

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA ŠPEGEL
DIPLOMSKO DELO
UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA ŠPEGEL

***IN SILICO* VREDNOTENJE METABOLIZMA,
ENDOKRINIH UČINKOV IN REPRODUKTIVNE
TOKSIČNOSTI IZBRANIH DERIVATOV KAFRE**

***IN SILICO* EVALUATION OF METABOLISM,
ENDOCRINE EFFECTS AND REPRODUCTIVE TOXICITY
OF SELECTED CAMPHOR DERIVATIVES**

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za strokovno usmerjanje, prijaznost in potrpežljivost pri izdelavi diplomskega dela.

Hvala bližnjim družinskim članom in najboljšim prijateljem za podporo.

*Nobena pot ni ravna,
nobena pot ni revna,
a vsaka je zahtevna
in tvoja ena sama – glavna.
(Tone Pavček)*

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko/magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Nina Špegel

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

Članica komisije: izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD.....	1
1.1 UV-FILTRI V KOZMETIČNIH IZDELKIH	1
1.2 DERIVATI KAFRE KOT UV-FILTRI.....	2
1.2.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI 3-BK IN 4-MBK	3
1.2.2 TOKSIČNI UČINKI 3-BK IN 4-MBK.....	3
1.2.3 IZPOSTAVLJENOST 4-MBK PRI UPORABI KOZMETIČNIH IZDELKOV .	4
1.2.4 ABSORPCIJA 4-MBK	5
1.3 ENDOKRINI SISTEM	6
1.3.1 RECEPTORJI.....	6
1.3.2 VRSTE IN VPLIVI HORMONSKIH MOTILCEV	7
1.4 REPRODUKTIVNA TOKSIČNOST.....	8
1.5 <i>IN SILICO</i> METODE	9
1.5.1 (Q)SAR MODELI IN EKSPERTNI SISTEMI.....	9
1.5.2 <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE METABOLIZMA	10
1.5.3 <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE ENDOKRINIH UČINKOV	10
1.5.4 <i>IN SILICO</i> NAPOVEDOVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI.....	11
2. NAČRT ZA DELO.....	12
3. METODE IN MATERIALI	13
3.1 IZBRANI DERIVATI KAFRE	13
3.2 NEGATIVNA IN POZITIVNA KONTROLA	13
3.3 UPORABLJENI RAČUNALNIŠKI PROGRAMI IN SPECIFIKACIJA NASTAVITEV	14
3.3.1 PROGRAM ZA NAPOVED METABOLIZMA	14
3.3.2 PROGRAMA ZA NAPOVED ENDOKRINIH UČINKOV	15
3.3.3 PROGRAMI ZA NAPOVED REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI	18
3.4 POTEK DELA Z UPORABLJENIMI METODAMI	20
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1 METABOLIZEM 3-BK IN 4-MBK.....	22
4.1.1 3-BENZILIDENKAFRA	22
4.1.2 4-METILBENZILIDENKAFRA	31
4.1.3 RAZPRAVA	42
4.2 ZBRANI METABOLITI	45
4.3 ENDOKRINO DELOVANJE	53

4.3.1 PROGRAM VEGANIC - RELATIVE BINDING AFFINITY MODEL.....	53
4.3.2 PROGRAM ENDOCRINE DISRUPTOME	56
4.3.3 RAZPRAVA	61
4.4 NAPOVED REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI.....	67
4.4.1 REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM DEREK NEXUS	67
4.4.2 REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM VEGANIC - Developmental/Reproductive Toxicity Library	68
4.4.3 REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM VEGANIC - Developmental Toxicity	68
4.4.4 REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM TEST	69
4.4.5 RAZPRAVA	71
5. SKLEP	75
6. VIRI IN LITERATURA.....	76

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Derivati kafe, ki so dovoljeni za uporabo kot UV-filtri v EU.....	2
Preglednica II: Izbrana in preučevana derivata kafe s strukturno formulo, INN imenom, CAS številko in SMILES kodo	13
Preglednica III: Izbrani kontroli s strukturno formulo, CAS številko in SMILES kodo ..	14
Preglednica IV: Zbrani metaboliti 3-BK in 4-MBK za nadaljnjo raziskavo endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti	45
Preglednica V: Rezultati programa VegaNIC za napoved endokrine toksičnosti preko ER za timol, BPA, 3-BK in 4-MBK.....	54
Preglednica VI: Rezultati programa VegaNIC za napoved endokrine toksičnosti preko ER za metabolite 3-BK in 4-MBK	55
Preglednica VII: Rezultati programa Endocrine Disruptome za napoved endokrine toksičnosti 3-BK, 4-MBK, negativne in pozitivne kontrole preko vezave na različne receptorje	56
Preglednica VIII: Rezultati programa Endocrine disruptome za napoved endokrine toksičnosti metabolitov derivatov kafe preko vezave na različne receptorje.....	59
Preglednica IX: Rezultati napovedi za različne vidike reproduktivne toksičnosti programov Derek Nexus, TEST in dveh modelov programa VegaNIC.....	70

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz poteka dela <i>in silico</i> vrednotenja metabolizma, endokrine in reprodukativne toksičnosti	21
Slika 2: Napovedna shema metabolizma 3-BK z opisom reakcij.....	24
Slika 3: Napovedna shema metabolizma spojine B1 z opisom reakcij	25
Slika 4: Napovedna shema metabolizma spojine B2 z opisom reakcij	26
Slika 5: Napovedna shema metabolizma spojine B3 z opisom reakcij	27
Slika 6: Napovedna shema metabolizma spojine B4 z opisom reakcij	27
Slika 7: Napovedna shema metabolizma spojine B5 z opisom reakcij	28
Slika 8: Napovedna shema metabolizma spojine B6 z opisom reakcij	29
Slika 9: Napovedna shema metabolizma spojine B8 z opisom reakcij	30
Slika 10: Napovedna shema metabolizma spojine B9 z opisom reakcij.	31
Slika 11: Napovedna shema metabolizma 4-MBK z opisom reakcij.	33
Slika 12: Napovedna shema metabolizma spojine M1 z opisom reakcij	34
Slika 13: Napovedna shema metabolizma spojine M2 z opisom reakcij	35
Slika 14: Napovedna shema metabolizma spojine M3 z opisom reakcij	36
Slika 15: Napovedna shema metabolizma spojine M4 z opisom reakcij	37
Slika 16: Napovedna shema metabolizma spojine M5 z opisom reakcij	38
Slika 17: Napovedna shema metabolizma spojine M6 z opisom reakcij	39
Slika 18: Napovedna shema metabolizma spojine M8 z opisom reakcij	40
Slika 19: Napovedna shema metabolizma spojine M9 z opisom reakcij	41

