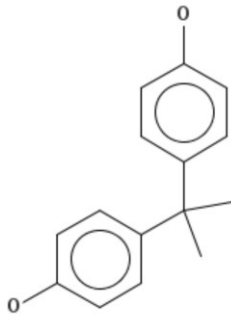
2-ETILHEKSIL METOKSICINAMAT	IZOAMIL METOKSICINAMAT
	
INN: 2-etilheksil 4-metoksicinmat/oktinoksat CAS: 5466-77-3 SMILES: <chem>O(CC(CC)CCCC)C(=O)C=CC=1C=CC(OC)=CC=1</chem>	INN: izopentil-4-metoksicinamat/amiloksat CAS: 71617-10-2 SMILES: <chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(OCCC(C)C)=O)OC</chem>

3.2. NEGATIVNA IN POZITIVNA KONTROLA

Za negativno kontrolo smo izbrali timol z molekulsko formulo $C_{10}H_{14}O$ in molekulsko maso 150,221 g/mol. Gre za fenol pridobljen iz timijanovega olja ali drugih hlapnih olj. Najdemo ga v timijanu, origanu, lupini mandarine, itd. (43, 44). Uporablja se kot pesticid, v parfumeriji, mikroskopiji, kot konzervans, antioksidant, za aromatiziranje ali kot laboratorijski reagent. Nahaja se tudi v zdravilih brez recepta, ki imajo protiglivično in protibakterijsko delovanje (45). Timol je splošno priznan kot varna snov, torej ima status »Generally Recognized as Safe« (GRAS). US EPA je ugotovila, da ima timol minimalno potencialno toksičnost in predstavlja minimalno tveganje. Odločitev temelji na rezultatih laboratorijskih študij na živalih, ki kažejo na nizko toksičnost timola, prisotnega v normalni prehrani ljudi in drugih potrošniških izdelkih. Tudi daljša uporaba/uživanje timola ni pokazala znanih škodljivih učinkov na zdravje ljudi in okolje (46). Izbrali smo ga

kot negativno kontrolo, saj obstaja določena strukturna podobnost s cinamati, zaradi prisotnosti aromatskega obroča. Kot pozitivno kontrolo smo izbrali bisfenol A (BPA), ki ima v svoji strukturi dve fenolni funkcionalni skupini, z molekulsko formulo $C_{15}H_{16}O_2$ in molekulska masa 228,291 g/mol, in ki se uporablja predvsem v embalažnih materialih za živila. Gre za znan motilec endokrinega sistema, ki vpliva tudi na reprodukcijsko toksičnost. *In vitro* in *in vivo* študije so pokazale toksične učinke BPA na endokrini sistem, saj tvori interakcije z različnimi jedrnimi receptorji, predvsem ER, AR in TR (47, 48). V preglednici sta prikazani strukturni formuli, CAS številki in SMILES kodi pozitivne in negativne kontrole.

Preglednica II: Strukturni formuli, CAS številki in SMILES kodi za timol in bisfenol A.

TIMOL	BISFENOL A
 <p data-bbox="225 1267 379 1296">CAS: 89-83-8</p> <p data-bbox="225 1314 660 1344">SMILES: <chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O</chem></p>	 <p data-bbox="815 1227 963 1256">CAS: 80-05-7</p> <p data-bbox="815 1274 916 1303">SMILES:</p> <p data-bbox="815 1321 1337 1350"><chem>CC(C)(C1=CC=C(C=C1)O)C2=CC=C(C=C2)O</chem></p>

3.3. UPORABLJENI RAČUNALNIŠKI PROGRAMI IN SPECIFIKACIJA NASTAVITEV

3.3.1. PROGRAM ZA NAPOVEDOVANJE METABOLIZMA

Uporabljen program: Meteor Nexus, Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK.

Različica: Meteor Nexus: 2.1.0, Nexus: 2.0.0.

Dostop: Računalnik na FFA.

Nastavitve: Species: *Mammals*; Processing direction: *Breadth first*; Phase constraints: *Don't grow from phase II products*; Maximum depth: 2; Max. metabolites: 1000; Minimum likelihood: *PLAUSIBLE*; Apply relative reasoning: *no*; Cut off: 2.

Za napoved metabolizma izbranih cinamatov smo uporabili program Meteor Nexus, razvit v podjetju Lhasa Limited. Gre za ekspertni sistem, ki temelji na vnesenih podatkih. Omogoča pridobivanje informacij o metabolizmu tudi kadar je na voljo le malo ali celo nič eksperimentalnih podatkov. Program napoveduje biotransformacije I. in II. faze metabolizma. Vsak metabolit pridobljen v prvem koraku se uporabi za napoved nadaljnega metabolizma. Rezultati so prikazani z grafičnim drevesom skupaj s podpornimi podatki, kot so razlogi v ozadju vsake napovedi, podrobnosti o biotransformaciji in metabolni poti (49, 50).

Program sprva preveri ali struktura vsebuje podstrukture, ki so dovzetne za določene biotransformacijske reakcije, ki jih vsebuje njegova podatkovna baza. Nato oceni verjetnost, da bo določena reakcija potekla (stopnje: probable-verjetno, plausible-možno, equivocal-dvoumno, doubted-dvomljivo in improbable-malo verjetno). Verjetnost je odvisna tudi od logP spojine oz. metabolita. Na koncu program med pretvorbami, ki potekajo sočasno odstrani tiste, ki potečejo z manjšo verjetnostjo (51).

3.3.2. PROGRAMA ZA NAPOVEDOVANJE ENDOKRINE TOKSIČNOSTI **Uporabljen program:** Endocrine Disruptome

Dostop: <http://endocrinedisruptome.ki.si/prediction.html>

Najbolj razširjen način delovanja motilcev endokrinega sistema je neposredna vezava na vsaj en jedrni receptor in posledična modulacija aktivnosti. Večina programov za napovedovanje vezavne afinitete predvideva vezavo več ligandov na eno samo tarčo. Endocrine Disruptome pa predvidi vezavo enega liganda na več tarč. Endocrine Disruptome je brezplačno dostopen program za izračun afinitete do 12 humanimi jedrnimi receptorji (AR, ER α , ER β , GR, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ , RXR α , TR α in TR β). Deluje na platformi Docking interface for Target Systems (DoTS), ki deluje preko AutoDock Vina (41, 52). V grafični vmesnik narišemo strukturo ali pa vpišemo SMILES kodo. SMILES je vrstična oznaka za predstavitev molekul in reakcij. Gre za jezik z enostavnim besediščem (simboli atomov in vezi) in le nekaj slovničnimi pravili. Nato se izriše 2D struktura, izračunane molekulske lastnosti (molekulska masa, logP, donorji in akceptorji vodikovih vezi) in opozorila PAINS. Rezultati so barvno kodirani in razporejeni v 4 razrede. Rdeča barva ustreza veliki verjetnosti vezave, oranžna in rumena barva predstavljata srednjo verjetnost vezave, zelena barva pa ustreza majhni verjetnosti vezave (53, 54, 55). Program je validiran za majhne molekule z molekulsko maso, nižjo od 800.

Izračuni molekul z večjo molekulsko maso so lahko omejeni. Poleg tega podajanje rezultatov velikih molekul, traja dlje časa ali pa rezultatov sploh ne poda (56).

Uporabljen program: VEGA

Različica: 1.1.4

Dostop: Program je na voljo za prenos na spletnem naslovu: <https://www.vegahub.eu/download/>.

Nastavitve: Model: Estrogen Receptor Relative Binding Affinity Model 1.0.1.

Program VEGA uporabljamo za vrednotenje številnih lastnosti kemičnih snovi in je idealen za serijsko obdelavo velike količine podatkov. Lahko ga namestimo in uporabljamo na katerem koli operacijskem sistemu, ki podpira tehnologijo JAVA. Prosto je dostopen na spletnem naslovu, vendar je potrebna brezplačna registracija. VEGA ponuja širok nabor informacij. Če se upošteva vse dokaze, ki jih program ponuja, lahko uporabnik ugotovi, kako verjetna je napoved in kakšna je stopnja negotovosti, povezana z napovedjo. Gre za zapleteno platformo, ki vključuje številne QSAR modele in neodvisna orodja, ki pomagajo uporabniku pri oceni rezultata preko indeksa domene uporabnosti («Applicability Domain Index»). QSAR modeli izhajajo iz CAESAR, T.E.S.T., SARpy, EPISuite, Toxtree in drugih orodij. Pogosto dodajajo nove modele, o katerih so registrirani uporabniki sproti obveščeni (57).

VEGA lahko sočasno procesira tisoče molekul. Če želimo, lahko v program vnesemo SMILES kode ali pa v formatu SDF. Vključuje modele za številne končne točke, ki so organizirani v štiri razrede: toksičnost (npr. mutagenost, kancerogenost), ekotoksičnost (npr. toksičnost čebel, toksičnost rib), z okoljem povezane lastnosti (npr. faktor biokoncentracije) in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. logP). Rezultati so podani v dveh oblikah. Lahko se podajo v PDF obliki, ki je podrobna in vključuje vse informacije, podobne strukture, opozorila o strukturi, itd. CSV oblika pa je bolj primerna, ko imamo veliko količino kemikalij, saj je bolj preprosta. Na prvi strani poda povzetek napovedi, kjer imamo pregled ocene izbranega modela za tarčno molekulo. Najdemo lahko informacije o napovedi, zanesljivosti, razlogih, itd. VEGA primerja tarčne molekule z notranjo bazo podatkov in šestimi najbolj podobnimi molekulami, ki imajo določene eksperimentalne vrednosti. Za vsako podobno molekulo VEGA zagotovi eksperimentalno vrednost,

napoved, prikaz 2D strukture, strukturna opozorila v povezavi s tarčno molekulo, itd. V odvisnosti od modela lahko VEGA zagotovi tudi različne razloge za podano napoved (57).

Med modeli za določanje toksičnosti se nahaja model Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model, ki smo ga uporabili tudi sami. Ta poda napoved afinitete vezave na ER. S številom rumeno obarvanih zvezdic program poda stopnjo zanesljivosti napovedi. Tri obarvane zvezdice pomenijo, da se spojina nahaja znotraj območja uporabnosti modela (•••), torej je napoved zanesljiva; dve obarvani zvezdici pomenita, da bi se spojina lahko nahajala zunaj območja uporabnosti modela in tako obstajajo dvomi o zanesljivosti napovedi (••), ena obarvana zvezdica pa pomeni, da se spojina nahaja izven območja uporabnosti modela in tako napoved ni zanesljiva (•). Rdeče ali zeleno obarvan krogec predstavlja napoved toksičnosti. Spojina z zeleno obarvanim krogcem ni aktivna oziroma je aktivna, če je krogec obarvan rdeče.

3.3.3. PROGRAMI ZA NAPOVED REPRODUKCIJSKE TOKSIČNOSTI

Uporabljen program: Derek Nexus, Lhasa Limited, Yorkshire, UK.

Različica: Derek Nexus: 6.0.1, Nexus: 2.2.1

Dostop: Računalnik na FFA.

Uporabljene nastavitve: Selected Species: *mammal*; Reasoning Level: *at least EQUIVOCAL*, Perceive tautomers: *yes*; Perceive mixtures: *yes*; Match alerts without rules: *no*, Show open likelihood: *no*; Show negative predictions: *yes*; Show rapid prototypes: *yes*; Endpoints: *reproductive toxicity*.

Program Derek Nexus je ekspertni sistem organizacije Lhasa Limited, ki temelji na nizu pravili. Z uporabo SAR lahko s programom napovemo toksičnost spojin. Na podlagi več kot 30 let izkušenj znanstveniki nenehno posodablajo bazo podatkov s trenutnimi toksikološkimi znanji. Z analizo kompleksnih podatkov so izpeljali strokovna pravila za sklepanje verjetnosti toksičnosti. Program Derek se uporablja v številnih industrijskih panogah, vključno s kozmetično, farmacevtsko in kemično industrijo. Uporabljajo ga tudi regulatorne in vladne agencije. Opozorila vključujejo javne, lastniške in regulatorne podatke (vključno s podatki FDA). Napovedi verjetnosti toksičnosti spojine so jasno predstavljene in vključujejo podrobne informacije o razlogih za določeno verjetnost (58). Omogoča napovedovanje potencialne toksičnosti za večino toksikoloških končnih točk kot so: kancerogenost, mutagenost, genotoksičnost, preobčutljivost kože, teratogenost,

draženje, preobčutljivost dihal in reprodukcijska toksičnost. V primeru reprodukcijske toksičnosti program izda opozorila o razvojni toksičnosti, teratogenosti in testikularni toksičnosti. Oцени tudi stopnjo verjetnosti in izpostavi del strukture, ki je odgovoren za rezultat. Je hiter in poceni način za prepoznavanje potencialne toksičnosti spojin v začetnih fazah testiranja (59). Poročila rezultatov lahko shranimo v DOC, PDF, XLSX ali SDF obliki (58).

Uporabljen program: Toxicity Estimation Software Tool (TEST).

Različica: 4.0.

Dostop: Program je na voljo za prenos na spletnem naslovu: <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>.

Uporabljene nastavitve: Endpoint: *Developmental toxicity*, Method: *Consensus*.

Program TEST omogoča enostavno napovedovanje toksičnosti snovi s pomočjo QSAR metodologije. Toksični potencial organskih snovi oцени na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti in na osnovi strukture molekule, ki jo vnesemo. Strukturno molekule lahko narišemo ali pa vnesemo število CAS, lahko tudi kodo SMILES. Program vsebuje module za fizikalne lastnosti kot so: vrelišče, plamenišče, površinska napetost, viskoznost, gostota, topnost v vodi, toplotna prevodnost, parni tlak in tališče. Napovemo lahko toksičnost za številne končne točke (60). Za nas je najbolj pomembna bila razvojna toksičnost.

Uporabljen program: VEGA

Različica: 1.1.4

Dostop: Program je na voljo za prenos na spletnem naslovu: <https://www.vegahub.eu/download/>.

Nastavitve: Model: Developmental Toxicity model (CEASAR) 2.1.7 in Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0.

V programu VEGA se med modeli za določanje toksičnosti nahajata tudi modela Developmental Toxicity model (CAESAR) 2.1.7 in Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0. Uporabljamo jih za napoved reprodukcijske in razvojne toksičnosti. S številom rumeno obarvanih zvezdic, program poda stopnjo zanesljivosti napovedi. Tri obarvane zvezdice pomenijo, da se spojina nahaja znotraj območja uporabnosti modela

(●●●), torej je napoved zanesljiva; dve obarvani zvezdici pomenita, da bi se spojina lahko nahajala zunaj območja uporabnosti modela in tako obstajajo dvomi o zanesljivosti napovedi (●●), ena obarvana zvezdica pa pomeni, da se spojina nahaja izven območja uporabnosti modela in tako napoved ni zanesljiva (●). Rdeče ali zeleno obarvan krogec predstavljata napoved toksičnosti. Spojina z zeleno obarvanim krogcem ni toksična oziroma je toksična, če je krogec obarvan rdeče.