Slika 20: Napovedna shema metabolizma spojine M10 z opisom reakcij	42
Slika 21: Metaboliti izbranih derivatov kafe, ki so jih zaznali pri <i>in vivo</i> raziskavah metabolizma.....	44
Slika 22: Struktura 17 β -estradiola kot endogenega agonista na ER, struktura BPA za katero je dokazana aktivnost na ER in struktura metabolita 3-BK, katerega obstoj je dokazan z raziskavami <i>in vivo</i> in ki je v obeh <i>in silico</i> metodah bil z veliko verjetnostjo napovedan kot agonist na ER	64
Slika 23: Struktura testosterona.	65
Slika 24: Strukturi trijodtironina (T3) in tiroksina (T4)	66
Slika 25: Struktura glukokortikoida kortizola	66

POVZETEK

Derivati kafe se v kozmetičnih izdelkih uporabljajo kot UV-filtri in UV-absorbenti. S široko uporabo tovrstnih kozmetičnih izdelkov smo lahko izpostavljeni znatni količini teh UV-filtrov in posledično tudi njihovim metabolitom. Izbrane derivate kafe smo preučevali z različnimi *in silico* metodami ter z njimi napovedali metabolizem, endokrine učinke in reproduktivno toksičnost. Pri delu smo se osredotočili na 3-benzilidenkafro, ki ni več dovoljena za uporabo v Evropski uniji in 4-metilbenzilidenkafro, ki je dovoljena za uporabo v kozmetiki kot UV-filter in UV-absorbent. Sestavini sta si strukturno podobni, zato smo s preučevanjem dveh zakonodajno različnih statusov izbranih derivatov kafe imeli dobro primerjalno izhodišče. S pomočjo programa Meteor Nexus smo napovedali možne metabolite in metabolne poti. Dobljene metabolite smo nadalje analizirali z računalniškimi programi za določanje endokrinih učinkov (VegaNIC z modelom Relative Binding Affinity Model in Endocrine Disruptome) in za določanje vidikov reproduktivne toksičnosti (Derek Nexus, TEST in VegaNIC z modeloma Developmental Toxicity Classification Model in Developmental/Reproductive Toxicity Virtual library). Možnosti pozitivnega doprinosa *in silico* metod so izjemne, potrebnega pa bo še veliko dela, razvoja in testiranja, da bodo te metode prestopile prag trenutne »omejene uporabnosti«. Pri preučevanju endokrine toksičnosti smo na podlagi dozdajšnjih raziskav in naše *in silico* analize ugotovili, da 4-metilbenzilidenkafra izraža bolj selektivno delovanje na β podtip estrogenskih receptorjev, izkazuje antiandrogeno delovanje in da oba izbrana derivata kafe vplivata na delovanje ščitnice. Programi za ugotavljanje reproduktivne toksičnosti so se zaradi neenotnosti izkazali za trenutno neuporabne, so pa takšni rezultati pomembni za nadgradnjo računalniških programov. Pri zadnji obravnavi Znanstvenega odbora za varnost potrošnikov o varnosti 4-metilbenzilidenkafre so po pregledu *in vitro* in *in vivo* študij presodili, da so podatki o škodljivih učinkih na endokrini sistem nepopolni in zaključili, da je spojina varna za uporabo, hkrati pa poudarili, da določenih vrst kozmetičnih izdelkov v mnenju niso upoštevali – med njimi so kozmetični izdelki v obliki razpršil, aerosolov in balzamov za ustnice, ki so na policah množično zastopani. Zaskrbljenost glede varnosti 4-metilbenzilidenkafre tako ostaja, nove raziskave pa lahko pomagajo pri ponovni presoji varnosti. Novi argumenti za ali proti so še toliko bolj pomembni zaradi vedno večjega pomena preučevanja hormonskih motilcev, ki delujejo v zelo nizkih koncentracijah in z vezavo na receptorje spreminjajo delovanje endokrinega sistema in s tem posredno vplivajo tudi na reproduktivno toksičnost.

ABSTRACT

Camphor derivatives are used as UV filters and UV absorbers in cosmetic products. We have evaluated selected camphor derivatives with different *in silico* methods to determine their metabolism, endocrine effects and reproductive toxicity. In the scope of this thesis, we focused on 3-benzylidene camphor, which is no longer permitted for use in the European Union and 4-methylbenzylidene camphor, which is permitted for use in cosmetics as UV filter and UV absorbent. The structural similarity of these camphor derivatives on one hand and two different legislative statuses on the other, established a great basis for comparison. Software Meteor Nexus Meteor was used for prediction of potential metabolites and metabolic pathways. Predicted metabolites were further evaluated for possible endocrine effects (VegaNIC Relative Binding Affinity Model and Endocrine Disruptome) and for possible reproductive toxic effects (Derek Nexus, TEST and VegaNIC with Developmental Toxicity Classification Model and Developmental/Reproductive Toxicity Virtual Library). Although *in silico* methods hold great potential, they still require a lot of work, development and testing, in order for these methods to become more useful as well as more reliable. Based on previous scientific research and the results of our *in silico* prediction, we established that 4-methylbenzylidene camphor displays selective action on estrogen receptor β subtype, anti-androgen activity and that both selected camphor derivatives possess activity on the thyroid receptors. The software used for prediction of reproductive toxicity yielded discrepant results, nevertheless the obtained results could be used for an upgrade of these programs. Despite independent research showed strong evidence indicating endocrine effects of 4-methylbenzylidene camphor, Scientific Committee on Consumer Safety concluded that 4-methylbenzylidene camphor is safe for use and that the information regarding such toxic effects is still incomplete. They also emphasized that this opinion does not include certain cosmetic products that enter the body via inhalation or oral route like sprays, aerosols and lip products even though these products are widely distributed on the market. The concerns about the safety of 4-methylbenzylidene camphor thus still remain and new research is sought for to help in reassessing the risk. New arguments for and against are even more important in light of the growing number of studies assessing the biological activity of endocrine disruptors, which are active at very low concentrations and disturb the homeostasis of the endocrine system thus indirectly causing reproductive toxicity.

SEZNAM OKRAJŠAV

3-BK	3-benzilidenkafra
4-MBK	4-metilbenzilidenkafra
ADH	alkohol-dehidrogenaza
ADMET	absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity (absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje, toksičnost)
AR	androgeni receptor
BPA	bisphenol A (bisfenol A)
CMR	Carcinogenic, Mutagenic, Reprotoxic (rakotvorno, mutageno, strupeno za razmnoževanje)
CYP450	citokrom P450
DNA	deoxyribonucleic acid (deoksiribonukleinska kislina)
EC50	koncentracija snovi, pri kateri se pokaže učinek, ki povzroči 50% maksimalnega odziva
ED50	odmerek, pri kateri se pokaže učinek, ki povzroči 50% maksimalnega odziva
EH	epoksid hidrolaza
EPA	Environmental Protection Agency (Agencija za varstvo okolja)
ER (α , β)	estrogenski receptor (alfa, beta)
EU	Evropska unija
FTC-133	Follicular Thyroid Carcinoma (humana tumorska celična linija izolirana iz celic raka ščitnice)
GR	glukokortikoidni receptor
GST	glutathion-S-transferaza
LXR (α , β)	liver X receptor (jetrni X receptor)
m-RNA	messenger ribonucleic acid (sporočilna ribonukleinska kislina)
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (humana tumorska celična linija izolirana iz celic raka na prsih)
MDA-kb2	humana tumorska celična linija izolirana iz celic raka na prsih
MoS	Margin of Safety (varna meja)
NAT	N-acetiltransferaza
NOAEL	no observed adverse effect level (najvišji odmerek, pri katerem ne opazimo nobenih negativnih učinkov)

OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj)
PPAR (α , β , γ)	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor (alfa, beta, gama)
(Q)SAR	(Quantitative) Structure–Activity Relationship (kvantitativno razmerje med strukturo in aktivnostjo)
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij)
RXR (α)	retinoidni X receptor (alfa)
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety (Znanstveni odbor za varnost potrošnikov)
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
SPF	Sun Protection Factor (zaščitni faktor)
SULT	sulfotransferaza
T3	trijodtironin
T4	tiroksin
TEST	The Toxicity Estimation Software Tool
TSH	thyroid-stimulating hormone (ščitnico stimulirajoči hormon)
TR (α , β)	tiroidni receptor (alfa, beta)
UGT	uridindifosfat - glukuronoziltransferaza
YES	Yeast Estrogen Screen (presejalni test estrogenske aktivnosti na kvasovkah)

1. UVOD

1.1. UV-FILTRI V KOZMETIČNIH IZDELKIH

Kozmetični izdelki z UV-filtri za zaščito pred soncem predstavljajo posebno kategorijo med kozmetičnimi proizvodi (1). Porast kožnega raka v zadnjih letih sovpada z naraščanjem ozaveščenja uporabe zaščitne kozmetike. V Evropski uniji (EU) predstavljajo proizvajalci sredstev za zaščito pred soncem pomemben in rastoč trg; leta 2004 je znašala vrednost prodaje zaščitne kozmetike 1,3 milijarde EUR po maloprodajni ceni, v letu 2005 pa so beležili 4% rast (7). V Veliki Britaniji se je od 70-ih let do danes pojavnost malignega melanoma povečala za kar 360%, po podatku iz leta 2012 pa je v Evropi vsako leto diagnosticiranih več kot 100.000 primerov malignega melanoma, ki tako predstavlja deveto najpogostejšo obliko raka (2,3). Med glavne preventivne ukrepe proti kožnemu raku predstavlja uporaba varovalnih kozmetičnih izdelkov, ki učinkovito ščitijo pred UVA- in UVB-žarki. V EU je za uporabo v kozmetičnih izdelkih trenutno dovoljenih 28 UV-filtrov (4), od tega dva anorganska oz. fizikalna, ostali pa spadajo med organske oz. kemijske filtre. Fizikalni UV-filtri odbijajo in sipajo žarke, kemijski pa jih absorbirajo. Funkcija kozmetičnih sestavin, ki so vključene v Aneks VI Uredbe o kozmetičnih izdelkih (ES) št. 1223/2009, pa ni omejena samo na zaščito kože pred škodljivimi vplivi UV-sevanja, ampak imajo nekatere med njimi tudi funkcijo varovanja ostalih sestavin pred učinki UV-žarkov, kar je pomembno za stabilnost gotovega kozmetičnega izdelka. Ti UV-absorbenti se uporabljajo v vseh vrstah kozmetičnih izdelkov, od negovalnih do dekorativnih, z namenom uporabe na različnih delih telesa.

Zaščita pred UVB-žarki se označuje s kratico SPF (Sun Protection Factor). Stopnje zaščite pred soncem se na zunanji ovojnini označujejo sledeče: nizka zaščita za oznako SPF od 6 do 10, srednja zaščita za oznako SPF od 15 do 25, visoka zaščita za oznako SPF od 30 do 50 in zelo visoka zaščita za oznako SPF 50+. Kozmetični izdelki, ki vsebujejo UV-filtri in imajo zaščitni faktor manj kot 6, ne smejo imeti oznake, da ščitijo pred soncem (6). Večina dnevnih negovalnih krem za obraz in tekočih pudrov ima v formulacijah tudi UV-filtri za zaščito kože. Kadar govorimo o varnosti UV-filtrov in njihovih učinkih na telo, moramo

imeti v mislih vsestranskost uporabe teh sestavin v različnih vrstah kozmetičnih izdelkov, ki presega zgolj uporabo posebej označenih varovalnih izdelkov za zaščito pred soncem.

1.2. DERIVATI KAFRE KOT UV-FILTRI

V skupino UVB filtrov spadajo strukturno različne spojine, med njimi so derivati *p*-aminobenzojske, cimetine in salicilne kisline ter derivati kafre. Pri našem delu smo se osredotočili na preučevanje slednjih, in sicer na 3-benzilidenkafro (3-BK) in 4-metilbenzilidenkafro (4-MBK). 3-BK v EU od 28. julija 2015 ni več dovoljena za uporabo v kozmetiki niti kot UV-filter niti kot UV-absorbent, je pa še vedno dovoljena sestavina kot UV-absorbent v drugih državah, kot na primer v ZDA, Avstraliji in azijskih državah (77, 91). Med derivate kafre, ki so trenutno dovoljeni UV-filtri v EU, spadajo: 4-MBK, kafra benzalkonijev metosulfat, tereftaliden dikafra sulfonska kislina ali ekamsul, benziliden kafra sulfonska kislina in poliakrilamidometil benziliden kafra. V preglednici smo povzeli njihov namen uporabe, območje delovanja in največjo dovoljeno koncentracijo v končnem kozmetičnem izdelku.

Preglednica I: Derivati kafre, ki so dovoljeni za uporabo kot UV-filtri v EU.

INCI IME	OBMOČJE DELOVANJA	NAMEN UPORABE	MAKS. KONC. V KOZMET. IZD.
4-METHYLBENZYLIDENE CAMPHOR	UVB-filter	<ul style="list-style-type: none"> • UV-filter • UV-absorbent 	4%
CAMPHOR BENZALKONIUM METHOSULFATE	UVB-filter	<ul style="list-style-type: none"> • UV-filter • UV-absorbent • Protimikrobno delovanje • Antistatično delovanje 	6%
TEREPHTHALYLIDENE DICAMPHOR SULFONIC ACID	UVB-filter	<ul style="list-style-type: none"> • UV-filter • UV-absorbent 	10% (računano kot kislina)
BENZYLIDENE CAMPHOR SULFONIC ACID	UVB-filter	<ul style="list-style-type: none"> • UV-filter • UV-absorbent 	6% (računano kot kislina)
POLYACRYLAMIDOMETHYL BENZYLIDENE CAMPHOR	UVB-filter	<ul style="list-style-type: none"> • UV-filter • UV-absorbent 	6%

Pri formulaciji kozmetičnega izdelka z UV-filtri je poleg funkcionalnega vidika, torej ustrezne zaščite kože, pomembna tudi stabilnost posameznih UV-filtrov. Derivati kafe so poznani kot fotostabilni, termostabilni in dobro topni v oljih ter lipidni fazi emulzij, kar je pri razvoju varnih in učinkovitih kozmetičnih izdelkov zelo pomemben kriterij (11,12).