3.4. POTEK DELA Z UPORABLJENIMI METODAMI

S programom Meteor Nexus smo napovedali metabolizem EHMC in IAMC. Napovedane metabolite in izbrana cinamata smo uporabili za nadaljnje raziskave, in sicer za napoved vpliva na endokrini sistem in napoved različnih vidikov reprodukcijske toksičnosti. Za napoved vpliva na endokrini sistem smo uporabili program Endocrine Disruptome in Vega. S pomočjo programov Derek Nexus, Vega in TEST pa smo napovedali različne vidike reprodukcijske toksičnosti. Programa Meteor Nexus in Derek Nexus sta plačljiva, zato smo ta del izvedli na sami fakulteti, kjer so na voljo licencirani računalniki, medtem ko so ostali programi prosto dostopni na že omenjenih spletnih naslovih.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. METABOLIZEM PREISKOVANIH CINAMATOV

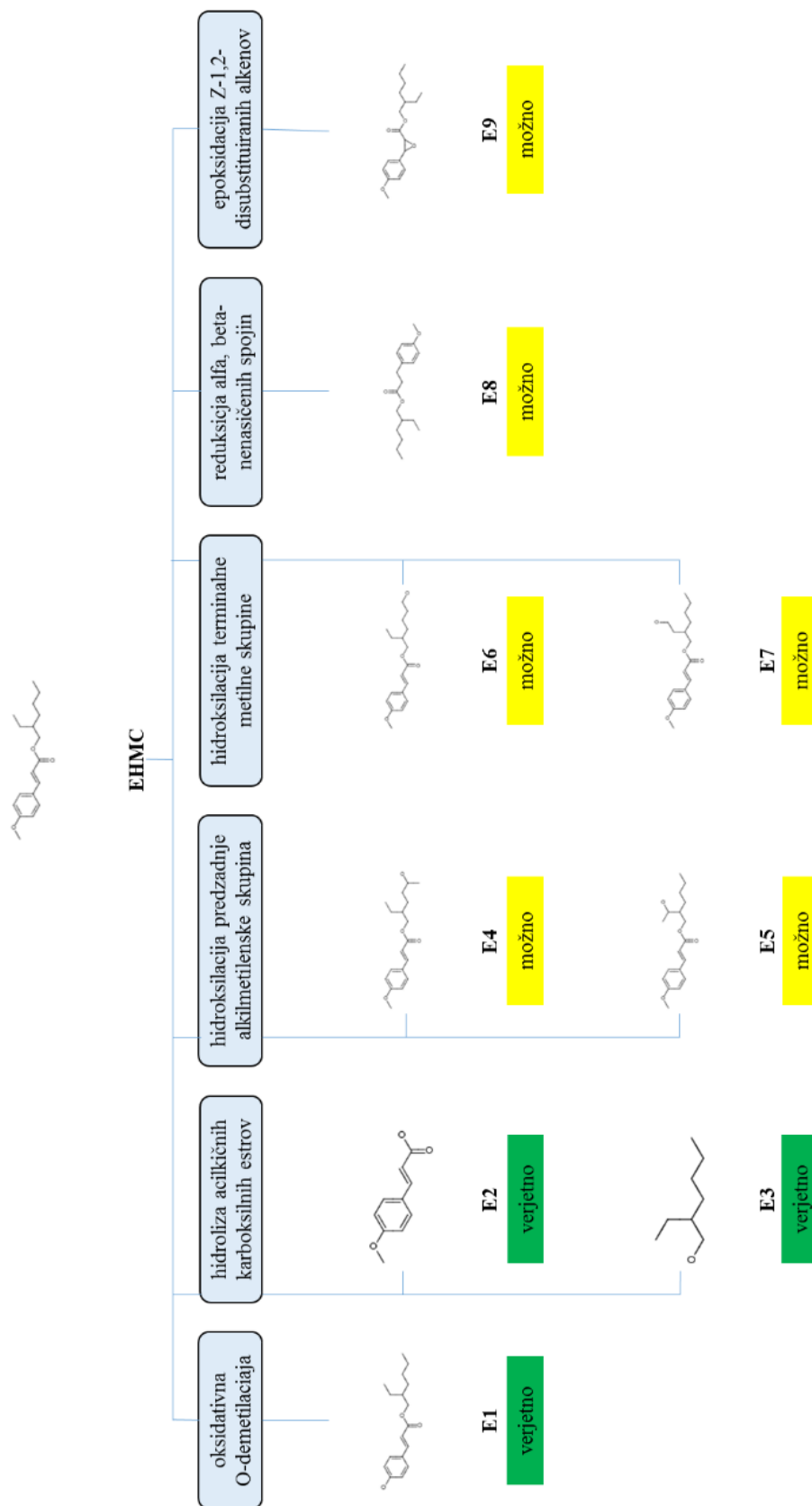
Za napovedovanje metabolizma EHMC in IAMC smo uporabili program Meteor Nexus. Program poleg reakcije poda tudi encim, s katerim je reakcija katalizirana. Encimi, ki sodelujejo pri metabolizmu EHMC in IAMC, so hidrolaza, citokrom P450 (CYP450), uridindifosfat-glukuronoziltransferaza (UGT), sulfottransferaza (SULT), alkohol-dehidrogenaza (ADH), glutation-S-transferaza (GST), glutamiltransferaza (GT), peptidaza, N-acetiltransferaza (NAT), epoksid hidrolaza (EH) in abKDBR. Program oceni tudi stopnjo verjetnosti, da bo določena reakcija potekla.

4.1.1. 2-ETILHEKSIL METOKSICIANMAT

Napoved metabolizma EHMC s programom Meteor Nexus nam v 1. stopnji reakcij poda 9 možnih poti metabolizma:

1. STOPNJA:

- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **E1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija predzadnje alkilmetilenske skupine do produkta **E4** (stopnja verjetnosti: **možno**)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija predzadnje alkilmetilenske skupine do produkta **E5** (stopnja verjetnosti: **možno**)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija terminalne metilne skupine do produkta **E6** (stopnja verjetnosti: **možno**)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija terminalne metilne skupine do produkta **E7** (stopnja verjetnosti: **možno**)
- Z abKDBR katalizirana redukcija alfa, beta-nenasičenih spojin do produkta **E8** (stopnja verjetnosti: **možno**)
- S CYP450 katalizirana epoksidacija Z-1,2-disubstituiranih alkenov do produkta **E9** (stopnja verjetnosti: **možno**)



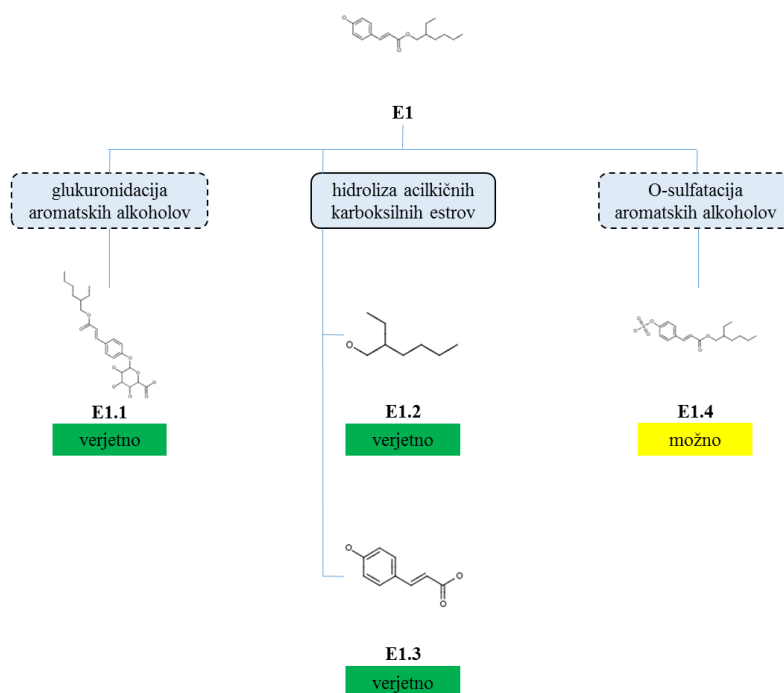
Slika 1: Napovedna shema metabolizma EHMC; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

Rezultati napovedanih poti nadaljnjega metabolizma produktov 1. stopnje **E1**, **E2**, **E3**, **E4**, **E5**, **E6**, **E7**, **E8**, **E9**, ki torej predstavljajo drugi korak metabolizma:

2. STOPNJA:

a) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E1

- Z UGT katalizirana glukuronidacija aromatskih alkoholov do produkta **E1.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E1.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E1.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija aromatskih alkoholov do produkta **E1.4** (stopnja verjetnosti: **možno**)

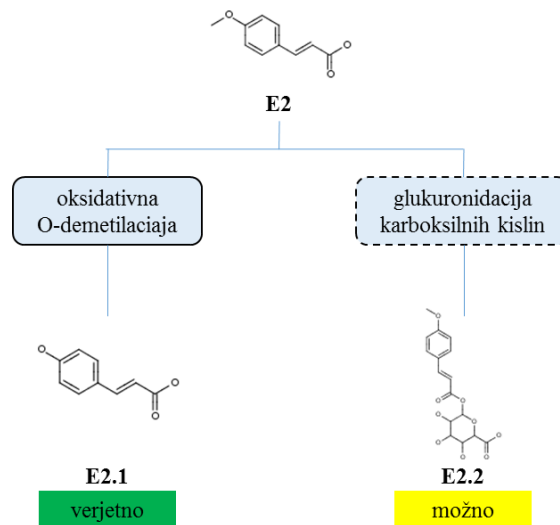


Slika 2: Napovedna shema metabolizma produkta E1; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

b) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E2

- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **E2.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)

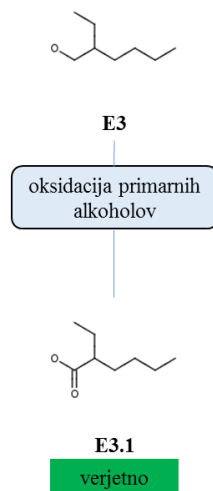
- Z UGT katalizirana glukuronidacija karboksilnih kislin do produkta **E2.2** (stopnja verjetnosti: možno)



Slika 3: Napovedna shema metabolizma produkta E2; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

c) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E3

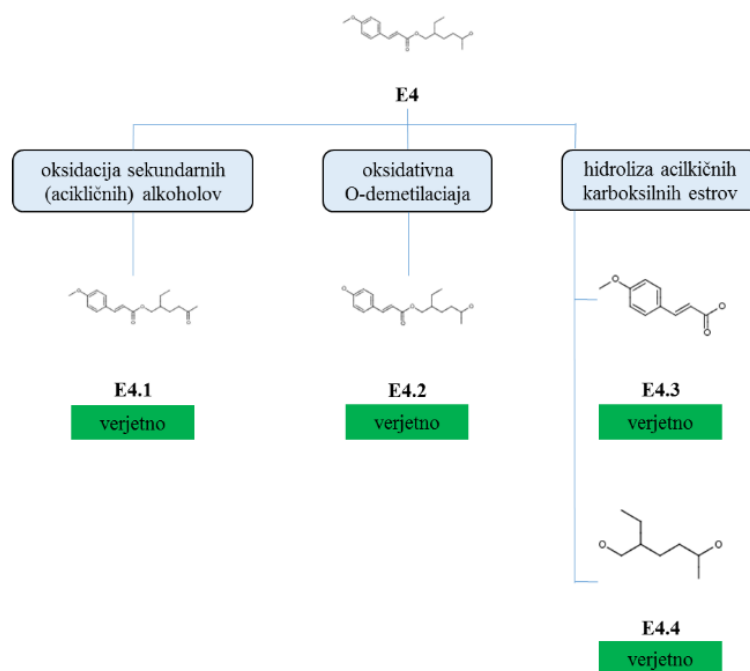
- Z ADH katalizirana oksidacija primarnih alkoholov do produkta **E3.1** (stopnja verjetnosti: verjetno)



Slika 4: Napovedna shema metabolizma produkta E3; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

d) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E4

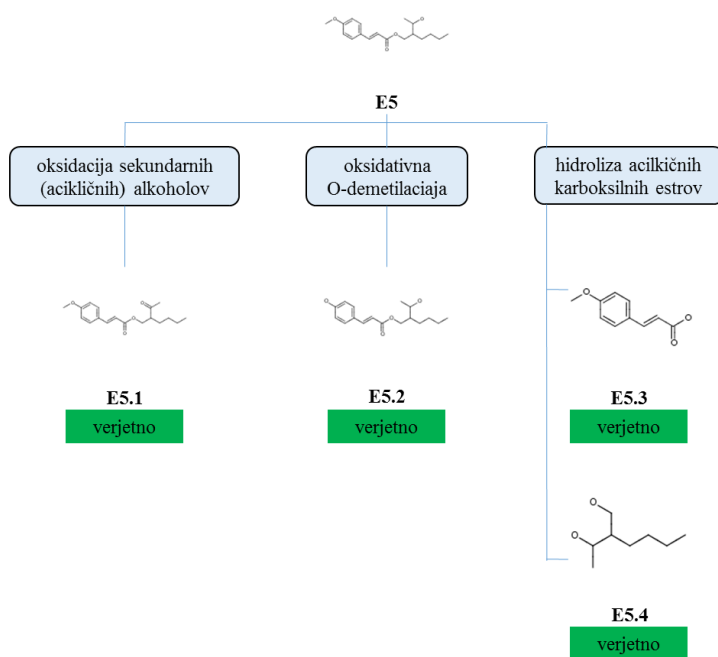
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarnih (acikličnih) alkoholov do produkta **E4.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **E4.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E4.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E4.4** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)



Slika 5: Napovedna shema metabolizma produkta E4; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

e) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E5

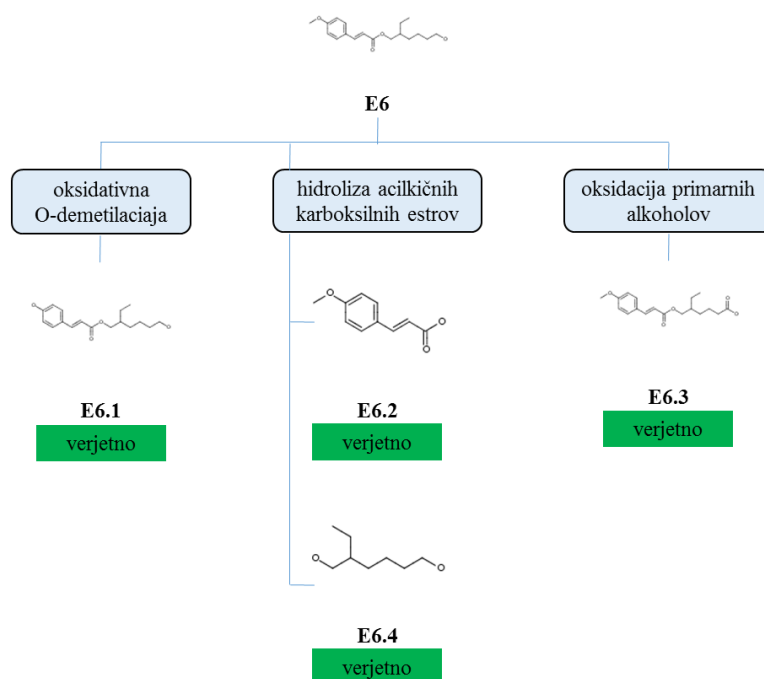
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarnih (acikličnih) alkoholov do produkta **E5.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **E5.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E5.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E5.4** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)



Slika 6: Napovedna shema metabolizma produkta E5; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

f) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E6

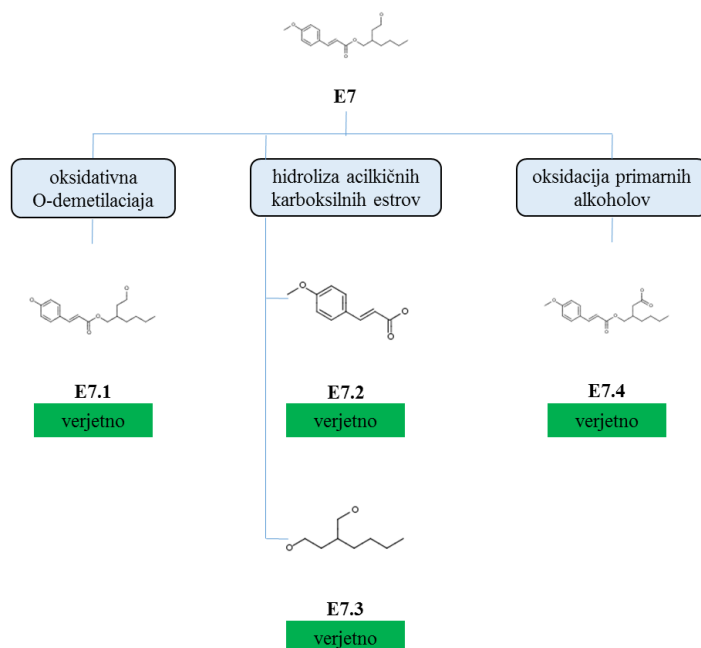
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **E6.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E6.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E6.3** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z ADH katalizirana oksidacija primarnih alkoholov do produkta **E6.4** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)



Slika 7: Napovedna shema metabolizma produkta E6; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

g) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E7

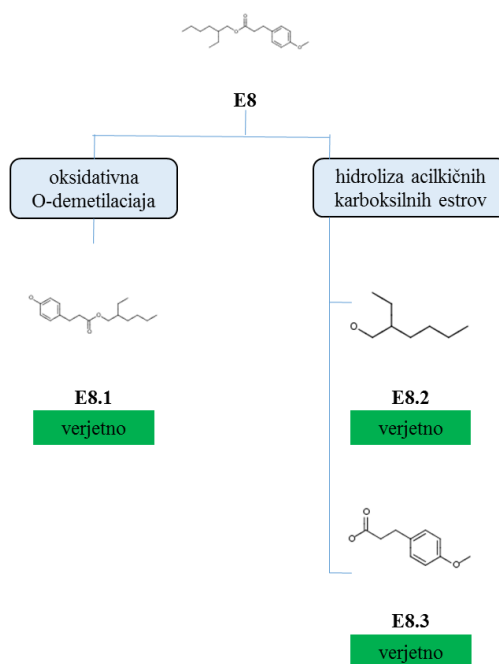
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **E7.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E7.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E7.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- Z ADH katalizirana oksidacija primarnih alkoholov do produkta **E7.4** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)