1.2.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI 3-BK IN 4-MBK

3-BK (IUPAC: 3-benziliden-bornan-2-on) in 4-MBK (IUPAC: 3-(4-metilbenziliden)bornan-2-on) sta derivata kafe, ki je naravno prisotna spojina in spada med terpenoide. Kafra je dobila ime po vednozelenem drevesu kafrovcu *Cinnamomum camphora*, nahaja pa se v njegovem deblu (13). Najdemo jo tudi v drugih rastlinah, na primer v olju listov rožmarina (14). Kafra se lahko pridobiva tudi sintezno in ima dva enantiomera – v naravi najdemo samo (*R*)-enantiomer. 3-BK in 4-MBK delujeta kot UV-filtra zaradi zmožnosti absorpcije fotonov, absorbirana energija pa se sprosti s pretvorbo enega izomera v drugega, s ti. *cis-trans* izomerizacijo (15). V čisti obliki sta oba izbrana derivata kafe v obliki belih kristalov, brez vonja in nista topna v vodi, dobra topna pa sta v alkoholu in izopropanolu. 3-BK je bil na voljo pod tržnimi imeni Mexoryl SD-20®, Ultren 9K® in Unisol S-22®, 4-MBK pa se trži kot Eusolex® 6300 podjetja Merck & Co, Parsol® 5000 podjetja DSM in Neo Heliopan MBC® podjetja Symrise.

1.2.2. TOKSIČNI UČINKI 3-BK IN 4-MBK

Za 3-BK so bili dokazi za toksične učinke na hormonski sistem in reprodukcijo dovolj močni, da so jo 28. julija 2015 izbrisali iz seznama dovoljenih sestavin kozmetične zakonodaje za področje EU (47). Endokrino delovanje na več hormonskih receptorjev, ki so ga obširno raziskali tako *in vitro* kot tudi *in vivo* ter ocena izpostavljenosti tej substanci (meja varne uporabe MoS je znašala < 100) sta vodili do odločitve Znanstvenega odbora za varnost potrošnikov (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)), da 3-BK razglasijo kot nevarno (69). 4-MBK je bila leta 2008 prav tako v obravnavi SCCS na podlagi njihove lastne iniciative, da je potrebna ponovna revizija dozdašnjih in novih podatkov v luči razlogov za skrb glede varnosti tega UV-filtra. Na podlagi na novo predloženih študij so ponovno ocenjevali varnost 4-MBK, vendar tudi pri zadnji obravnavi

ni prišlo do sprememb. Ocena tveganja o nevarnosti 4-MBK ni bila sprejeta zaradi specifičnih ugovorov, ki lahko legitimno vplivajo na rezultate izračuna MoS, poročila o študijah škodljivosti na hormonski sistem pa so označili za nepopolna (79). Kljub sklepom, da 4-MBK ostaja varna za uporabo v koncentraciji do 4% v končnem kozmetičnem izdelku, so poudarili, da se mnenje nanaša izključno na uporabo kot UV-filter v negovalnih izdelkih za kožo, ne pa tudi na vso ostalo kozmetiko, ki lahko prehaja v telo peroralno ali z inhalacijo. Glede na to, da obstaja na trgu široka ponudba razpršil, aerosolov in balzamov za ustnice za zaščito pred soncem, ki so prav tako del marketinških kampanj o ozaveščanju škodljivih učinkih sončenja, takšen zaključek vzbuja določeno mero zaskrbljenosti.

1.2.3. IZPOSTAVLJENOST 4-MBK PRI UPORABI KOZMETIČNIH IZDELKOV

Ljudje smo 4-MBK v glavnem izpostavljeni z uporabo kozmetičnih izdelkov, ki jih le-ti vsebujejo. V raziskavi sistemske absorpcije, ki so jo izvedli na 39 prostovoljcih, so rezultati pokazali, da je po enem tednu vsakodnevnega nanosa kozmetičnega izdelka z UV filtrom 4-MBK po koži celega telesa znašala koncentracija v plazmi 20 ng/ml (92). 4-MBK so zaznali tudi v materinem mleku, kar predstavlja izpostavljenost za novorojenčke in dojenčke (93). V eni izmed raziskav so po enkratnem topikalnem nanosu kozmetičnega izdelka s 4% vsebnostjo 4-MBK po celem telesu v urinu zaznali manj kot 1% nanešene doze v obliki glukuronidiranih metabolitov (66). V študiji, kjer so raziskovali prisotnost 4-MBK v vodnem ekosistemu v Švici so našli 6-68 ng/L v rekah, glavni vzrok za prisotnost pa so bile odpadne vode (94). 4-MBK so našli tudi v ribah v Nemčiji, in sicer celo do 3100 ng/g maščobnega tkiva (95). Na obali Antarktike in v Novi Zelandiji se je koncentracija 4-MBK v vzorcih vode spreminjala odvisno od sezone, od 321 ng/L pa celo do 2130 ng/L (96). Podatki raziskav kažejo na to, da smo 4-MBK izpostavljeni tudi s prehrano, najdemo pa jo tako v evropskih tekočih vodah kot tudi na obalah Antarktike.

Tudi če pri izbiri označene zaščitne kozmetike z UV-filtri preberemo seznam INCI sestavin in se na primer odločamo za nakup izdelkov, ki vsebujejo le fizikalne filtre, se 4-MBK zaradi njene razširjene uporabe ne moremo popolnoma izogniti. Vsebujejo jo lahko namreč tudi negovalne dnevne kreme, ki niso deklarirane kot zaščitne, tekoči in kompaktni

pudri ter tudi vsa ostala kozmetika, ki 4-MBK uporablja kot UV-absorbent. Pri pregledu kozmetičnih izdelkov smo ugotovili, da se uporablja tudi v dezodorantih v stiku in negovalnih balzamih za ustnice. Kot primer navajamo nekaj izdelkov, ki vsebujejo 4-MBK: otroško razpršilo Nivea Sun Kids SPF 30, balzam za ustnice Bepanthol UVA- in UVB-filter 20, mleko za telo Nivea Sun SPF 20, sprej za zaščito las Wella SP Sun UV, otroški sprej Bübchen Sonnenspray Kids SPF 30, otroško mleko za telo Elkos SPF 20, zaščitna krema za roke Sans Soucis, negovalna krema za obraz Marbert Sensitive Care SensComfort, dezodorant v stiku za moške Bvlgari pour Homme (16). V Avstraliji je v 4-MBK pogosto uporabljen UV-filter, na primer avstralska linija za zaščito pred soncem Cancer Council ima med pregledanimi 25 kozmetičnimi izdelki 19 takšnih, ki vsebujejo 4-MBK, med njimi so tudi trije otroški zaščitni izdelki (17).