Slika 8: Napovedna shema metabolizma produkta E7; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

h) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E8

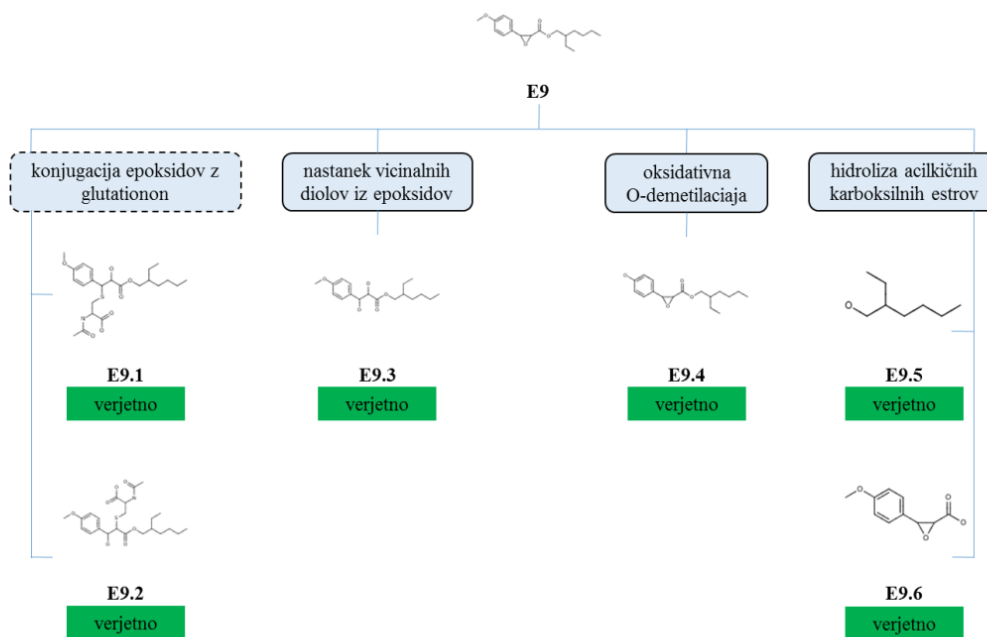
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **E8.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E8.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E8.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)



Slika 9: Napovedna shema metabolizma produkta E8; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

i) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta E9

- Z GST, GT, peptidazo ali NAT katalizirana konjugacija epoksidov z glutationom do produkta **E9.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- Z GST, GT, peptidazo ali NAT katalizirana konjugacija epoksidov z glutationom do produkta **E9.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- Z EH kataliziran nastanek vicinalnih diolov iz epoksidov do produkta **E9.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **E9.4** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E9.5** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **E9.6** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)



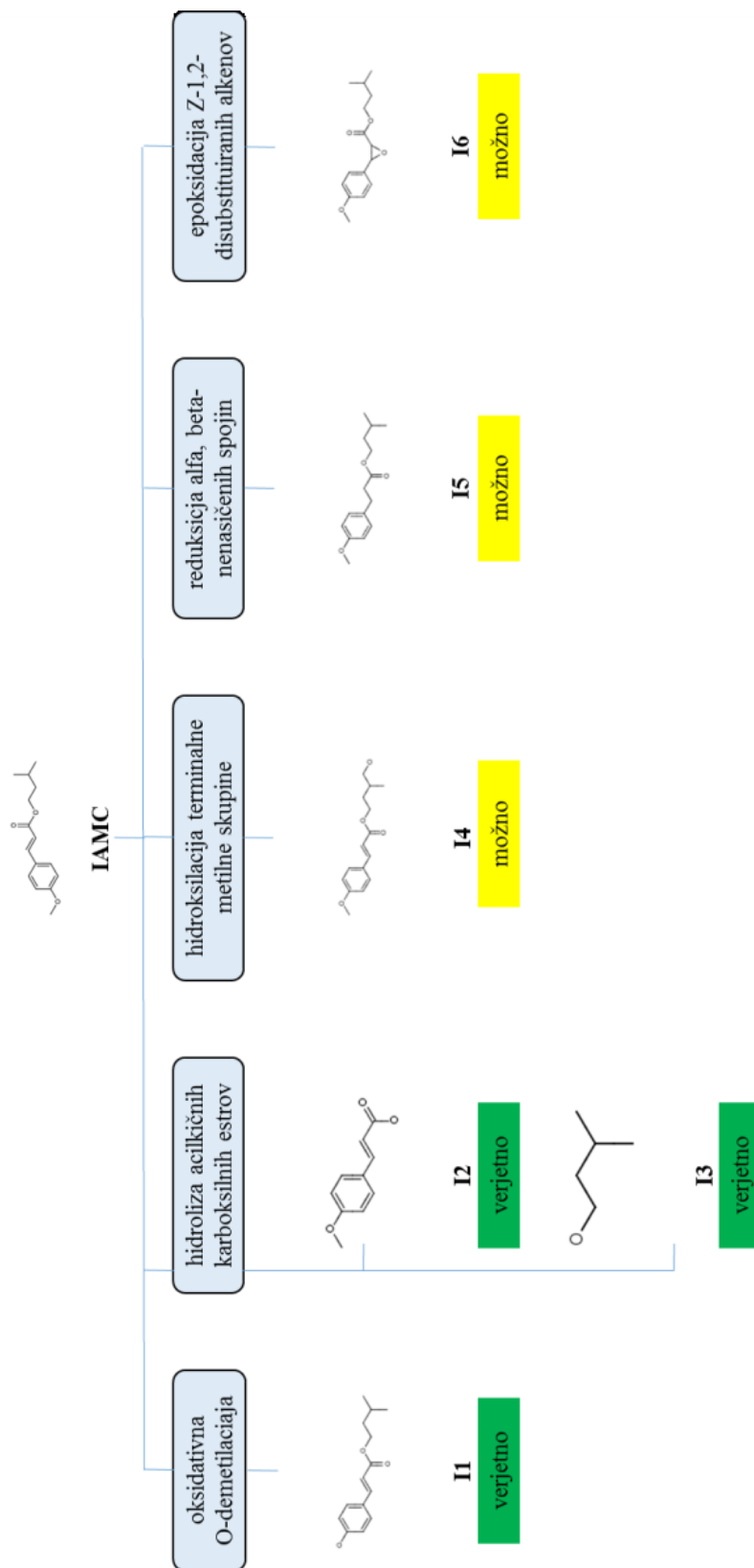
Slika 10: Napovedna shema metabolizma produkta E9; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

4.1.2. IZOAMIL METOKSICINMAT

Napoved metabolizma IAMC s programom Meteor Nexus nam v 1. stopnji reakcij poda rezultat za 6 poti metabolizma:

1. STOPNJA:

- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **I1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija terminalne metilne skupine do produkta **I4** (stopnja verjetnosti: **možno**)
- Z abKDBR katalizirana redukcija alfa, beta-nenasičenih spojin do produkta **I5** (stopnja verjetnosti: **možno**)
- S CYP450 katalizirana epoksidacija Z-1,2-disubstituiranih alkenov do produkta **I6** (stopnja verjetnosti: **možno**)



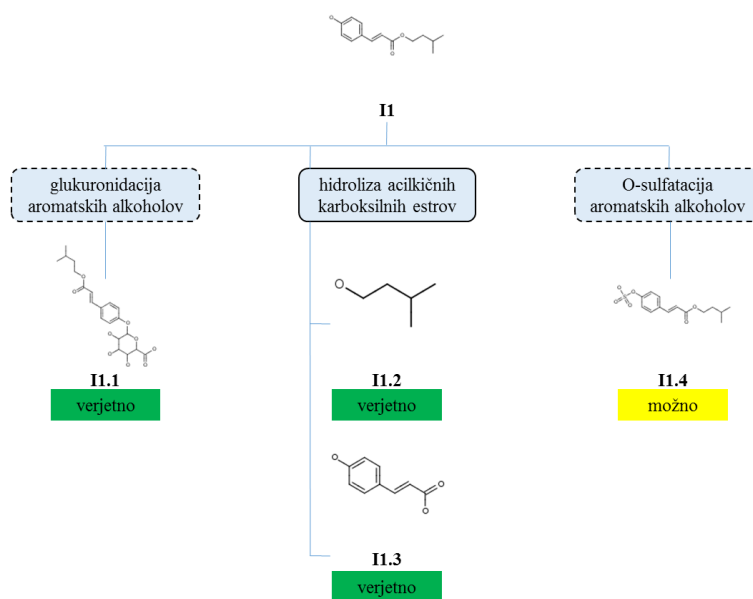
Slika 11: Napovedna shema metabolizma IAMC; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

Rezultati napovedanih poti nadaljnjega metabolizma produktov 1. stopnje **I1**, **I2**, **I3**, **I4**, **I5**, **I6**, ki torej predstavljajo drugi korak metabolizma:

2. STOPNJA:

a) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta I1

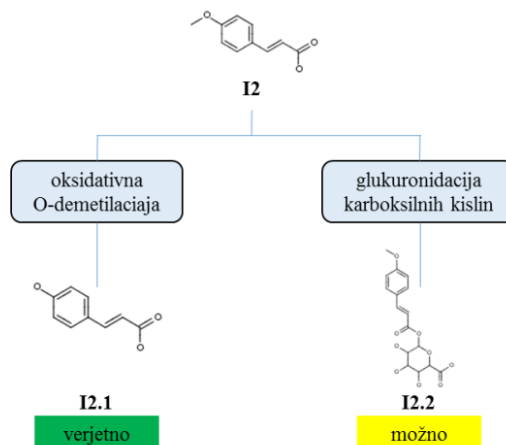
- Z UGT katalizirana glukuronidacija aromatskih alkoholov do produkta **I1.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I1.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I1.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija aromatskih alkoholov do produkta **I1.4** (stopnja verjetnosti: **možno**)



Slika 12: Napovedna shema metabolizma produkta I1; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

b) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta I2

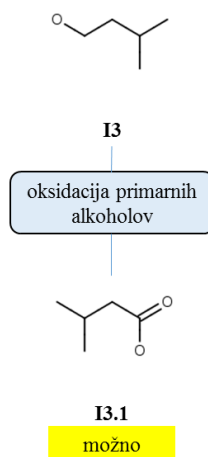
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **I2.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija karboksilne kisline do produkta **I2.2** (stopnja verjetnosti: **možno**)



Slika 13: Napovedna shema metabolizma produkta I2; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

c) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta I3

- Z ADH katalizirana oksidacija primarnih alkoholov do produkta **I3.1** (stopnja verjetnosti: možno)

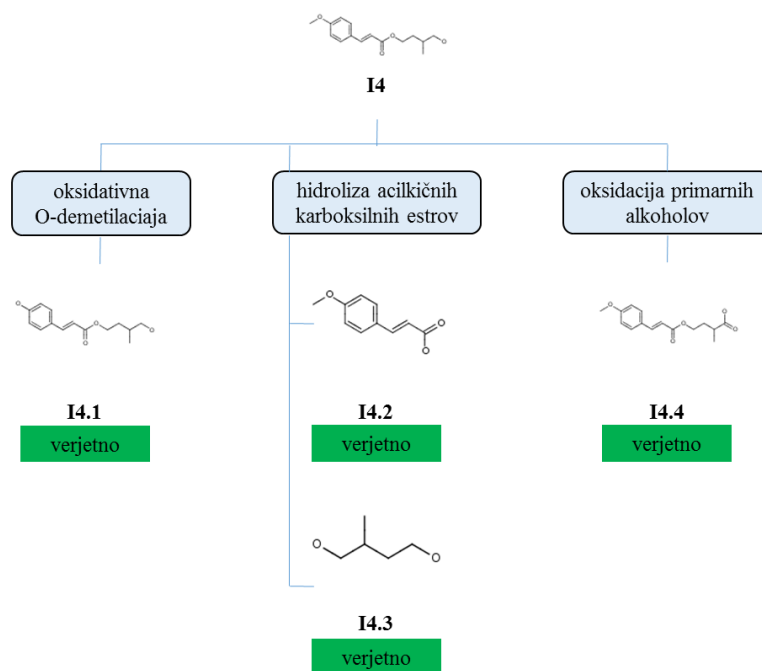


Slika 14: Napovedna shema metabolizma produkta I3; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

d) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta I4

- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **I4.1** (stopnja verjetnosti: verjetno)

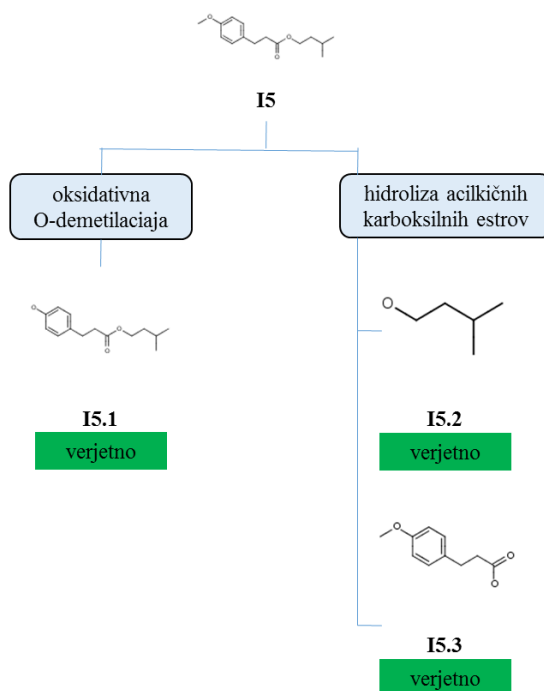
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I4.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I4.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- Z ADH katalizirana oksidacija primarnih alkoholov do produkta **I4.4** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)



Slika 15: Napovedna shema metabolizma produkta I4; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

e) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta I5

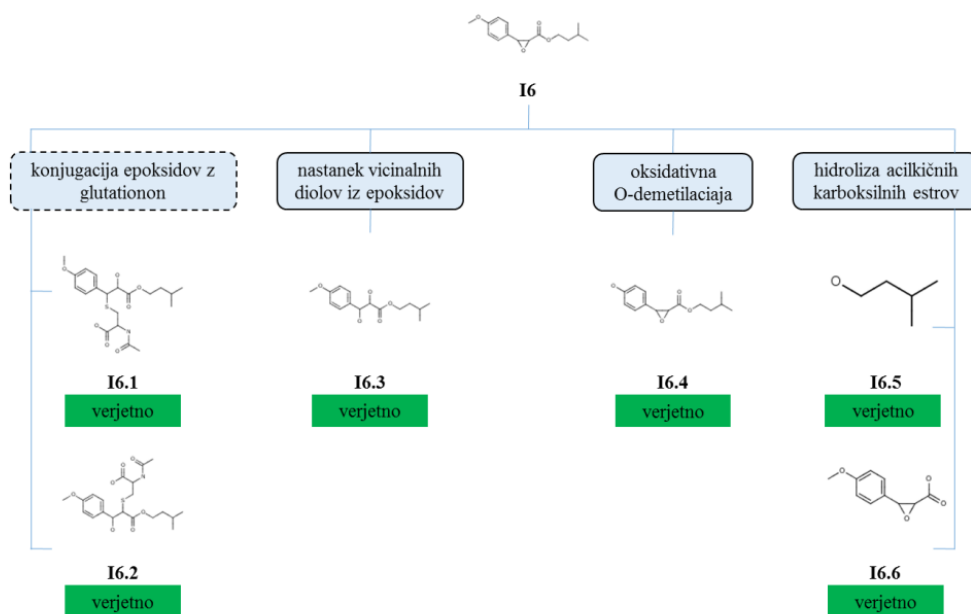
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **I5.1** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I5.2** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I5.3** (stopnja verjetnosti: **verjetno**)



Slika 16: Napovedna shema metabolizma produkta I5; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

f) Napoved nadaljnjega metabolizma produkta I6

- Z GST, GT, peptidazo ali NAT katalizirana konjugacija epoksidov z glutationom do produkta **I6.1** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z GST, GT, peptidazo ali NAT katalizirana konjugacija epoksidov z glutationom do produkta **I6.2** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z EH kataliziran nastanek vicinalnih diolov iz epoksidov do produkta **I6.3** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S CYP450 katalizirana oksidativna O-demetilacija do produkta **I6.4** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I6.5** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S hidrolazo katalizirana hidroliza acikličnih karboksilnih estrov do produkta **I6.6** (stopnja verjetnosti: verjetno)



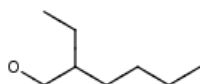
Slika 17: Napovedna shema metabolizma produkta I6; legenda: polna črta okvirja - reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta okvirja - reakcija metabolizma 2. faze.

4.1.3. DISKUSIJA

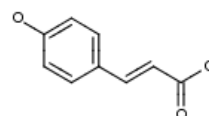
Program je za EHMC in IAMC v 1. stopnji metabolizma kot najverjetnejše reakcije (stopnja verjetnosti: verjetno) napovedal oksidativno O-demetilacijo in hidrolizo acikličnih karboksilnih estrov. V 1. stopnji je program kot manj verjetne reakcije (stopnja verjetnosti: možno) napovedal reakcije hidroksilacije predzadnje akrilmetilenske skupine, hidroksilacije terminalne metilne skupine, redukcije alfa, beta-nenasičenih spojin, epoksidacije Z-1,2-disubstituiranih alkanov. V 2. stopnji pa je program za manj verjetne reakcije (stopnja verjetnosti: možno) napovedal reakcije O-sulfatacije aromatskih alkoholov, glukuronidacije karboksilnih kislin in oksidacije primarnih alkoholov. V 2. stopnji je program kot najverjetnejše reakcije (stopnja verjetnosti: verjetno) napovedal glukuronidacije aromatskih alkoholov, hidrolize acikličnih karboksilnih estrov, oksidativno O-demetilacije, oksidacije primarnih alkoholov, oksidacije sekundarnih (acikličnih) alkoholov, konjugacije epoksidov z glutationom in nastanek vicinalnih diolov iz epoksidov.

Očistek EHMC *in vitro* preiskovali v mišjih, podganjih in človeških hepatocitih. Identifikacija metabolitov v urinu glodalcev po peroralni in dermalni izpostavitvi EHMC je pokazala obsežen metabolizem, potekla je predvsem hidroliza estra. Nastala sta 2

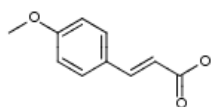
potencialno reprodukcijsko in razvojno toksična metabolita, **2-etilheksanol (2-EH)** in **2-etilheksanojska kislina (2-EHA)**. Oba metabolita smo napovedali tudi *in silico*, in sicer s hidrolizo acikličnih karboksilnih estrov s stopnjo verjetnosti *verjetno*. **2-EH** je v našem primeru metabolit z oznako **3** in **2-EHA** kot metabolit z oznako **8**. Identificirali so tudi metabolit **p-metoksicimetno kislino**, ki ustreza našemu napovedanemu metabolitu z oznako **6** in **njegov glukuronid**, ki ustreza našemu napovedanemu metabolitu **7**. Oba metabolita smo napovedali s stopnjo verjetnosti *verjetno*. Torej v tem primeru lahko ocenimo dobro napovedno moč programa Meteor Nexus. Zaznali so tudi druge metabolite, katerih naš program ni napovedal, in sicer: glukuronid *p*-metoksicimetne kisline, konjugat *p*-metoksicinamata z glicinom, hidroksicinamat sulfat, konjugat hidroksicinamat z glicinom, hidroksimetoksi cinamat, hidroksimetoksi cinamat sulfat, glukuronid 2-EH, glukuronid 2-EHA, 2-etil-5-ketoheksanojska kislina in njen glukuronid, 2-etiladipat in njegov glukuronid, glukuronid hidroksietilheksanojske kisline, metoksi benzoat in njegov glukuronid ter metoksiglicin (23). V drugi študiji so izvajali *in vivo* test, kjer so prostovoljci zaužili kapsule s 100 mg EHMC. Preučevali so izločanje **p-metoksicimetne kisline** v urinu z GC/MS (plinska kromatografija/masna spektroskopija). V vseh primerih je prišlo do počasne hidrolize s plazemskimi esterazami, pri čemer sta nastali **p-metoksicimetna kislina** in **4-hidroksicimetna kislina**. **4-hidroksicimetna kislina** sicer ustreza našemu metabolitu označen kot **4**, ki smo ga napovedali s stopnjo verjetnosti *verjetno*. S hidrolizo EHMC nastane tudi **2-EH**, vendar ga v tej študiji ne omenjajo (61). S tem lahko samo še potrdimo dobro napovedno moč programa, glede na to, da so v študiji identificirali metabolit, ki ga je napovedal tudi naš program. Nekaterih z *in silico* metodami napovedanih reakcij metabolizma in nastalih metabolitov v dosedanjih raziskavah niso zasledili. Obstajajo možnosti, da metabolizem v določenih napovedanih smereh sploh ne poteka v telesu oz. poteka v tako majhni količini, da njihovih metabolitov ni mogoče zaznati. Vendar pa je smiselno, da nastanka teh metabolitov ne izključimo in smo pri nadaljnjih raziskavah pozorni na njihov morebiten nastanek.



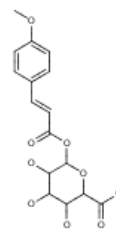
3 ali **2-EH**



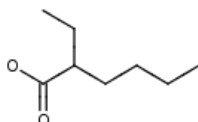
4 ali **4-hidroksicimetna kislina**



6 ali **p-metoksicimetna kislina**



7 ali **glukuronid p-metoksicimetne kisline**



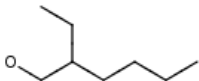
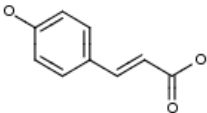
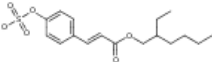
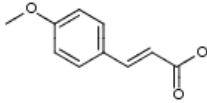
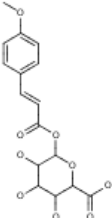
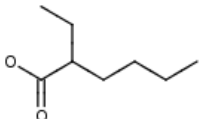
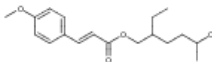
8 ali **2-EHA**

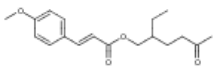
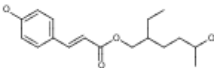
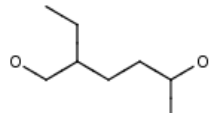
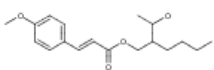
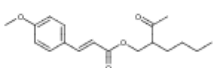
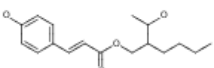
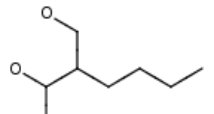
Slika 18: Metaboliti, ki so jih zaznali v *in vitro/in vivo* raziskavah in smo jih napovedali tudi z *in silico* metodo.

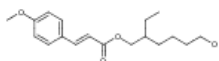
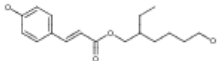
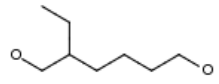
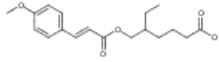
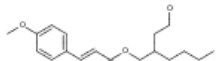

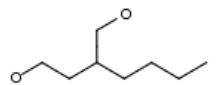
4.2. ZBRANI METABOLITI

Preglednica III: Zbrani metaboliti EHMC in IAMC za nadaljnjo raziskavo endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti.

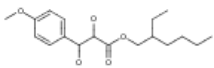
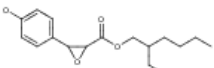
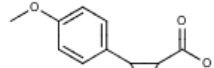
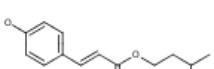
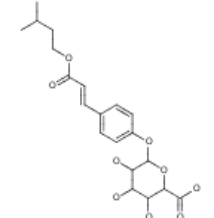
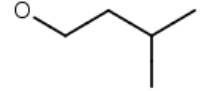
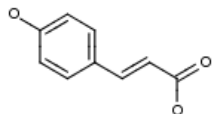
ŠT.	ŠT.	METABOLIT IZBRANEGA CINAMATA	SMILES KODA	IZVORNI CINAMAT
<u>1</u>	E1		<chem>OC=1C=CC(C=C C(OCC(CC)CCC C)=O)=CC=1</chem>	EHMC
<u>2</u>	E1.1		<chem>OC1C(OC(C(O)C 1O)C(O)=O)OC= 2C=CC(C=CC(O CC(CC)CCCC)= O)=CC=2</chem>	EHMC

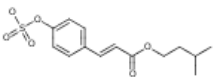
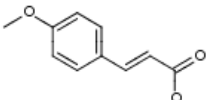
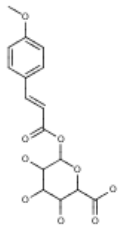
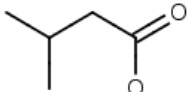
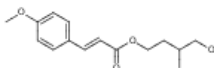
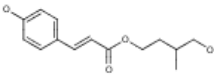
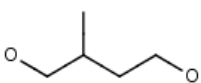
<u>3</u>	E1.2, E3, E8.2 E9.5		OCC(CC)CCCC	EHMC
<u>4</u>	E1.3, E2.1		OC(=O)C=CC=1 C=CC(O)=CC=1	EHMC
<u>5</u>	E1.4		OS(OC=1C=CC(C=CC(OCC(CC)C CCC)=O)=CC= 1)(=O)=O	EHMC
<u>6</u>	E2, E4.3, E5.3, E6.2, E7.2		OC(=O)C=CC=1 C=CC(OC)=CC= 1	EHMC
<u>7</u>	E2.2		OC1C(OC(C(O)C 1O)C(O)=O)OC(=O)C=CC=2C=C C(OC)=CC=2	EHMC
<u>8</u>	E3.1		OC(C(CC)CCCC) =O	EHMC
<u>9</u>	E4		OC(C)CCC(COC(=O)C=CC=1C=C C(OC)=CC=1)CC	EHMC

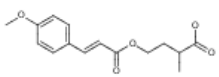
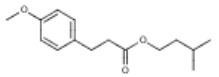
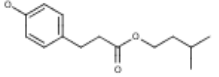
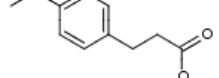
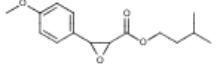
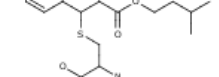
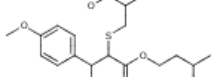
<u>10</u>	E4.1		<chem>O(CC(CC)CCC(C)=O)C(=O)C=CC=1C=CC(OC)=CC=1</chem>	EHMC
<u>11</u>	E4.2		<chem>OC(C)CCC(COC(=O)C=CC=1C=C(C(O)=CC=1)CC</chem>	EHMC
<u>12</u>	E4.4		<chem>OCC(CC)CCC(O)C</chem>	EHMC
<u>13</u>	E5		<chem>OC(C)C(COC(=O)C=CC=1C=CC(OC)=CC=1)CCC</chem>	EHMC
<u>14</u>	E5.1		<chem>O(CC(CCCC)C(C)=O)C(=O)C=CC=1C=CC(OC)=CC=1</chem>	EHMC
<u>15</u>	E5.2		<chem>OC(C)C(COC(=O)C=CC=1C=CC(O)=CC=1)CCCC</chem>	EHMC
<u>16</u>	E5.4		<chem>OCC(CCCC)C(O)C</chem>	EHMC

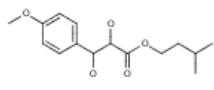
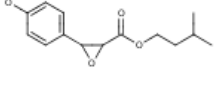
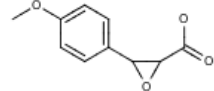
<u>17</u>	E6		<chem>OCCCCC(COC(=O)C=CC=1C=CC(OC)=CC=1)CC</chem>	EHMC
<u>18</u>	E6.1		<chem>OCCCCC(COC(=O)C=CC=1C=CC(O)=CC=1)CC</chem>	EHMC
<u>19</u>	E6.3		<chem>OCCCCC(CO)CC</chem>	EHMC
<u>20</u>	E6.4		<chem>OC(CCCCC(COC(=O)C=CC=1C=C(C(OC)=CC=1)CC)=O</chem>	EHMC
<u>21</u>	E7		<chem>OCCC(COC(=O)C=CC=1C=CC(OC)=CC=1)CCCC</chem>	EHMC
<u>22</u>	E7.1		<chem>OCCC(COC(=O)C=CC=1C=CC(OC)=CC=1)CCCC</chem>	EHMC
<u>23</u>	E7.3		<chem>OCCC(CO)CCCC</chem>	EHMC

<u>24</u>	E7.4		<chem>OC(CC(COC(=O)C=CC=1C=CC(OC)=CC=1)CCCC)=O</chem>	EHMC
<u>25</u>	E8		<chem>O(CC(CC)CCCC)C(CCC=1C=CC(OC)=CC=1)=O</chem>	EHMC
<u>26</u>	E8.1		<chem>OC=1C=CC(CCC(OCC(CC)CCCC)=O)=CC=1</chem>	EHMC
<u>27</u>	E8.3		<chem>OC(CCC=1C=CC(OC)=CC=1)=O</chem>	EHMC
<u>28</u>	E9		<chem>O1C(C1C=2C=C(C(OC)=CC=2)C(OCC(CC)CCCC)=O</chem>	EHMC
<u>29</u>	E9.1		<chem>OC(C(SCC(NC(C)=O)C(O)=O)C=1C=CC(OC)=CC=1)C(OCC(CC)CCC)=O</chem>	EHMC
<u>30</u>	E9.2		<chem>OC(C(SCC(NC(C)=O)C(O)=O)C(OCC(CC)CCCC)=O)C=1C=CC(OC)=CC=1</chem>	EHMC

<u>31</u>	E9.3		<chem>OC(C(O)C=1C=C C(OC)=CC=1)C(O CC(CC)CCCC)=O</chem>	EHMC
<u>32</u>	E9.4		<chem>OC=2C=CC(C1O C1C(OCC(CC)C CCC)=O)=CC=2</chem>	EHMC
<u>33</u>	E9.6		<chem>OC(C1OC1C=2C =CC(OC)=CC=2) =O</chem>	EHMC
<u>34</u>	I1		<chem>C1=CC(=CC=C1 C=CC(OCCC(C) C)=O)O</chem>	IAMC
<u>35</u>	I1.1		<chem>C1=CC(=CC=C1 C=CC(OCCC(C) C)=O)OC2C(C(C (C(O2)C(O)=O) O)O)O</chem>	IAMC
<u>36</u>	I1.2, I3, I5.2, I6.5		<chem>OCCC(C)C</chem>	IAMC
<u>37</u>	I1.3, I2.1		<chem>C1=CC(=CC=C1 C=CC(=O)O)O</chem>	IAMC

<u>38</u>	I1.4		<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(OCCC(C)C)=O)OS(=O)(O)=O</chem>	IAMC
<u>39</u>	I2, I4.2		<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(=O)O)OC</chem>	IAMC
<u>40</u>	I2.2		<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(=O)OC2C(C(C(C(O2)C(O)=O)O)O)O)OC</chem>	IAMC
<u>41</u>	I3.1		<chem>O=C(CC(C)C)O</chem>	IAMC
<u>42</u>	I4		<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(OCCC(C)CO)=O)OC</chem>	IAMC
<u>43</u>	I4.1		<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(OCCC(C)CO)=O)O</chem>	IAMC
<u>44</u>	I4.3		<chem>OCCC(C)CO</chem>	IAMC

<u>45</u>	I4.4		<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(OCCC(C)C(=O)O)=O)OC</chem>	IAMC
<u>46</u>	I5		<chem>C1=CC(=CC=C1CCC(OCCC(C)C)=O)OC</chem>	IAMC
<u>47</u>	I5.1		<chem>C1=CC(=CC=C1CCC(OCCC(C)C)=O)O</chem>	IAMC
<u>48</u>	I5.3		<chem>C1=CC(=CC=C1CCC(=O)O)OC</chem>	IAMC
<u>49</u>	I6		<chem>C1=CC(=CC=C1C2C(C(OCCC(C)C)=O)O2)OC</chem>	IAMC
<u>50</u>	I6.1		<chem>C1=CC(=CC=C1C(C(C(OCCC(C)C)=O)O)SCC(NC(C)=O)C(=O)O)OC</chem>	IAMC
<u>51</u>	I6.2		<chem>C1=CC(=CC=C1C(C(C(OCCC(C)C)=O)SCC(NC(C)=O)C(=O)O)O)OC</chem>	IAMC

<u>52</u>	I6.3		C1=CC(=CC=C1 C(C(C(OCCC(C) C)=O)O)O)OC	IAMC
<u>53</u>	I6.4		C1=CC(=CC=C1 C2C(C(OCCC(C) C)=O)O2)O	IAMC
<u>54</u>	I6.6		C1=CC(=CC=C1 C2C(C(=O)O)O2)OC	IAMC

4.3. ENDOKRINO DELOVANJE

4.3.1. REZULTATI PROGRAMA ENDOCRINE DISRUPTOME

Za napovedovanje vezave na hormonske receptorje smo uporabili program Endocrine Disruptome. Program napove vezavo na 12 različnih hormonskih receptorjev. Pri štirih receptorjih je predvidena vezava tako na agonistično (AR, ER α , ER β in GR) kot tudi antagonistično (AR an, ER α an, ER β an in GR an) konformacijo receptorja. Rezultati so podani številčno in so razporejeni v 4 razrede. **Rdeča** ustreza največji verjetnosti vezave, **oranžna** veliki verjetnosti, **rumena** srednji in **zeleno** ustreza majhni verjetnosti vezave.

Rezultati vezave preiskovanih cinamatov EHMC in IAMC ter pozitivne in negativne kontrolo na hormonske receptorje:

- Program je za **EHMC** napovedal **srednjo verjetnost** vezave na receptorje AR an, TR α in TR β . Na receptorje AR, ER α , ER α an, ER β , ER β an, GR, GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ in RXR α je program napovedal **majhno verjetnost** vezave.

- Program je za **IAMP** napovedal **srednjo verjetnost** vezave na receptorje AR an, GR in TR α . Na AR, ER α , ER α an, ER β , ER β an, GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ , RXR α in TR β je program napovedal **majhno verjetnost** vezave.
- Program je za **negativno kontrolo timol** napovedal **srednjo verjetnost** vezave na AR an. Na vse ostale receptorje je program napovedal **majhno verjetnost** vezave liganda.
- Program je za **pozitivno kontrolo BPA** napovedal **največjo verjetnost** vezave za AR an. Na receptor AR an je program napovedal **veliko verjetnost** vezave. Na receptorje ER α , ER β , GR, TR α in TR β je program napovedal **srednjo verjetnost** in na ostale receptorje **majhno verjetnost**.