1.2.4. ABSORPCIJA 4-MBK

Problematika dokazovanja endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti pri sestavinah, ki se uporabljajo v kozmetiki, je pogosto vezana na težave pri prenosu dokazov z živali na človeka in na vprašanja, ki se pojavljajo glede dejanske absorpcije sestavine skozi kožo. Pri preučevanju absorpcije UV-filtrov je pomembna tudi tehnološka formulacija, v katero so vgrajeni. V eni od raziskav se je kot najbolj ustrezen vehikel za penetracijo 4-MBK v kožo izkazalo olivno olje, kar je seveda pričakovano glede na to, da je 4-MBK lipofilna sestavina (18). Za nadaljnje raziskave z dobro podprtimi dokazi je pomembno, da se sestavine preučujejo na človeških celicah oz. modelih, ki oponašajo procese v človeškem telesu, in da so preučevane sestavine vgrajene v podlago, ki je optimalna tako za stabilnost formulacije kot tudi za prehajanje skozi kožo.

Pri delovanju UV-filtrov in potencialnih toksičnih učinkov na zdravje človeka se pojavljajo tudi možnosti razvoja novih formulacij, ki bi omogočale čim manjše prehajanje kože. Raziskava absorpcije 4-MBK, ki so jo izvedli *in vitro* na rekonstruiranih humanih celicah povrhnjice EpiSkin (20), je pokazala razlike v penetraciji med 4-MBK vgrajeno v o/v emulzijo in takšno, ki je bila enkapsulirana v polimerne mikrosfere. Z metodo »tape stripping« (21), ki odlušči posamezne plasti vrhnjice, so v posameznih slojih ekstrahirali 4-MBK. Rezultati so pokazali občutno manjše prehajanje kože pri nanosu 4-MBK v obliki

polimernih mikrosfer, ki omogočajo zadrževanje na mestu delovanja, kjer želimo učinek in hkrati zmanjšajo možne toksične učinke na telo, predvsem na hormonski sistem (19).

1.3. ENDOKRINI SISTEM

Endokrini sistem sestavljajo endokrini organi, ki v cirkulacijo izločajo hormone in tako vplivajo na tarčne organe. Endokrini sistem preko povratnih zvez signalizira informacije in uravnava procese v telesu (22). Od njega so odvisni rast in razvoj, vzdrževanje homeostaze, metabolizem, odzivi na različne dražljaje kot so stres ali poškodba in procesi, ki so odgovorni za razmnoževanje (23). Hormoni imajo različne kemijske strukture in jih v grobem razdelimo na steroide, proteine in derivate aminokislin (24). Te signalne molekule vplivajo na aktivnost encimov, kontrolirajo transkripcijo genov, sintezo proteinov in reakcije med njimi (25). Za naše preučevanje endokrinih učinkov izbranih derivatov kafe so pomembne različne aktivnosti, ki jih hormoni in hormonski motilci izkazujejo na receptorjih, mi se bomo pri delovanju osredotočili na agonistično in antagonistično delovanje.

1.3.1. RECEPTORJI

Hormoni se lahko vežejo na receptorje znotraj celice, na jedrne receptorje in druge strukture v citoplazmi ali na receptorje na zunanji strani membrane celice. Lipofilni hormoni prehajajo lipidni dvosloj in vstopajo v celico, hidrofilni pa preferirajo vezavo na receptorje zunaj celice (25). Na izražanje in število receptorjev vpliva pogostnost in intenzivnost stimulacije s hormoni. Pri naši *in silico* analizi bomo posebno pozornost namenili spodaj naštetim receptorjem; dopisani so tudi njihovi endogeni ligandi:

- **Estrogenski receptor alfa (ER α):** receptor za 17 β -estradiol
- **Estrogenski receptor beta (ER β):** receptor za 17 β -estradiol, fitoestrogeni, 5 α -androstan-3 β ,17 β diol
- **Androgeni receptor (AR):** receptor za dihidrotestosteron in testosteron
- **Tiroidni receptor alfa in beta (TR α , TR β):** receptor za trijodtironin
- **Glukokortikoidni receptor (GR):** receptor za kortizol in druge glukokortikoide

- **Jetrni X receptor alfa in beta (LXR α , LXR β):** receptor za oksisterole
- **S peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor alfa (PPAR α):** receptor za polinenasičene maščobne kisline, eikozanoide, oleiletanolamid, levkotrien B4
- **S peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor beta (PPAR β):** receptor za neznane spojine
- **S peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor gama (PPAR γ):** receptor za prostaglandin J2, lizofosfatidna kislina, polinenasičene maščobne kisline
- **Retinoidni X receptor alfa (RXR α):** receptor za 9-*cis*-retinojsko kislino, dokozaheksaenojsko kislino

1.3.2. VRSTE IN VPLIVI HORMONSKIH MOTILCEV

Hormonski motilci so eksogene spojine ali zmesi spojin, ki spremenijo delovanje endokrinega sistema in tako povzročajo škodljive učinke na zdravje organizma ali njegovih potomcev. Hormonski motilci imajo različne načine delovanja: lahko oponašajo hormone in sprožijo agnostični učinek, lahko se vežejo na receptor, ga blokirajo in tako izkazujejo antagonistični učinek, nekateri se vežejo na transportne proteine v krvi in tako spremenijo količino naravnih hormonov, ki krožijo po telesu, možna pa je tudi interakcija z metabolizmom, ki vpliva na sintezo oz. razgradnjo naravnega hormona (26). Hormoni prav tako kot tudi hormonski motilci delujejo pri zelo nizkih koncentracijah. Skrb zaradi vplivov hormonskih motilcev v zadnjih letih narašča tako v EU kot tudi drugod po svetu. V uredbi za Registracijo, evalvacijo, avtorizacijo in omejevanje kemikalij (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)) so hormonski motilci obravnavani podobno kot snovi z visokim tveganjem za zdravje. Evropska komisija je trenutno v fazi priprave predloga za znanstveno osnovane kriterije za določevanje hormonskih motilcev za sredstva za zaščito rastlin in biocidov (27). Med poznane hormonske motilce sodijo spojine rastlinskega izvora kot je genistein, spojine v plastičnih materialih kot so ftalati, bisfenoli in alkilfenoli ter mnogi insekticidi, mikotoksini, fungicidi in ostali onesnaževalci, ki so stranski proizvod različnih industrij (28). Do zdaj je bilo največ pozornosti namenjene raziskovanju vplivov hormonskih motilcev na estrogenske pa

tudi na androgene receptorje, v zadnjem času pa se več fokusa namenja tudi raziskovanju vpliva na tiroidne receptorje. Pričakujemo, da bo raziskovanje v prihodnje potekalo v smeri izboljšanja odkrivanja učinkov hormonskih motilcev na že pogosteje preučevane receptorje pa tudi na mnoge druge, ki jim trenutno znanost še ne posveča veliko pozornosti.