Preglednica IV: Rezultati napovedi vezave EHMC, IAMC, pozitivne in negativne kontrole na različne hormonske receptorje s programom Endocrine Disruptome; legenda: rdeča-največja vezavna verjetnost, oranžna-velika vezavna verjetnost, rumena-srednja vezavna verjetnost in zelena-majhna verjetnost vezave.

METABOLIT	AR	AR an.	ER α	ER α an.	ER β	ER β an.	GR	GR an.	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
EHMC	-7,2	-6,9	-6,8	-6,8	-6,6	-6,7	-6,8	-6,7	-7,6	-7,8	-7,0	-7,2	-7,2	-7,7	-8	-8,1
IAMC	-7,0	-6,9	-6,6	-6,5	-6,8	-6,4	-7,7	-6,6	-7,2	-7,4	-6,7	-6,9	-7,0	-7,6	-7,5	-7,6
BPA	-8,3	-8,5	-8,3	-8,5	-8,3	-8,1	-7,5	-7,5	-8,2	-8	-7,6	-7,5	-7,0	-8,0	-8,1	-8,6
TIMOL	-7,1	-6,7	-6,1	-5,9	-6,1	-6,0	6,3	-5,9	-6,9	-6,9	-6,2	-6,4	-5,9	-6,2	-6,9	-6,6

Rezultat verjetnosti vezave metabolite izbranih cinamatov na hormonske receptorje:

- Na receptor **ER α , ER α an , ER β , ER β an, GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ in RXR α** je program napovedal **majhno verjetnost** vezave za vse metabolite.
- Na receptor **AR** je program napovedal **srednjo verjetnost** vezave za metabolit **53**, ki je nastal z oksidativno O-demetilacijo, in **majhno verjetnost** vezave za vse ostale metabolite.
- Na receptor **AR an** je program napovedal **veliko verjetnost** vezave za metabolit **7**, ki je nastal z glukuronidacijo karboksilnih kislin in **srednjo verjetnost** vezave za vse ostale metabolite.
- Na receptor **GR** je program napovedal **srednjo verjetnost** vezave za metabolite: **1, 2, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 20, 21, 22, 24, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 38, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 49, 50, 51** in **52**, ki v svoji strukturi vsebujejo hidroksilno skupino,

metoksi, glukuronsko, sulfonsko, keto, karboksilno, epoksidno skupino, glutation ali vicinalni diol in **majhno verjetnost** vezave za vse ostale metabolite.

- Na receptor **TR α** je program napovedal **srednjo verjetnost** vezave za metabolite: **1, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 31, 32, 34, 38, 42, 43, 45, 46, 47, 49** in **53**, ki v svoji strukturi vsebujejo hidroksilno skupino, metoksi, glukuronsko, sulfonsko, keto, karboksilno, epoksidno skupino ali vicinalni diol. Na receptor **TR α** je program napovedal **majhno verjetnost** vezave za vse ostale metabolite.
- Na receptor **TR β** je program napovedal **srednjo verjetnost** vezave za metabolite: **1, 5, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 24, 26, 28** in **32**, ki v svoji strukturi vsebujejo hidroksilno skupino, metoksi, sulfonsko, keto, karboksilno ali epoksidno skupino. Na receptor **TR β** je program napovedal **majhno verjetnost** vezave za vse ostale metabolite.

Preglednica V: Rezultati napovedi vezave metabolitov na različne hormonske receptorje s programom Endocrine Disruptome; legenda: rdeča-največja vezavna verjetnost, oranžna-velika vezavna verjetnost, rumena-srednja vezavna verjetnost in zelena-majhna vezavna verjetnost.

METABOLIT	AR	AR an.	ER α	ER α an.	ER β	ER β an.	GR	GR an.	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
<u>1</u>	-7,2	-7,3	-7,3	-7,3	-7,4	-7,0	-7,4	-6,5	-7,4	-8,1	-7,1	-7,9	-7,1	-8,5	-7,9	-7,9
<u>2</u>	-4,2	-3,6	-7,7	-7,7	-6,2	-7,2	-9,5	-8,0	-9,1	-9,1	-8,8	-8,7	-7,9	-8,7	-5,5	-7,3
<u>3</u>	-5,1	-5,2	-4,7	-4,8	-4,9	-5,1	-4,9	-4,9	-5,2	-4,9	-4,8	-5,1	-5,1	-5,2	-5,3	-5,1
<u>4</u>	-6,8	-6,6	-6,2	-6,4	-6,3	-6,3	-6,9	-5,9	-6,3	-6,7	-6,1	-6,0	-6,3	-7,0	-6,9	-6,3
<u>5</u>	-7,1	-6,4	-6,9	-7,0	-6,9	-6,8	-8,4	-7,0	-8,0	-8,1	-7,1	-7,3	-7,0	-8,1	-7,9	-8,4
<u>6</u>	-6,9	-6,4	-5,9	-5,9	-6,1	-5,7	-6,9	-5,6	-6,5	-6,7	-6,1	-6,0	-6,3	-6,6	-6,9	-6,5
<u>7</u>	-7,2	-7,7	-7,9	-7,5	-7,5	-6,6	-8,6	-7,2	-8,6	-8,6	-7,9	-8,0	-7,5	-8,5	-7,8	-7,8
<u>8</u>	-5,4	-5,4	-4,8	-4,8	-5,0	-4,7	-5,1	-4,8	-5,3	-5,3	-4,7	-5,3	-5,1	-5,5	-5,4	-5,2
<u>9</u>	-7,0	-7,0	-6,7	-6,7	-6,7	-7,0	-8,1	-6,6	-8,1	-7,9	-7,1	-7,6	-7,2	-7,6	-7,8	-8,3
<u>10</u>	-6,9	-6,7	-6,9	-6,8	-6,8	-6,8	-8,1	-6,6	-7,9	-8,2	-7,0	-7,4	-7,0	-8,3	-7,8	-8,2
<u>11</u>	-7,4	-7,3	-7,7	-7,4	-7,5	-7,2	-7,8	6,4	-7,7	-7,6	-7,1	-7,8	-7,3	-8,4	-8,3	-8,1
<u>12</u>	-5,3	-5,2	-5,1	-4,9	-4,9	-5,0	-5,2	-4,9	-5,2	-5,1	-4,8	-5,1	-5,0	-5,1	-5,3	-5,2
<u>13</u>	-7,1	-7,0	-7,3	-7,0	-7,3	-6,4	-8,1	-6,8	-7,7	-8,0	-6,8	-7,5	-7,5	-8,0	-8,2	-8,2
<u>14</u>	-7,0	-7,1	-7,2	-6,9	-7,1	-6,6	-8,3	-6,7	-7,9	-8,2	-6,9	-7,8	-7,4	-7,9	-7,9	-8,2
<u>15</u>	-7,4	-7,4	-7,6	-7,7	-7,9	-7,0	-7,1	-6,5	-8,1	-7,9	-6,9	-7,7	-7,4	-8,5	-8,1	-7,9
<u>16</u>	-5,2	-5,7	-5,2	-5,1	-5,1	-5,2	-4,9	-4,6	-5,3	-5,3	-5,0	-5,1	-5,1	-5,4	-5,4	-5,3
<u>17</u>	-6,9	-6,7	-6,8	-6,6	-6,5	-6,3	-7,3	-6,2	-7,9	-7,3	-7,0	-7,4	-7,2	-7,5	-7,4	-8,4
<u>18</u>	-7,2	-7,0	-7,8	-7,2	-7,2	-6,9	-7,3	-6,7	-7,6	-7,8	-6,8	-7,8	-7,2	-8,4	-7,8	-8,2
<u>19</u>	-5,0	-4,9	-4,9	-4,7	-4,7	-4,9	-4,8	-4,7	-5,0	-5,0	-4,6	-5,0	-5,0	-5,2	-5,2	-4,7
<u>20</u>	-6,9	-6,9	-7,1	-6,9	-6,8	-6,7	-8,0	-6,6	-7,9	-7,9	-6,9	-7,6	-7,4	-7,7	-7,8	-8,2
<u>21</u>	-6,9	-6,8	-7,2	-6,6	-7,1	-6,6	-8,3	-6,5	-7,6	-7,3	-6,3	-6,6	-7,2	-7,6	-7,9	-8,0
<u>22</u>	-7,0	-7,2	-7,3	-7,3	-7,4	-6,8	-7,9	-6,4	-7,5	-7,7	-6,7	-7,7	-6,9	-7,8	-7,7	-7,8
<u>23</u>	-5,0	-5,2	-5,1	-5,0	-5,1	-5,1	-5,0	-4,9	-5,2	-5,1	-4,6	-5,0	-5,0	-5,4	-5,1	-5,6
<u>24</u>	-7,0	-6,6	-7,2	-6,7	-7,0	-6,8	-8,3	-6,8	-7,7	-7,9	-6,8	-7,1	-7,3	-7,8	-8,1	-8,3

<u>25</u>	-6,9	-6,7	-7,1	-6,8	-7	-6,7	-6,3	-5,8	-7,8	-7,6	-6,2	-7,4	-7,1	-7,1	-7,7	-7,8
<u>26</u>	-7,4	-7,2	-7,4	-7,3	-7,3	-6,9	-6,5	-6,2	-7,4	-7,4	-6,5	-7,5	-7,2	-7,9	-7,6	-7,9
<u>27</u>	-6,7	-6,0	-5,6	-5,6	-6,0	-5,8	-6,6	-5,5	-6,3	-6,5	-6,0	-5,8	-6,0	-6,6	-6,6	-6,4
<u>28</u>	-6,5	-6,8	-7,2	-6,9	-7,0	-6,8	-7,8	-6,3	-7,8	-8,0	-7,0	-7,8	-7,4	-7,9	-7,7	-8,0
<u>29</u>	-4,0	-4,3	-7,1	-7,1	-3,8	-6,7	-8,3	-7,2	-7,9	-7,9	-7,1	-7,4	-8,0	-8,3	-5,7	-6,6
<u>30</u>	-4,0	-4,9	-7,1	-7,1	-4,5	-6,7	-7,6	-7,2	-7,7	-8,1	-7,0	-8,0	-7,8	-8,3	-5,1	-6,8
<u>31</u>	-6,6	-6,6	-7,4	-6,8	-7,0	-6,4	-8,2	-5,9	-7,9	-7,7	-6,4	-7,6	-7,5	-7,7	-7,7	-7,8
<u>32</u>	-7,0	-6,8	-7,0	-7,4	-7,4	-6,8	-7,4	-6,2	-7,7	-7,4	-6,8	-7,7	-7,2	-7,0	-7,5	-7,6
<u>33</u>	-6,5	-6,1	-5,7	-5,7	-6,0	-5,7	-5,9	-5,1	-6,2	-6,9	-5,9	-5,5	-5,8	-6,1	-6,1	-6,2
<u>34</u>	-7,1	-7,1	-7,1	-7,3	-7,4	-7,2	-7,8	-6,3	-7,2	-7,6	-7,1	-7,3	-7,2	-8,2	-7,7	-7,4
<u>35</u>	-5,6	-5,6	-7,7	-7,8	-6,2	-7,2	-9,4	-7,9	-8,7	-8,8	-8,2	-8	-7,8	-7,4	-6,3	-6,3
<u>36</u>	-4,2	-4,1	-4,0	-4,1	-4,2	-4,0	-4,2	-4,0	-4,1	-3,9	-4,0	-3,9	-4,2	-4,3	-4,3	-4,4
<u>37</u>	-6,8	-6,6	-6,3	-6,4	-6,4	-6,3	-6,8	-5,8	-6,3	-6,7	-6,1	-6,0	-6,4	-7,1	-6,9	-6,4
<u>38</u>	-7,2	-6,6	-6,7	-7,1	-7,3	-6,7	-8,2	-6,7	-7,8	-7,7	-6,3	-7,2	-6,8	-7,9	-7,7	-7,6
<u>39</u>	-6,8	-6,4	-5,9	-5,9	-6,2	-5,7	-6,9	-5,7	-6,5	-6,8	-6,1	-5,9	-6,3	-6,6	-7,0	-6,6
<u>40</u>	-6,3	-5,6	-7,2	-7,0	-6,3	-6,6	-8,4	-7,1	-8,4	-8,7	-7,0	-7,5	-7,0	-7,6	-6,4	-7,2
<u>41</u>	-4,5	-4,3	-4,2	-3,9	-4,2	-4,1	-4,5	-4,1	-4,2	-4,1	-4,2	-4,2	-4,2	-4,8	-4,1	-4,2
<u>42</u>	-6,7	-6,7	-6,5	-6,8	-6,6	-6,7	-7,7	-6,6	-7,2	-7,1	-6,9	-6,9	-6,8	-7,3	-7,7	-7,3
<u>43</u>	-7,2	-7,2	-7,2	-7,3	-7,2	-7,4	-7,8	-6,4	-7,0	-7,3	-7,1	-6,9	-7,2	-7,7	-7,3	-7,3
<u>44</u>	-4,5	-4,2	-4,2	-4,3	-4,1	-4,2	-4,3	-4,1	-4,1	-3,9	-4,0	-4,0	-4,3	-4,5	-4,4	-4,5
<u>45</u>	-7,0	-7,0	-6,5	-6,8	-6,9	-6,3	-8,2	-6,4	-7,6	-7,5	-7,0	-6,9	-7,1	-7,9	-7,8	-7,5
<u>46</u>	-6,6	-6,4	-6,5	-6,3	-6,8	-6,8	-7,4	-5,8	-7,3	-7,3	-6,8	-6,8	-6,9	-7,6	-7,7	-7,3
<u>47</u>	-7,4	-7,0	-6,8	-6,8	-6,8	-6,8	-7,5	-6,1	-7,4	-7,3	-6,7	-6,9	-7,2	-7,7	-7,5	-7,6
<u>48</u>	-6,6	-6,4	-5,6	-5,6	-6,0	-5,8	-6,7	-5,5	-6,3	-6,5	-6,0	-5,8	-6,1	-6,6	-6,6	-6,4
<u>49</u>	-7,1	-6,6	-7,0	-6,7	-7,2	-6,6	-7,5	-6,4	-7,5	-7,6	-6,9	-7,0	-7,4	-7,3	-7,7	-7,8
<u>50</u>	-5,2	-6,1	-7,2	-7,3	-5,7	-7,2	-7,8	-7,1	-7,9	8,2	-7,5	-7,6	-7,7	-8,2	-6,7	-7,1
<u>51</u>	-5,9	-6,1	-7,4	-6,9	-6,3	-7,1	-7,7	-7,3	-8,0	-8,4	-7,2	-7,4	-7,9	-7,9	-6,3	-7,2
<u>52</u>	-6,9	-6,9	-6,8	-6,4	-6,6	-6,0	-7,8	-5,8	-7,2	-7,8	-6,7	-7,2	-6,8	-7,4	-7,2	-7,0
<u>53</u>	-7,7	-7,3	-7,2	-7,2	-7,4	-7,4	-7,3	-6,4	-7,3	-7,5	-7,0	-7,4	-7,3	-7,9	-7,4	-7,5
<u>54</u>	-6,7	-6,2	-5,9	-5,8	-6,1	-5,8	-6,5	-5,6	-6,4	-6,7	-6,2	-5,9	-6,1	-6,6	-6,5	-6,2

4.3.2. REZULTATI PROGRAMA VEGA - Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model

S programom VEGA in modelom Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model smo napovedali ali se spojina veže na ER in na ta način napovedali potencialno endokrino toksičnost kot posledico vezave na receptor. Zanesljivosti napovedi je podana v treh stopnjah (visoka, srednja in nizka) s številom obarvanih zvezdic.

Rezultati za preučevana cinamata, EHMC in IAMC, ter pozitivno in negativno kontrolo:

- **Negativna kontrola (timol)** ni aktivna na ER.
- **Pozitivna kontrola (BPA)** je aktivna na ER.
- **EHMC** ni aktiven na ER ob nizki zanesljivosti napovedi.
- **IAMC** ni aktiven na ER ob nizki zanesljivosti napovedi.

Preglednica VI: Rezultati programa VEGA za EHMC, IAMC, pozitivno in negativno kontrolo za napoved endokrine toksičnosti preko ER; legenda: rdeča-spojina je aktivna, zelena-spojina ni aktivna, ●●● visoka zanesljivost (spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ●● srednja zanesljivost (spojina bi se

lahko nahajala izven območja uporabnosti modela), ● nizka zanesljivost (spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela), oznaka E - v bazi modela obstajajo dodatni eksperimentalni podatki.

SPOJINA	REZULTAT
EHMC	●
IAMC	●
TIMOL	●●● E
BPA	●●● E

Rezultat napovedi za metabolite izbranih cinamatov:

Preglednica VII: Rezultati programa za napoved endokrine toksičnosti metabolitov preko ER; legenda: redeča-spojina je aktivna, zelena-spojina ni aktivna, ●●● visoka zanesljivost (spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ●● srednja zanesljivost (spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela), ● nizka zanesljivost (spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela), oznaka E - v bazi modela obstajajo dodatni eksperimentalni podatki.

METABOLITI	REZULTATI
<u>1</u>	●
<u>2</u>	●●
<u>3</u>	●●●
<u>4</u>	● E
<u>5</u>	●
<u>6</u>	●
<u>7</u>	●
<u>8</u>	●●●
<u>9</u>	●
<u>10</u>	●
<u>11</u>	●
<u>12</u>	●●●
<u>13</u>	●
<u>14</u>	●
<u>15</u>	●
<u>16</u>	●●●
<u>17</u>	●
<u>18</u>	●
<u>19</u>	●●●
<u>20</u>	●
<u>21</u>	●
<u>22</u>	●
<u>23</u>	●●●
<u>24</u>	●
<u>25</u>	●
<u>26</u>	●
<u>27</u>	●

METABOLITI	REZULTATI
<u>28</u>	●
<u>29</u>	●
<u>30</u>	●
<u>31</u>	●
<u>32</u>	●
<u>33</u>	●
<u>34</u>	●
<u>35</u>	●
<u>36</u>	●●●
<u>37</u>	● E
<u>38</u>	●
<u>39</u>	●
<u>40</u>	●
<u>41</u>	●●●
<u>42</u>	●
<u>43</u>	●
<u>44</u>	●●●
<u>45</u>	●●
<u>46</u>	●
<u>47</u>	●
<u>48</u>	●
<u>49</u>	●
<u>50</u>	●
<u>51</u>	●
<u>52</u>	●●
<u>53</u>	●
<u>54</u>	●

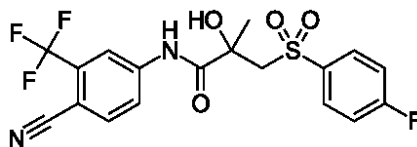
4.3.3. DISKUSIJA VEZAVE NA RECEPTORJE

Vezava na AR

Program je napovedal srednjo verjetnost vezave na AR samo za metabolit **53**, ki ima v svoji strukturi hidroksilno skupino na aromatskem obroču, epoksid in estrsko funkcionalno skupino. Za vse ostale metabolite in tudi oba izbrana cinamata je program napovedal majhno verjetnost vezave. Za oba cinamata in vse metabolite je program napovedal srednjo verjetnost vezave na antagonistično konformacijo AR an, z izjemo metabolita **7**, za katerega je napovedal veliko verjetnost vezave. Ta ima v svoji strukturi metoksi skupino na aromatskem obroču in je hkrati konjugiran z glukuronsko kislino. Med strukturo metabolita **7** in strukturo znanega antagonista AR bicalutamida obstaja le šibka strukturna podobnost, saj obe strukturi vsebujeta benzenov obroč, sta si pa sicer dokaj podobni po velikosti. Struktura bicalutamida ne vsebuje glukuronske kisline, je pa glukuronidacija glavna metabolna pot pri njegovem izločanju. Kakorkoli, metaboliti, konjugirani z glukuronsko kislino, imajo sicer visoko topnost v vodi in se zlahka ter hitro izločijo iz človeškega telesa v žolč ali urin, zato ne predstavljajo nevarnosti, da bi se nalagali v maščobnem tkivu in dalj časa zadržali v telesu (76).



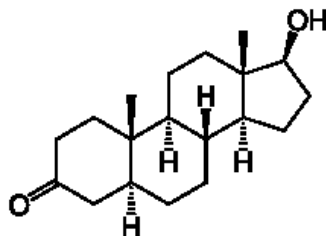
Slika 19: Metabolit **53** s srednjo verjetnostjo vezave na AR in metabolit **7** z veliko verjetnostjo vezave na agonistično konformacijo AR an.



Slika 20: Strukturna formula bicalutamida.

V eni izmed *in vivo* študij so ocenjevali učinke različnih koncentracij EHMC v vodi (5.4, 37.5, 244.5 in 394 µg/L) na izražanje genov, ki so vključeni v hormonske poti v jetrih, testisih in možganih samcev in samic sladkovodnih rib (vrsta debeloglevec). Želeli so

pokazati, da ima EHMC več hormonskih aktivnosti. Opazne spremembe v histologiji gonad so pokazale na motnje zorenja spermijev (znatno bolj zrele spermatide in bistveno manj nezrelih spermatocitov). Profil izražanja genov je pokazal na potencialno antiandrogenu delovanje EHMC, saj je bistveno zavrl ekspresijo AR v jetrih samic pri 37,5 µg/L, kar je v skladu s podatki. Pri samcih sicer niso zaznali antiandrogene aktivnosti (62). V drugi študiji so breje podgane in podgane med laktacijo bile izpostavljene 0, 500, 750 ali 1000 mg EHMC/kg/tt/dan. Merili so koncentracije serumskega tiroksina (T4), testosterona, estradiola in progesterona v brejih podganah in potomcih. V 16. dnevu so pri moških potomcih zaznali znižanje ravni testosterona in mase testisov, pri samicah pa so se pokazale izboljšane sposobnosti prostorskega učenja. V osmem mesecu starosti se je količina sperme zmanjšala pri vseh skupinah, v skupini z največjo izpostavljenostjo pa se je zmanjšala tudi masa prostate. Ti rezultati kažejo na to, da izpostavljenost EHMC v perinatalnem obdobju lahko vpliva na reprodukcijski in nevrološki razvoj podgan, kar je lahko vzrok za zaskrbljenost (63). V nekaterih študijah so omenjeni derivati cinamatov delovali kot antagonisti AR, saj so zavrl aktivnost 4,5-dihidrotosterona in zmanjšali maso prostate in testisov pri podganah (64). Raziskav *in vitro* vezave spojin na AR receptor je sicer bolj malo, saj se večina študij osredotoča na vezavo na ER in TR.



Slika 21: Strukturna formula endogenega agonista AR 4,5-dihidrotosterona.

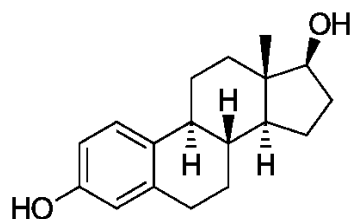
Vezava na ER

Program Endocrine Disruptome je za vse metabolite in oba cinamata napovedal majhno verjetnost vezave na ER α , ER α an, ER β in tudi ER β an. Program VEGA je podal podobno napoved, in sicer neaktivnost vezave na ER za vse metabolite in oba cinamata, vendar z različno zanesljivostjo. Z največjo zanesljivostjo je program napovedal neaktivnost za metabolite 3, 8, 12, 16, 19, 23, 36, 41 in 44, ki imajo v svoji strukturi hidroksilno in karboksilno skupino. Metabolita 8 in 41 nastaneta z oksidacijo primarnih alkoholov, medtem ko vsi ostali nastanejo s hidrolizo acikličnih karboksilnih estrov. Glede na to, da se

napoved s tem programom za več kot polovico metabolitov nahaja izven območja uporabnosti modela, jo lahko smatramo za nezanesljivo.

Nekatere *in vitro* študije so pokazale, da ima EHMC estrogeno delovanje, saj je preko ER receptorja okrepil delitev rakavih celic dojke in aktiviral transkripcijo v človeških celičnih linijah preko ER receptorja. V študijah ekotoksičnosti je EHMC povečal proizvodnjo vitelogenina (VTG) v ribah, ki velja za klasičen označevalec estrogenih učinkov. V več študijah je izpostavljenost EHMC pri podganah povzročila povišanje telesne mase na račun povečane mase maternice. Ti rezultati kažejo na estrogeno delovanje, saj ima estradiol podobne učinke na maso maternice. V *in vivo* testu na podganah samicah, ki so dnevno prejemale 52,47 ali 278,87 mg EHMC, je prišlo do povišane koncentracije LH v serumu (iz 12,5 ng/ml pri nižjem odmerku na 17 ng/ml in pri višjem na 19 ng/ml) in neregulirano izražanje ER β , kar so učinki nasprotni tistim, ki so jih opazili pri estradiolu. Tako se zdi, da ima EHMC tako estrogeno kot tudi od estrogenov neodvisno delovanje (63, 65). V *in vivo* študiji so ocenjevali učinke različnih koncentracij EHMC v vodi (5.4, 37.5, 244.5 in 394 μ g/L) na izražanje genov, ki so vključeni v hormonske poti v jetrih, testisih in možganih samcev in samic sladkovodnih rib (vrsta debeloglavec). Želeli so pokazati, da ima EHMC več hormonskih aktivnosti. Primerjali so profil transkripcije z vsebnostjo plazemskega proteina VTG, sekundarne spolne karakteristike in histologijo gonad. Indukcija VTG in spremembe v histologiji testisov so pokazale na estrogeno aktivnost EHMC (62). Na drugi stani pa je profil izražanja genov pokazal tako antiestrogeno kot tudi estrogeno delovanje, saj 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza zniža ekspresijo estrogenskega receptorja ER α . EHMC zniža izražanje mRNA 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaze. V študiji so namreč zaznali znižano transkripcijo tega encima v jetrih rib, kar je privedlo do neravnovesja steroidnih hormonov in posledično do vpliva na reprodukcijo rib. Izpostavljenost EHMC v koncentraciji 394 μ g/L je privedla do znatnega znižanja izražanja ER α v jetrih (62). O potencialnih estrogenih učinkih derivatov cinamatov so poročali še v nekaterih *in vivo* in *in vitro* študijah, saj se je povečala teža maternice podgan v odvisnosti od odmerka (66, 67). V *in vivo* testu na ribah so ugotovili, da IAMC in EHMC lahko popolnoma inhibirata delovanje 17 β -estradiola pri najvišji testirani koncentraciji, saj po vsej verjetnosti blokirata vezavo 17 β -estradiola na ER α in domnevajo, da se lahko vežeta s primerljivo afiniteto na sekundarno vezavno mesto receptorja in povzročita konformacijsko spremembo (68). Za EHMC so z uporabo različnih celičnih linij HELN (celična linija pridobljena iz HeLa celic), HELN ER α in HELN ER β (HELN celične linije, ki izražajo ER α in ER β) ugotovili,

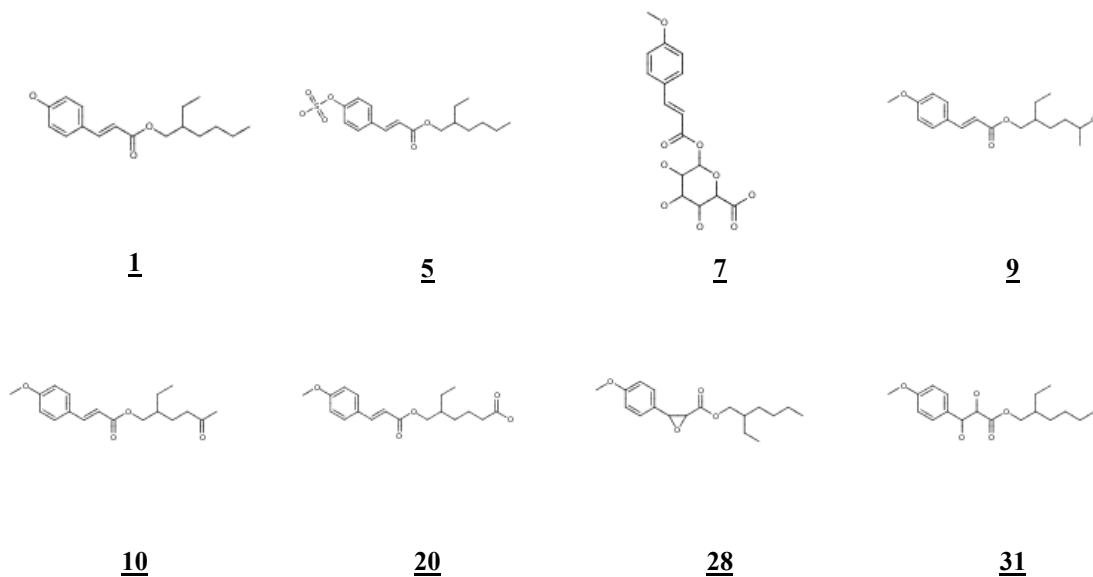
da aktivira ER α bolj učinkovito kot ER β , torej deluje v tem primeru agonistično (69). EHMC je v skladu z biološkim testom, ki se izvaja na HEK293 celicah, aktiviral ER α , ni pa aktiviral transkripcije ER β (68). Izpostavljenost EHMC je pokazala šibek estrogeni učinek na maternici in vagini podganjih samic (70). Čeprav je program Endocrine disruptome napovedal majhno vezavno verjetnost za oba cinamata in vse metabolite, obstaja možnost, da so nekateri od njih šibki ligandi za ER α ali ER β , glede na rezultate do sedaj narejenih *in vitro* in *in vivo* študij.



Slika 22: Strukturna formula endogenega agonista ER 17 β -estradiola (E2).

Vezava na TR α in TR β

Program je na TR α napovedal srednjo vezavno verjetnost za metabolite (1, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 31, 32, 34, 38, 42, 43, 45, 46, 47, 49 in 53), ki imajo v svoji strukturi prisotno metoksi skupino, estrsko skupino, hidroksilno skupino na aromatu in hidroksilno skupino (na koncu verige), ketonsko skupino, karboksilno skupino, epoksid, glukuronsko kislino, vicinani diol in sulfonsko skupino. Srednjo vezavno verjetnost je napovedal tudi za oba cinamata. Za vse ostale metabolite je program napovedal majhno vezavno verjetnost. Program je na TR β napovedal srednjo vezavno verjetnost za metabolite, ki imajo v svoji strukturi prisotno metoksi skupino, estrsko skupino, hidroksilno skupino na aromatu in hidroksilno skupino (na koncu verige), ketonsko skupino, karboksilno skupino in epoksid. Srednjo vezavno verjetnost je napovedal tudi za EHMC. Iz struktur na Sliki 22 lahko vidimo, da je cinamatni fragment sicer skupen vsem spojinam, za katere je program napovedal možnost vezave na TR α in TR β . Ker pa je ta prisoten, praktično v vseh spojinah, ga težko smatramo kot predmet diskriminacije.

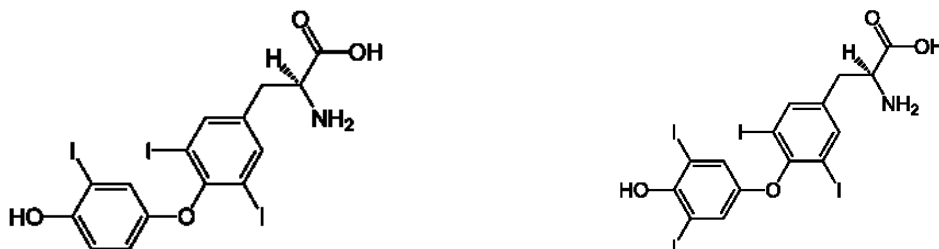


Slika 23: Primeri metabolitov, ki se vežejo na receptor TR α ali TR β s srednjo vezavno verjetnostjo.

Cilj ene izmed študij, ki smo jo omenjali že pri vezavi na AR, je bil ugotoviti potencialne učinke EHMC na endokrini sistem in ugotoviti, kako EHMC z vplivom na raven tiroidnega hormona vpliva na nevrološki razvoj mladičev. Breje podgane in podgane med dojenjem so izpostavili 0, 500, 750 ali 1000 mg EHMC/kg/tt/dan. Merili so koncentracije serumskega T4, testosterona, estradiola in progesterona v brejih podganah in potomcih. Nivo T4 se je tekom tretiranja izrazito zmanjšal v vseh brejih podganah, vendar so bili potomci manj prizadeti. Opazili so vedenjske spremembe, vendar verjetno niso bile povezane s pomanjkanjem T4, saj so bile te drugačne, kot v že narejenih študijah, kjer so opazovali vedenjske spremembe kot posledica zmanjšanja T4. Rezultati kažejo na to, da izpostavljenost EHMC v perinatalnem obdobju lahko vpliva na reproduktivni in nevrološki razvoj podgan, kar je lahko vzrok za zaskrbljenost (63).