1.4. REPRODUKTIVNA TOKSIČNOST

Reproduktivna toksičnost zajema mnogo vidikov in zaradi svoje kompleksnosti predstavlja področje, kjer so študije in raziskave najdražje, časovno potratne in potekajo na velikem številu testiranih živalih (29). V reproduktivno toksičnost se vpleta tudi endokrino delovanje hormonskih motilcev. K osnovni študiji reproduktivne toksičnosti spadajo študija teratogenosti, peri-/postnatalne toksičnosti, študija plodnosti in dvo- ali večgeneracijske študije. Znotraj organizacije za ekonomsko sodelovanje in razvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)) deluje posebna delovna skupina »Endocrine Disrupter Testing and Assessment«, ki skrbi za čim večje poenotenje testiranj hormonskih motilcev v različnih državah. Poleg *in silico* metod spadajo med postopke za vrednotenje reproduktivne toksičnosti tudi *in vitro* testi, s katerimi med drugim ugotavljajo vezavo na receptorje, vpliv na proliferacijo celic in transkripcijsko aktivacijo receptorjev ter *in vivo* testi za dokazovanje učinkov na določen hormonski sistem, na več hormonskih sistemov in na celoten organizem (28).

Trenutno večina raziskav za reproduktivno toksičnost poteka *in vivo* na živalih, kjer se testira več generacij in spremlja vplive na endokrini sistem, teratogenost, morfologijo reproduktivnih organov in spremljanje sprememb pri spolnem vedenju. V EU se za označevanje spojin, ki so toksične za reprodukcijo, uporablja sistem CMR (Carcinogenic, Mutagenic, Reprotoxic) za ocenjevanje kancerogenosti, mutagenosti in toksičnosti za reprodukcijo. Znotraj te klasifikacije za spojine toksične za reprodukcijo obstaja še nadaljnja razvrstitev v 3 kategorije (30). Ta sistem velja tudi za kozmetične izdelke, in sicer so sestavine, ki spadajo v kategorijo 1 ali 2 reproduktivne toksičnosti sistema CMR, prepovedane za uporabo v kozmetiki.

1.5. *IN SILICO* METODE

In silico je izraz za način dela, ki se izvaja na računalniku oz. z računalniško simulacijo (31). Razmah in napredek *in silico* metod korelira z razvojem računalnikov in informacijskih sistemov. Takšen način dela je začel pridobivati na pomenu v devetdesetih letih 20. stoletja, ko se je na področju farmacije s pojavom kombinatorne kemije in reševanja pojavila potreba po čim bolj učinkovitih in hitrih metodah, ki bi v kratkem času podale veliko uporabnih informacij skupaj z rezultati za ADMET (absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje, toksičnost) lastnosti. Razvoj in uporaba alternativnih metod za testiranje kemijskih spojin je podprta tudi s strani EU z uredbo REACH. Možnosti pozitivnega doprinosa *in silico* metod so izjemne, vendar so kljub obsežnemu delu na tem področju te metode trenutno omejeno uporabne (29). Z razvojem in povečanjem uporabe *in silico* metod bi v prihodnosti zmanjšali (ali morda celo odpravili) testiranja in žrtvovanje živali, prihranili čas in denar, zmanjšali količino uporabljenih kemikalij in posredno tudi pozitivno vplivali na varovanje okolja.

1.5.1. (Q)SAR MODELI IN EKSPERTNI SISTEMI

In silico metode vključujejo delovanje na različnih računalniških programih, modelih s kvantitativnim razmerjem med strukturo in aktivnostjo ((Quantitative) Structure–Activity Relationship ((Q)SAR), ekspertnih sistemih, podatkovnih bazah in računalniških modeliranjih (31). S (Q)SAR modeli napovemo fizikalno-kemijske in biološke lastnosti na podlagi kemijske strukture spojin. SAR je kvalitativno razmerje, ki povezuje posamezne dele strukture in glede na prisotnost/odsotnost posameznih delov molekule poda binarno napoved. QSAR je matematični model in povezuje tri elemente: lastnosti spojine, na kateri temelji model, učinka ali končni točki, ki ga model napove in algoritma, ki opisano pretvori v odziv oz. končno točko (32). Za regulatorne namene morajo biti (Q)SAR modeli validirani. Ekspertni sistemi uporabljajo za delovanje obstoječe znanje, ki ga za napovedi združujejo z računalniškimi programi za izvrševanje sklepanja (33). Programiranje takšnih logičnih modelov je precej zahtevno, pravila je potrebno med seboj povezati in določiti prioritete pri samem sklepanju. Upoštevanje različnih možnosti, kombinacij in prioritet podatkov se lahko na podlagi novih ugotovitev uporabi za nadgradnje. Pri ekspertnih

sistemih je zaradi delovanja na podlagi obstoječega znanja potrebno konstantno vključevanje novih dejstev, znanj in podatkov zadnjih raziskav. Pri *in silico* metodah lahko danes uporaben program čez nekaj let, brez vmesnih nadgradenj programerjev in dodajanja novega znanja strokovnjakov s področja, postane popolnoma neuporaben. Poleg razvoja novih *in silico* modelov so izboljšave obstoječih programov izjemnega pomena.

1.5.2. *IN SILICO* NAPOVEDOVANJE METABOLIZMA

In silico napoved metabolizma posnema delovanje hepatocitov z vgrajenimi programi za encimske sisteme, biokatalizo reakcij, elektrokemijske in svetlobne oksidacije ter drugimi *in silico* modeli (34). Pri napovedovanju metabolizma se ti programi uporabljajo tudi za izločevanje metabolitov, ki so kemijsko nestabilni. Napovedi imajo različne pristope: (i) napovedovanje mesta v kemijski strukturi, kjer je verjetnost, da bo metabolizem potekel, (ii) napovedovanje reakcij biotransformacij skupaj s podanimi metaboliti (naš uporabljen program Meteor Nexus), (iii) napovedovanje verjetnosti reakcije z encimi, ki sodelujejo pri poteku metabolizma, (iv) napovedovanje aktivnosti encimov in (v) napovedovanje metabolične stabilnosti spojine v telesu. Obsežne podatkovne baze, ki se uporabljajo pri izgradnji modelov so na primer Accelrys Metabolite Database (35), DrugBank (36), MetaBase (37) in ADME DB (38).

1.5.3. *IN SILICO* NAPOVEDOVANJE ENDOKRINIH UČINKOV

Največ podatkov in informacij za izgradnjo *in silico* modelov za napovedovanje endokrinih učinkov je na voljo za estrogenske in androgene receptorje. Za delovanje in napovedi uporabljajo različne pristope kot so (Q)SAR, računalniško modeliranje, simulacije molekularne dinamike, virtualno molekulske skeniranje, sidranje v receptorje idr. (39). Kompleksnost endokrinega sistema predstavlja za nadaljnji razvoj *in silico* metod velik izziv in smer, za katero se predvideva, da bo vedno bolj podprta tudi s strani regulatornih organov in EU. Podatkovne baze, ki se uporabljajo pri modelih za napoved endokrinih učinkov, so na primer EDCs DataBank (40), EDKB (41), The Comparative Toxicogenomics Database (42) in NureXbase (43).