Po peroralni izpostavljenosti 2,5 in 12,5 g/kg/tt EHMC za obdobje 12 tednov je pri podganjih samicah prišlo do inhibicije encima 5'-deiodinaze, ki pretvori T4 v T3 (trijodtironin) v jetrih, tako pri nižjem kot tudi pri višjem odmerku (71, 72). V drugi študiji so podgane prav tako peroralno prejemale EHMC, in sicer je bila najnižja koncentracija 10 mg in najvišja 1000 mg/kg/tt. Ugotovili so, da je prišlo do koncentracijsko odvisnega znižanja serumskih koncentracij THS, T4 ali T3 pri podganah v odvisnosti od izpostavljenosti EHMC (73). V tretji študiji so podgane EHMC per os v enakih koncentracijah kot pri prejšnji študiji ali pa 0,6 mg/kg/tt estradiola 5 dni zapored. Estradiol ni vplival na koncentracije serumskega THS, T4 in T3. Nasprotno pa so EHMC povezali s 50-60% znižanjem serumskega THS (pri 333 mg in več), 25-40% znižanjem T4 (pri 333

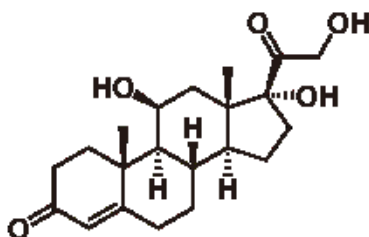
mg in več) in 30% znižanjem T3 (pri 1000 mg). Ker EHMC ni posnemal učinkov estradiola, so ga označili kot neestrogenega. Poleg tega EHMC ni vplival na ekspresijo gena za protirotropin (proTRH), hkrati ni vplival niti na končne točke povezane s proizvodnjo tiroidnega hormona preko delovanja na NIS (natrijev/jodidni kotransporter) ali vpliva na aktivnost TPO (74).



Slika 24: Strukturna formula endogenih ligandov TR trijodtironina (T3) in tiroksina (T4).

Vezava na GR

Program je na receptor GR napovedal srednjo verjetnost vezave za metabolite, ki imajo v svoji strukturi hidroksilno skupino na aromatu, estrsko skupino, glukuronsko kislino, sulfonsko kislino, metoksi skupino na aromatu, hidroksilno, ketonsko, karboksilno skupino, epoksid, glutation in vicinalni diol. Srednjo verjetnost vezave je napovedal tudi za IAMC. Za vse ostale metabolite in EHMC je program napovedal majhno verjetnost vezave na receptor GR. Vpliv vezave na omenjen receptor je za oba cinamata in njune metabolite manj raziskan.



Slika 25: Strukturna formula endogenega liganda GR kortizola.

Vezava na GR α , LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ in RXR α

Program Endocrine Disruptome je na vse te receptorje napovedal majhno vezavno verjetnost za vse metabolite in oba cinamata. Vpliv vezave na omenjene receptorje je za oba cinamata in njune metabolite manj raziskan.

4.4. REPRODUKCIJSKA TOKSIČNOST

Različne vidike reprodukcijske toksičnosti izbranih cinamatov in njihovih metabolitov smo napovedali s pomočjo programov Derek Nexus, VEGA in TEST.

4.4.1. REZULTATI PROGRAMA VEGA - Developmental Toxicity model

S programom VEGA in modelom Developmental Toxicity model (CEASAR) 2.1.7 smo napovedali razvojno toksičnost. Rezultati so podani kot prisotnost ali odsotnost toksičnih učinkov spojin, podana pa je tudi zanesljivost napovedi v treh stopnjah (visoka, srednja in nizka) s številom obarvanih zvezdic.

- Za **EHMC** je program napovedal toksičnost s srednjo zanesljivostjo napovedi in za **IAMC** odsotnost toksičnosti, vendar je napoved izven območja uporabnosti modela. Program je za **negativno kontrolo (timol)** in **pozitivno kontrolo (BPA)** napovedal toksičnost z visoko zanesljivostjo napovedi.
- Program je za metabolite **2**, **3**, **18**, **19**, **34**, **35**, **36**, **41**, **44**, **46** in **47** napovedal toksičnost z visoko zanesljivostjo napovedi. Reprezentativni primeri metabolitov so 2-EH (**3**), 3-metilbutanojska kislina (**41**), izoamil hidrokscinamat (**34**) in njegov glukuronid (**35**).
- Program je za metabolita **30** in **51**, ki vsebujeta v svoji strukturi metoksi skupino na *para* mestu aromatskega obroča in sta konjugirani z glutationom, napovedal odsotnost toksičnosti z visoko zanesljivostjo napovedi.
- Program je za vse ostale metabolite napovedal toksičnost oziroma odsotnost toksičnosti izven območja uporabnosti modela ali se lahko nahajajo izven območja uporabnosti modela, zato so rezultati nezanesljivi.

4.4.2. REZULTATI PROGRAMA VEGA - Developmental/Reproductive Toxicity model

S programom VEGA in modelom Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0 smo napovedali razvojno in reprodukcijsko toksičnost. Rezultati so podani kot prisotnost ali odsotnost toksičnosti spojin, podana pa je tudi zanesljivost napovedi v treh stopnjah (visoka, srednja in nizka) s številom obarvanih zvezdic.

- Program je za **negativno kontrolo (timol)** napovedal toksičnost z visoko zanesljivostjo napovedi. Za **pozitivno kontrolo (BPA)**, **EHMC** in **IAMC** je program napovedal odsotnost toksičnosti, vendar se napoved nahaja izven območja uporabnosti modela.

- Program je za metabolita **3** (2-etilheksanol) in **8** (2-etilheksanojska kislina) napovedal toksičnost z visoko zanesljivostjo napovedi.
- Za vse ostale metabolite je program napovedal odsotnost toksičnosti, vendar izven območja uporabnosti modela, zato so ti rezultati nezanesljivi.

4.4.3. REZULTATI PROGRAMA TEST

S programom test smo napovedali razvojno toksičnost, pri čemer so rezultati podani v obliki številčnih vrednosti. Vrednosti pod 0,50 predstavljajo razvojno ne-toksično spojino, rezultati nad 0,50 pa predstavljajo razvojno toksično spojino.

- Program je ovrednotil **negativno kontrolo (timol)** z vrednostjo 0,99; **pozitivno kontrolo (BPA)** z vrednostjo 0,68.
- **IAMC** je program ovrednotil z vrednostjo 0,61 kot razvojno toksično. **EHMC** je program ovrednotil kot razvojno netoksično spojino z vrednostjo 0,36.
- Program je kot razvojno netoksične ovrednotil metabolite **7**, **29**, **30**, **32**, **40**, **50** in **51**, ki v svoji strukturi vsebujejo hidroksilno, metoksi, glukuronsko, epoksidno skupino ali glutation. Vse ostale metabolite pa je program ovrednotil kot razvojno toksične.

4.4.4. REZULTATI PROGRAMA DEREK NEXUS

S programom Derek Nexus smo napovedali razvojno toksičnost, teratogenost in testikularno toksičnost. Za posamezno toksičnost je podal 3 stopnje verjetnosti (probable-verjetno, plausible-možno ali equivocal-dvoumno).

- Program je za **pozitivno kontrolo (BPA)** izdal opozorilo o testikularni toksičnosti s stopnjo verjetnosti *dvoumno*. Za **negativno kontrolo (timol)** program ni izdal nobenih opozoril.
- Program za **EHMC** in **IAMC** ni izdal nobenih opozoril.
- Program je za metabolit **3** izdal opozorilo o teratogenosti s stopnjo verjetnosti *verjetno*. V svoji strukturi vsebuje alkilni alkohol in kratkoverižno karboksilno kislino ali njen prekursor.
- Program je za metabolita **8** in **19**, ki imata v svoji strukturi kratko verižno karboksilno kislino ali njen prekursor, izdal opozorilo o teratogenosti. Za metabolit **8** je napovedal stopnjo verjetnosti *verjetno* in za metabolit **19** *možno*.
- Program je za metabolit **36**, ki v svoji strukturi vsebuje alkilni alkohol, izdal opozorilo o teratogenosti s stopnjo verjetnosti *možno*.

- Program je za metabolite **28**, **32**, **33**, **49**, **53** in **54**, ki imajo v svoji strukturi epoksidni obroč, izdal opozorilo o razvojni toksičnosti s stopnjo verjetnosti *možno*.
- Za vse ostale metabolite program ni izdal opozoril.

Preglednica VIII: Rezultati programa Derek Nexus, VEGA in TEST za napoved različnih vidikov reprodukcijske toksičnosti EHMC, IAMC ter pozitivne in negativne kontrole; legenda: rdeča-spojina je toksična, zelena-spojina ni toksična, ●●● visoka zanesljivost (spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ●● srednja zanesljivost (spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela), ● nizka zanesljivost (spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela), negativni znak (-) – ni podanega opozorila o reproduktivni toksičnosti.

SPOJINA	DEREK NEXUS	VEGA - Developmental Toxicity model (CEASAR) 2.1.7	VEGA - Developmental/Reproductive Toxicity model (PG) 1.0.0	TEST
EHMC	-	●●	●	0,36
IAMC	-	●	●	0,61
TIMOL	-	●●●	●	0,99
BPA	dvoumna toksikularna toksičnost	●●●	●●●	0,68

Preglednica IX: Rezultati programa Derek Nexus, VEGA in TEST za napoved različnih vidikov reprodukcijske toksičnosti metabolitov; legenda: rdeča - spojina je toksična, zelena - spojina ni toksična, ●●● visoka zanesljivost (spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela), ●● srednja zanesljivost (spojina bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti modela), ● nizka zanesljivost (spojina se nahaja izven območja uporabnosti modela), negativni znak (-) – ni podanega opozorila o reproduktivni toksičnosti, oznaka E - v bazi modela obstajajo dodatni eksperimentalni podatki.

METABOLIT	DEREK NEXUS	VEGA - Developmental Toxicity model (CEASAR) 2.1.7	VEGA - Developmental/Reproductive Toxicity model (PG) 1.0.0	TEST
<u>1</u>	-	●	●	0,75
<u>2</u>	-	●●●	●	0,58
<u>3</u>	verjetna teratogenost	●●●	●●● E	0,97
<u>4</u>	-	●	●	0,59
<u>5</u>	-	●	●	1,13
<u>6</u>	-	●	●	0,76
<u>7</u>	-	●●	●	0,47
<u>8</u>	verjetna teratogenost	●	●●● E	0,95
<u>9</u>	-	●	●	0,76
<u>10</u>	-	●	●	0,62
<u>11</u>	-	●●	●	0,65
<u>12</u>	-	●●●	●	0,75
<u>13</u>	-	●●	●	0,81
<u>14</u>	-	●●	●	0,7
<u>15</u>	-	●●	●	0,67

<u>16</u>	-	•	•	0,85
<u>17</u>	-	••	•	0,77
<u>18</u>	-	••	•	0,81
<u>19</u>	možna teratogenost	•••	•	0,77
<u>20</u>	-	•	•	0,77
<u>21</u>	-	••	•	0,88
<u>22</u>	-	•	•	0,76
<u>23</u>	-	•	•	0,78
<u>24</u>	-	•	•	0,78
<u>25</u>	-	•	•	0,51
<u>26</u>	-	•	•	0,53
<u>27</u>	-	•	•	0,83
<u>28</u>	možna razvojna toksičnost	•	•	0,67
<u>29</u>	-	•	•	0,08
<u>30</u>	-	•••	•	0,14
<u>31</u>	-	•	•	0,65
<u>32</u>	možna razvojna toksičnost	•	•	0,33
<u>33</u>	možna razvojna toksičnost	•	•	0,88
<u>34</u>	-	•••	•	0,59
<u>35</u>	-	•••	•	0,62
<u>36</u>	možna teratogenost	•••	•	0,88
<u>37</u>	-	•	•	0,59
<u>38</u>	-	•	•	1,08
<u>39</u>	-	•	•	0,76
<u>40</u>	-	••	•	0,47
<u>41</u>	-	•••	•	0,88
<u>42</u>	-	•	•	0,78
<u>43</u>	-	••	•	0,66
<u>44</u>	-	•••	•	1
<u>45</u>	-	•	•	0,75
<u>46</u>	-	•••	•	0,59
<u>47</u>	-	•••	•	0,55
<u>48</u>	-	•	•	0,83
<u>49</u>	možna razvojna toksičnost	•	•	0,79
<u>50</u>	-	•	•	0,23
<u>51</u>	-	•••	•	0,4
<u>52</u>	-	••	•	0,81
<u>53</u>	možna razvojna toksičnost	•	•	0,58
<u>54</u>	možna razvojna toksičnost	•	•	0,88

4.4.5. DISKUSIJA

Rezultati programov s katerimi smo napovedali razvojno in reprodukcijsko toksičnost so bili precej neenotni. Poleg tega sta kar dva programa z veliko zanesljivostjo napovedala toksičnost za negativno kontrolo timol, zato je njuna zanesljivost napovedi vprašljiva. V tem primeru pa je lahko vprašljiva tudi ustreznost izbora timola kot negativne kontrole, zato smo bolj podrobno raziskali toksikološki profil timola, s poudarkom na toksičnosti za reprodukcijo. V eni izmed študij so podgane peroralno prejemale različno visoke odmerke timola (0, 8, 40, 200 mg na kg/tt/dan). Timol ni imel vpliva na reprodukcijske parametre, kot so paritveni indeks, indeks plodnosti, obnašanje ploda ali obnašanje matere in podobno. Tekom študije niso opazili očitnih razlik v številu potomcev in številu živih potomcev. Prav tako niso opazili nobenih sprememb pri zunanjem pregledu potomcev, ki bi jih lahko povezali s timolom. Opazili pa so nekoliko nižjo telesno težo potomcev pri odmerku 200 mg. Na podlagi teh rezultatov so prišli do zaključka, da je timol reprodukcijsko netoksičen do odmerka 200 mg in določili NOAEL 200 mg na kg/tt. Torej timol pri visokih odmerkih vseeno lahko predstavlja nevarnost za reprodukcijo (77). V podatkovni bazi VEGA se napoved o toksičnosti izvede na osnovi primerjanja s podobnimi strukturami v podatkovni bazi. Zato je program izbrano negativno kontrolo timol napovedal kot toksično, in sicer najverjetneje zaradi prisotnosti aromatskega obroča in fenolne skupine, ki sta pogosto prisotna v razvojno ali reprodukcijsko toksičnih spojinah v bazi podatkov. Enako velja za program TEST. Kot kažejo podatki iz literature je timol splošno priznan kot varna snov, saj ima status GRAS, zato je na podlagi dobljenih podatkov potrebna strokovna presoja pri uporabi programov (46).

Pri napovedi toksičnosti za metabolit **2-EH** se nekateri podatki bolje ujemajo, zato velja za bolj zanesljivo. Vsi programi so z veliko zanesljivostjo napovedali njegovo toksičnost, medtem ko so njegovo potencialno razvojno in reprodukcijsko toksičnost omenjali že v *in vitro* raziskavi na mišjih podganjih in človeških hepatocitih (23). 2-EH so ocenili kot razvojno toksičnega v *in vivo* testu na živalih, kjer so breje miši izpostavili tej spojini, kar je povzročilo smrt pri 30% brejih samicah. Opazili so zmanjšano velikost legel in število preživetih mladičev. Tudi teža mladičev je bila nižja (33).

Poleg tega so potencialno toksičnost omenjali tudi v *in vivo* študiji metabolizma EHMC za metabolit **2-EHA**, vendar so računalniški programi pri napovedi dokaj neenotni (23). Program VEGA – Developmental Toxicity model (CEASAR) 2.1.7 je napovedal odsotnost toksičnosti izven območja uporabnosti modela, vsi ostali programi pa so z veliko

zanesljivostjo napovedali toksičnost. *In vivo* so razvojno toksičnost 2-EHA preučevali pri brejih podganah, ki so jih izpostavili odmerkom 100, 300 ali 600 mg 2-EHA kg/tt/dan preko pitne vode za obdobje 6-19 dni. 2-EHA je bil nekoliko toksičen pri brejih samicah pri odmerku 600 mg kg/tt/dan, pri nižjih odmerkih pa je bila toksičnost majhna. Telesna masa se je pri tem odmerku v bližnji prihodnosti znižala za 11%. Pri tem odmerku se je telesna masa znižala tudi pri mladičih za 8-5% tako pri moškem in ženskem spolu. Pri vseh odmerkih so opazili malformacije skeleta, medtem ko je bil razvoj visceralnih tkiv manj prizadet. Število prizadetih mladičev se je povečalo v odvisnosti od odmerka. Ti rezultati kažejo, da je 2-EHA teratogena spojina pri podganah že pri odmerkih, ki še niso toksični za mater (75).

V *in vivo* raziskavi sta dve zaporedni generaciji podgan prejemale EHMC s prehrano v odmerkih 0, 150, 450 ali 1000 mg kg/tt/dan. EHMC ni imel vpliva na parjenje, zasnovo, plod, parametre spermijev, parametre foliklov, makropatologijo in histopatologijo spolnih organov. Pri potomcih podgan, ki so prejemale visok odmerek je prišlo do zapoznelega spolnega zorenja in zmanjšanja mase organov. Iz podatkov so izračunali vrednost NOAEL (brez opaznega škodljivega učinka) 450 mg EHMC kg/tt/dan za reprodukcijsko in razvojno toksičnost (17). V drugi raziskavi so 20 zajkljam dozirali 0, 80, 200 in 500 mg EHMC na kg/tt/dan v obdobju organogeneze. Pri najvišjih odmerkih je prišlo do zmanjšanja mase matere in ploda, ostalih očitnih sprememb ni bilo (14). Torej bi na podlagi *in vivo* raziskav lahko sklepali o morebitni razvojni in reprodukcijski toksičnosti EHMC. Na podlagi *in silico* rezultatov, ki smo jih dobili o tej spojini težko sklepamo o toksičnosti, saj so podatki neenotni in se nahajajo izven območja uporabnosti modela. Iz študij na živalih so za teratogeno aktivnost izračunali vrednost NOAEL 500 mg na kg/tt/dan (največji testiran odmerek). Na podlagi pridobljene NOAEL vrednosti so izračunali tudi MoS 750 kar je sprejemljivo. Za izračun MoS do uporabili NOAEL vrednost 450 mg na kg/tt/dan, ki so jo dobili so 13 tedenski oralni študiji na podganah. Leta 1997 so podali tudi poročilo o IAMC, kjer so zaključili, da ima IAMC nizko subkronično toksičnost, testi teratogenosti pa so bili negativni (14).

Glede na neenotnost dobljenih rezultatov se na *in silico* metode za napovedi razvojne in reprodukcijske toksičnosti še ne moremo zanesti, lahko pa njihove napovedi uporabimo kot iztočnice za nadaljnje raziskave. V prihodnje bo potreben še precejšen napredek v razvoju teh *in silico* metod.

5. SKLEPI

- Z računalniškim programom Meteor Nexus smo napovedali nekatere metabolite izbranih cinamatov, ki so jih identificirali tudi v *in vitro* in *in vivo* raziskavah. Kljub temu, pa so v raziskavah zaznali metabolite, ki jih naš program ni napovedal. Kot najbolj verjetni metaboliti, ki smo jih dobili tudi v naši raziskavi, so se izkazali metaboliti 3, 4, 8 in 6. Metabolit 7 je program napovedal z možno stopnjo verjetnosti.
- Pri pregledu rezultatov smo opazili, da imajo nekateri metaboliti lahko tudi močnejšo (bolj izraženo) endokrino aktivnost kot izhodna spojina. V naši raziskavi je najmočnejše napovedano antagonistično delovanje na AR izkazal metabolit 7. Obstojećih rezultatov študij o potencialnem estrogenem delovanju IAMC in EHMC z našo *in silico* raziskavo nismo potrdili, saj so vsi metaboliti in tudi oba izvorna cinamata pokazali neaktivnost. Rezultate napovedi vezave na TR lahko potrdimo z obstoječimi študijami, saj je program napovedal srednjo vezavno verjetnost. Vezava cinamatov na ostale jedrne receptorje je manj raziskana. Potrebne so raziskave predvsem v smeri proučevanja možnosti vezave teh spojin na GR, še sploh za nekatere metabolite in IAMC, saj jim je program napovedal srednjo verjetnost vezave.
- *In silico* metode za napoved reprodukcijske in razvojne toksičnosti so se za izbrane cinamate in njune metabolite izkazale kot razmeroma nezanesljive. Njihove napovedi pa vseeno lahko uporabimo kot iztočnice za prioritizacijo nadaljnjih raziskav ali pa za hiter pregled velike količine podatkov. Potrebna bodo nadgradnje podatkovnih baz, saj bodo s tem rezultati lahko bolj zanesljivi.

6. VIRI IN LITERATURA

1. Meng, X.; Ma, Q.; Bai, H.; Wang, Z.; Han, C.; Wang, C. Simultaneous separation and determination of 15 organic UV filters in sunscreen cosmetics by HPLC–ESI-MS/MS. *International Journal of Cosmetic Science* 2017; 39: 386–392.
2. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. Novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih, Člen 2.
3. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. Novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih, Annex VI.
4. Serpone, N.; Dondi, D.; Albini, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta* 2007; 360: 794–802.
5. Reinau, D.; Osterwalder, U.; Stockfleth, E.; Surber, C. The meaning and implication of sun protection factor. *British Journal of Dermatology* 2015; 173: 1327–1347.
6. Gomez-Berrada, M.P.; Ficheux, A.S.; Rakotomalala, S.; Roudot, A.C.; Ferret, P.J. Probabilistic exposure assessment of sun care products. *Food and Chemical Toxicology* 2017; 108: 314-325.
7. Miranda, M.S.; Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J.C.G. UV filter 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate: a structure, energetic and UV–vis spectral analysis based on density functional theory. *Jurnal of physical organic chemistry* 2014; 27: 47–56.
8. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21630#section=Interactions> (dostop: 20.3.2018)
9. Gackowska, A.; Studziński, W.; Kudlek, E.; Dudziak, M.; Gaca, J. Estimation of physicochemical properties of 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC) degradation products and their toxicological evaluation: *Environmental Science and Pollution Research* 2018; 16: 16037-16049.
10. <http://dermaproved.com/active-ingredients/amiloxate> (dostop: marec 2018)
11. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1266578.html> (dostop: marec 2018).
12. Wang, S.Q.; Lim, H.W. Current status of the sunscreen regulation in the United States: 2011 Food and Drug Administration’s final rule on labeling and effectiveness testing. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2011; 65 (4): 863-869.

13. Janjua, N.R.; Kongshoj, B.; Andersson, A.M.; Wulf, H.C. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2008; 22 (4): 456-61.
14. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/scc_o_9.pdf (dostop: julij 2018)
15. Ruszkiewicz, J.A.; Pinkas, A.; Ferrer, B.; Peres, T.V.; Tsatsakis, A.; Aschner, M. Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. *Toxicology Reports* 2017; 4: 245–259.
16. <https://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2015/10/978-87-93352-82-7.pdf> (dostop: avgust 2018)
17. Schneider, S.; Deckardt, K.; Hellwig, J.; Kuttler, K.; Mellert, W.; Schulte, S.; van Ravenzwaay, B. Octyl methoxycinnamate: Two generation reproduction toxicity in Wistar rats by dietary administration. *Food and Chemical Toxicology* 2005; 43: 1083–1092.
18. Golmohammadzadeh, S.; Jaafarixx, MR.; Khalili, N. Evaluation of liposomal and conventional formulations of octyl methoxycinnamate on human percutaneous absorption using the stripping method. *International Journal of Cosmetic Science* 2008; 59 (5): 385-98.
19. Poiger, T.; Buser, H.R.; Balmer, M.E.; Bergqvist, P.A.; Müller, M.D. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 2004; 55(7): 951-63.
20. Díaz-Cruz, M.S.; Gago-Ferrero, P.; Llorca, M.; Barceló, D. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 402: 2325–2333.
21. Stein, H.V.; Berg, C.J.; Maung, J.N.; O'Connor, L.E.; Pagano, A.E.; MacManus-Spencer, L.A.; Paulick, M.G. Photolysis and cellular toxicities of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate and its photoproducts. *Environmental Science: Processes & Impacts* 2017; 19: 851.
22. Hass, U.; Christiansen, S.; Axelstad, M.; Boberg, J.; Andersson, A.M.; Skakkebaek, N.E.; Bay, K.; Holbech, H.; Kinnberg, K.L.; Bjerregaard, P. (2012). Evaluation of 22 SIN List 2.0 substances according to the Danish proposal on criteria for endocrine disruptors. Danish Centre on Endocrine Disruptors.

23. Fennell, T.R.; Mathews, J.M.; Snyder, R.W.; Hong, Y.; Watson, S.L.; Black, S.R.; McIntyre, B.S.; Waidyanatha, S. Metabolism and Disposition of 2-Ethylhexyl-pmethoxycinnamate Following Oral Gavage and Dermal Exposure in Harlan Sprague Dawley Rats and B6C3F1/N Mice and in Hepatocytes in vitro: *Xenobiotica* 2017; 23: 1-15.
24. <http://www.physiologyinfo.org/mm/What-is-Physiology> (dostop: marec 2018)
25. <http://www.physiologyinfo.org/mm/What-is-Physiology/Endocrine> (dostop: marec 2018)
26. <http://www.physiologyinfo.org/mm/What-is-Physiology/Endocrine/How-the-Endocrine-System-Works.html> (dostop: marec 2018)
27. <http://www.physiologyinfo.org/mm/What-is-Physiology/Endocrine/Parts-of-the-Endocrine-System.html> (dostop: marec 2018)
28. Bolander, F.F. *Molecular Endocrinology*. Third edition, Amsterdam, 2004: 104.
29. <http://endocrinedisruptome.ki.si/receptors.html> (dostop: april 2018)
30. Gore A.C. *Endocrine-disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice (Contemporary endocrinology)*, New Jearsy, 2007: 3-6.
31. <https://www.hormone.org/hormones-and-health/endocrine-disrupting-chemicals> (dostop: marec 2018)
32. Gerhard Vogel, H.; Maas, J.; Mayer, D.; Hock, F.J. *Drug Discovery and Evaluation. Safety and Pharmacokinetic Assays*. Germany, 2006: 801.
33. Hardin, B.D.; Schuler, R.L.; Burg, J.R.; Booth, G.M.; Hazelden, K.P.; MacKenzie, K.M.; Piccirillo, V.J.; Smith, K.N. Evaluation of 60 chemicals in a preliminary developmental toxicity test. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 1987; 7(1): 29-48.
34. Gupta, Ramesh C. *Reproductive and Developmental Toxicology*. London, 2011: 3.
35. Valerio, L.G. *Encyclopedia of Toxicology*. Third Edition, 2014: 1026-1029.
36. Adler, S.; Basketter, D.; Creton, S.; Pelkonen, O.; van Benthem, J.; Zuang, V.; Ejner Andersen, K.; Angers-Loustau, A.; Aptula, A.; Bal-Price, A.; Benfenati, E.; et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects—2010. *Archives of Toxicology* 2011; 85: 367–485.

37. Puzyn, T.; Leszczynski, J.; Cronin, R. Recent Advances in QSAR Studies. Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics, Dordrecht, 2010: 283-304.
38. Roncaglioni, A.; Toropov, A.A.; Toropova, A.P.; Benfenati, E. In silico methods to predict drug toxicity. Current Opinion in Pharmacology 2013; 13: 802–806.
39. Madden, J.C.; Webb, S.; Enoch, S.J.; Colley, H.E.; Murdoch, C.; Shipley, R.; Sharma, P., Yang, C.; Cronin, M.T.D. In silico prediction of skin metabolism and its implication in toxicity assessment. Computational Toxicology 2017; 3: 44–57.
40. Vuorinen, A.; Odermatt, A.; Schuster, D. Reprint of “In silico methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals”. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2015; 153: 93–101.
41. Ruiz, P.; Sack, A.; Wampole, M., Bobst, S.; Vracko, M. Integration of in silico methods and computational systems biology to explore endocrine-disrupting chemical binding with nuclear hormone receptors. Chemosphere 2017; 178: 99-109.
42. Marzosa, M.; Kulkarni, S.; Manganaro, A.; Roncaglioni, A.; Wuc, S.; Barton-Maclaren, T.S.; Lester, C.; Benfenati, E. Integrating in silico models to enhance predictivity for developmental toxicity. Toxicology 2016; 370: 127–137.
43. Liang, D.; Li, F.; Fu, Y.; Cao, Y.; Song, X.; Wang, T.; Wang, W.; Guo, M.; Zhou, E.; Li, D.; Yang, Z.; Zhang, N. Thymol inhibits LPS-stimulated inflammatory response via down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in mouse mammary epithelial cells. Inflammation 2014; 37 (1): 214-22.
44. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thymol#section=Toxicity> (dostop: junij 2018)
45. Lewis, R.J.; Wiley, J. Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 15th ed. New York, 2007.
46. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-080402_1-Sep-93.pdf (dostop: 2018)
47. Siracusaa, J.S.; Yina, L.; Measela, E.; Lianga, S.; Yua X. Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review. Reproductive Toxicology 2018; 79: 96-123.
48. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623#section=Top> (dostop: junij 2018)

49. <https://www.lhasalimited.org/products/meteor-nexus.htm> (dostop: april 2018)
50. <https://www.lhasalimited.org/Public/Library/Brochures/Meteor%20Nexus.pdf> (dostop: april 2018)
51. Ballesteros-Gómez, A.; Erratico, C.A.; Van den Eede, N.; Ionas, A.C.; Leonards, P.E.G.; Covaci A. In vitro metabolism of 2-ethylhexyldiphenyl phosphate (EHDPHP) by human liver microsomes. *Toxicology Letters* 2015; 232: 203–212
52. Kolsek, K.; Mavri, J.; Sollner Dolenc, M.; Gobec, S.; Turk, S. Endocrine Disruptome-An Open Source Prediction Tool for Assessing Endocrine Disruption Potential through Nuclear Receptor Binding. *Jurnal Chemical Information and Model* 2014; 54 (4): 1254–1267.
53. <http://endocrinedisruptome.ki.si/FAQ.html> (dostop: april 2018)
54. <http://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.smiles.html> (dostop: april 2018)
55. <https://chembiohub.ox.ac.uk/blog/2015/03/10/pains.html> (dostop: april 2018)
56. <http://endocrinedisruptome.ki.si/> (dostop: april 2018)
57. <https://www.vegahub.eu/> (dostop: julij 2018)
58. <https://www.lhasalimited.org/Public/Library/Brochures/Derek%20Nexus.pdf> (dostop: julij 2018)
59. <https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm#General%20Approach> (dostop: julij 2018)
60. <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (dostop: julij 2018)
61. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/sccnfp_opinions_97_04/sccp_out145_en.htm (dostop: junij 2018)
62. Christena, V.; Zucchi, S.; Fent, K. Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. *Aquatic Toxicology* 2011; 102: 167–176.
63. Axelstad, M.; Boberg, J.; Sørig Hougaard, K.; Christiansen, S.; Rosenskjold Jacobsen, P.; Riiber Mandrup, K.; Nellemann, C.; Lund, S.P.; Hass, U. Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter Octyl Methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2011; 250: 278–290.

64. Wang, J.; Pan, L.; Wu, S.; Lu, L.; Xu, Y.; Zhu, Y.; Guo, M.; Recent S. Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2016; 13 (8): 782.
65. Seidlova-Wuttke, D.; Christoffel, J.; Rimoldi, G.; Jarry, H.; Wuttke, W. Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 214: 1–7.
66. Schlumpf, M.; Cotton, B.; Conscience, M.; Haller, V.; Steinmann, B.; Lichtensteiger, W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental and Health Perspectives* 2001; 109: 239–244.
67. Schreurs, R.; Lanser, P.; Seinen, W.; Van der Burg, B. Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Archives of Toxicology* 2002; 76: 257–261.
68. Kunz, P.Y.; Fent, K. Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology* 2006; 79: 305–324.
69. Gomez, E.; Pillon, A.; Fenet, H.; Rosain, D.; Duchesne, M.J.; Nicolas, J.C.; Balaguer, P.; Casellas, C. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: Parabens, UV Screens, and musks. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2005; 68: 239–251.
70. Seidlovawuttke, D.; Jarry, H.; Christoffel, J.; Rimoldi, G.; Wuttke, W. Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)—2 filters of UV light—On several uterine, vaginal and bone parameters. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 210: 246–254.
71. Schmutzler, C.; Hamann, I.; Hofmann, P.J.; Kovacs, G.; Stemmler, L.; Mentrup, B.; Schomburg, L.; Ambrugger, P.; Grütters, A.; Seidlova-Wuttke, D.; et al. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 2004; 205: 95–102.
72. Schmutzler, C.; Hamann, I.; Hofmann, P.J.; Kovacs, G.; Stemmler, L.; Mentrup, B.; Schomburg, L.; Ambrugger, P.; Grütters, A.; Seidlova-Wuttke, D.; et al. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in

- serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 2004; 205: 95–102.
73. Klammer, H.; Schlecht, C.; Wuttke, W.; Schmutzler, C.; Gotthardt, I.; Kohrle, J.; Jarry, H. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary–thyroid function in rats. *Toxicology* 2007; 238: 192–199.
74. Hamann, I.; Hofmann, P.; Schmutzler, C.; Mentrup, B.; Huhne, K.; Jarry, H.; Seidlová-Wuttke, D.; Wuttke, W.; KöHrle, J. 4MBC and OMC, components of UV-sunscreens, exert organ specific alterations on type I 5 1 -Deiodinase activity and expression in female rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2005: 113–138.
75. Pennanen, S.; Tuovinen, K.; Huuskonen, H.; Komulainen, H. The Developmental Toxicity of 2-Ethylhexanoic Acid in Wistar Rats. *Fundamental and applied toxicology* 1992; 19: 505-511.
76. Grosse, L.; Campeau, A.S.; Caron, S.; Morin, F.A.; Meunier, K.; Trottier, J.; Caron, P.; Verreault, M.; Barbier O. Enantiomer Selective Glucuronidation of the Non-Steroidal Pure Anti-Androgen Bicalutamide by Human Liver and Kidney: Role of the Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)1A9 Enzyme. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2013; 113: 92–102.
77. <https://echa.europa.eu/sl/registration-dossier/-/registered-dossier/11030/7/9/1>
(dostop: oktober 2018)