1.5.4. *IN SILICO* NAPOVEDOVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI

Zanesljivost *in silico* metod je na področju napovedovanja reproduktivne toksičnosti še dokaj šibka. Kompleksnost vidika reproduktivne toksičnosti, obstoja nekaterih še ne dokončno razumljenih mehanizmov delovanja in prepletanje z drugimi sistemi v telesu predstavlja težavo pri programiranju in hkrati daje veliko prostora za vgradnjo prepletanja informacij, kar lahko rezultira v neenotnosti različnih *in silico* modelov. Podatkovne baze, ki se uporabljajo pri modelih za napoved vidikov reproduktivne toksičnosti so na primer TOXNET DART (44), OECD QSAR Toolbox (45), Toxicity Reference Database (46) in The Comparative Toxicogenomics Database (42).

2. NAČRT ZA DELO

Derivati kafe so pogosto uporabljeni kot UV-filtri, zato smo jim ljudje vsakodnevno izpostavljeni. Pri ocenah varnosti teh derivatov se mnenja strokovnjakov razlikujejo, saj so eksperimentalni podatki o njihovi toksičnosti pomankljivi ali dvoumni. Pri našem delu bomo z različnimi *in silico* metodami napovedali metabolizem derivatov kafe, endokrine učinke in reproduktivno toksičnost.

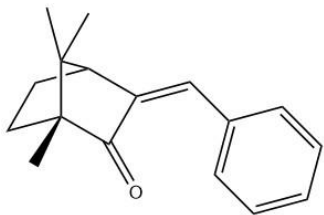
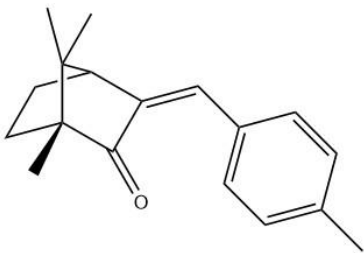
- a) Za napoved metabolizma izbranih derivatov kafe, 3-BK in 4-MBK, bomo uporabili računalniški program **Meteor Nexus**.
- b) Metabolite, ki jih bomo dobili kot rezultat napovedi poteka metabolizma, bomo zbrali za nadaljnjo analizo.
- c) Za napoved endokrine toksičnosti izbranih derivatov kafe in zbranih metabolitov 3-BK in 4-MBK bomo uporabili računalniška programa **VegaNIC – Relative Binding Affinity model** in **Endocrine Disruptome**.
- d) Za napoved vidikov reproduktivne toksičnosti izbranih derivatov kafe in zbranih metabolitov 3-BK in 4-MBK bomo uporabili računalniške programe **Derek Nexus**, **The Toxicity Estimation Software Tool (TEST)**, **VegaNIC - Developmental Toxicity (CAESAR) 2.1.7** in **VegaNIC - Developmental/Reproductive Toxicity Library (PG) 1.0.0**.
- e) Dobljene rezultate programov bomo ovrednotili in primerjali z rezultati do sedaj opravljenih *in vitro* ter *in vivo* raziskav.

3. METODE IN MATERIALI

3.1. IZBRANI DERIVATI KAFRE

Pri raziskovanju metabolizma, endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti smo se osredotočili na derivata kafe, ki se uporabljata kot UV-filtra v kozmetičnih izdelkih. 3-BK je v EU že prepovedana za uporabo v kozmetičnih izdelkih, od 18. februarja 2016 na trgu namreč ne smejo več biti prisotni kozmetični izdelki, ki jo vsebujejo (47). 4-MBK oz. enzakamen je v EU dovoljen kot UV-filter, in sicer v koncentraciji do največ 4% v gotovem kozmetičnem izdelku (1). V preglednici sta prikazani strukturni formuli, Simplified Molecular Input Line Entry Specification (SMILES) kodi, INN poimenovanje in CAS številki za izbrana preučevana derivata kafe.

Preglednica II: Izbrana in preučevana derivata kafe s pripadajočo strukturno formulo, INN imenom, CAS številko in SMILES kodo.

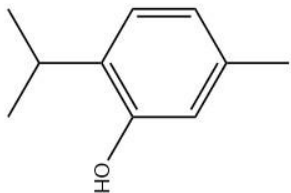
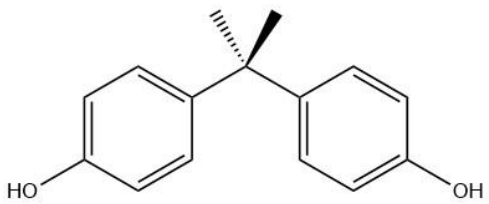
3-BENZILIDENKAFRA	4-METILBENZILIDENKAFRA
	
INN: / CAS: 15087-24-8 SMILES: <chem>CC1(C2CCC1(C(=O)C2=Cc3ccccc3)C)C</chem>	INN: enzakamen CAS: 36861-47-9 / 38102-62-4 SMILES: <chem>CC1=CC=C(C=C1)C=C2C3CCC(C2=O)(C3(C)C)C</chem>

3.2. NEGATIVNA IN POZITIVNA KONTROLA

Kot negativno kontrolo smo izbrali timol, ki v svoji strukturi vsebuje aromatski obroč in hidroksilno skupino na aromatskem obroču. Strukturno gledano je timol ustrezna negativna kontrola, saj predvidevamo, da bo metabolizem naših dveh spojin prav tako potekal v smeri hidroksilacije na aromatskem obroču. Timol se v dosedanjih študijah ni izkazal kot spojina z vplivom na endokrino toksičnost ali kot hormonski motilec (48). Leta 2009 je ameriška Agencija za varstvo okolja (Environmental Protection Agency (EPA)) pregledala

strokovno literaturo glede toksičnosti in vpliva na okolje ter zaključila, da spada timol med spojine z minimalnim toksičnim potencialom in tako predstavlja kemikalijo z minimalnim tveganjem (49). Timol je naravno prisoten v rastlinah, med drugimi tudi v timijanu, origanu, solnograški smetliki in indijanski koprivi. Kot pozitivno kontrolo smo izbrali bisfenol A (bisphenol A (BPA)), ki spada med bolj raziskane spojine z vplivom na reproduktivno in endokrino toksičnost, z dokazano aktivnostjo na ER, AR, TR, pregnanskih receptorjih ter jedrnih receptorjih PPAR. (50) V EU in Kanadi je prepovedana njegova uporaba v plastenkah za dojenčke (51), Francija pa je februarja 2016 objavila namero o predlogu za uredbo REACH o uvrstitvi BPA med kemikalije z zelo visokim tveganjem za zdravje (52). V preglednici sta prikazani strukturni formuli, SMILES kodi in CAS številki za izbrano negativno kontrolo timol in pozitivno kontrolo BPA.

Preglednica III: Izbrani kontroli s pripadajočo strukturno formulo, CAS številko in SMILES kodo.

<p>TIMOL</p>  <p>CAS: 89-83-8 SMILES: <chem>Cc1ccc(c(c1)O)C(C)C</chem></p>	<p>BISFENOL A</p>  <p>CAS: 80-05-7 SMILES: <chem>CC(C)(c1ccc(cc1)O)c2ccc(cc2)O</chem></p>
--	--

3.3. UPORABLJENI RAČUNALNIŠKI PROGRAMI IN SPECIFIKACIJA NASTAVITEV

3.3.1. PROGRAM ZA NAPOVED METABOLIZMA

- **Uporabljen program:** Meteor Nexus, Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK
- **Različica:** Meteor: 1.0.0; Meteor Nexus: 2.1.0; Nexus: 2.0.0
- **Dostop:** plačljiv program na računalniku Fakultete za farmacijo
- **Uporabljene nastavitve:** Species: Mammals; Processing direction: Breadth first; Phase constraints: Don't grow from phase II products; Max. depth: 2; Max

Metabolites: 1000; Min. Likelihood: EQUIVOCAL; Apply relative reasoning: no;
Level cutoff: 2

Meteor Nexus je program za napoved metabolizma kemijskih spojin, razvit na podlagi ekspertnega sistema. Znanstveniki organizacije Lhasa Limited program redno dopolnjujejo z novimi spoznanji na področju biotransformacije (53). Baza podatkov, ki podpira delovanje programa, izhaja iz dveh komponent - iz kvalitativnega pristopa, ki obsega pravila verjetnosti nastopa reakcij biotransformacije in iz statistične ocene verjetnosti nastopa določene reakcije na podlagi eksperimentalnih podatkov iz raziskav. Oba vhoda podatkov sta združena v obsežen slovar biotransformacij, ki generira podatke napovedi metabolizma (54, 55). Program prikaže rezultate kot opise reakcij, ki vodijo iz izhodne spojine do napovedanih metabolitov in pri tem definira encim, ki katalizira posamezno reakcijo. Napovedane reakcije zajemajo metabolizem 1. in 2. faze. Program do neke mere omogoča uporabniško kontrolo, s katero lahko sami izberemo število stopenj verjetnosti nastopa metabolizma (55). Verjetnost napovedi je v programu določena s petimi stopnjami: *probable* – verjetno, *plausible* – možno, *equivocal* – dvomno, *doubted* – dvomljivo in *improbable* – malo verjetno. Program pri napovedih upošteva lipofilnost spojin in dejstvo, da imajo manj lipofilne spojine manjšo sposobnost prehajanja v celice. Program lahko napove tudi lažno pozitivne rezultate, zato je potrebno imeti v mislih, da so napovedani metaboliti rezultat računalniškega sklepanja, ki služi kot učinkovita pomoč za nadaljnje raziskovalno delo in preučevanje dobljenih metabolitov.

3.3.2. PROGRAMA ZA NAPOVED ENDOKRINIH UČINKOV

VEGANIC – MODEL ZA AFINITETO VEZAVE:

- **Uporabljen program:** VegaNIC, Istituto di Ricerce Farmacologiche Mario Negri, Milano, Italy
- **Različica:** 1.0.1
- **Dostop:** program je na voljo za prenos na: <http://www.vega-qsar.eu/download.html>
- **Uporabljene nastavitve:** Model: Relative Binding Affinity Model version 1.0.0

VegaNIC je program, ki po namestitvi na računalnik deluje s pomočjo prenosljivega programskega jezika Java in za uporabo ne zahteva spletne povezave ter podatkov ne prenaša preko interneta. Rezultati so podani v formatu csd ali pdf. Platforma VegaNIC je bila primarno razvita za regulatorne namene, za podporo uredbi REACH (56). Poleg znanstvenega inštituta Istituto di Ricerce Farmacologiche Mario Negri so k razvoju med drugimi pripomogli tudi italijanski Politecnico di Milano, ameriška EPA, britanska Raziskovalna agencija za hrano in okolje (Food and Environment Research Agency (FERA)) ter slovenski Kemijski inštitut (57). V programu so na voljo številni QSAR modeli, večina sloni na projektu CAESAR od koder prihajajo znanstveno veljavni modeli za določanje razvojne toksičnosti, senzibilizacije kože, kancerogenosti in mutagenosti. Vsi modeli, ki so na voljo za analizo spojin, so razdeljeni v štiri skupine: toksičnost - 12 modelov, ekotoksičnost - 5 modelov, okoljski vplivi - 7 modelov in fizikalno-kemijske lastnosti - 3 modeli. Med modeli za določevanje toksičnosti je na voljo model Relative Binding Affinity Model, ki smo ga uporabili pri našem delu in ki napoveduje afiniteto vezave spojine na ER. Njegovo delovanje temelji na QSAR klasifikacijskem modelu in algoritmu klasifikacijskega in regresijskega drevesa (57). Znotraj modela je že nameščenih 806 spojin, za preučevanje pa lahko v sistem vnesemo izbrano spojino v obliki SMILES kode ali v formatu sdf. Program izpiše rezultate v zelo pregledni obliki, kjer je s številom rumeno obarvanih zvezdic označena stopnja zanesljivosti napovedi: (a) tri obarvane zvezdice pomenijo, da je napoved zanesljiva in da se analizirana spojina nahaja znotraj območja uporabnosti modela (**); (b) dve obarvani zvezdici pomenita, da bi se spojina lahko nahajala zunaj modela območja uporabnosti modela in tako obstajajo dvomi o zanesljivosti napovedi (**); (c) ena obarvana zvezdica pa pomeni, da se vnesena spojina nahaja izven območja uporabnosti modela in tako napoved ni zanesljiva (*). Z rdečo oz. zeleno barvo je označena napoved toksičnosti: zelen krogec – spojina ni toksična, rdeč krogec – spojina je toksična. Pri vsaki *in silico* analizirani spojini program poleg rezultata izpiše še rezultate podobnih spojin, ki so že nameščene v sistem programa.

ENDOCRINE DISRUPTOME:

- **Uporabljen program:** Endocrine Disruptome, avtorja: Katra Kolšek in Samo Turk, podprto s strani Fakultete za farmacijo, Univerza v Ljubljani in Kemijskega inštituta
- **Dostop:** direkten dostop na <http://endocrinedisruptome.ki.si/prediction.html>
- **Uporabljene nastavitve:** ni nastavitvev

Program Endocrine Disruptome je na voljo preko interneta in nam poda napoved za stopnjo vezave na 12 različnih struktur jedrnih receptorjev (58). Zaradi svoje dostopnosti in enostavnosti uporabe je zelo priročen za napovedovanje potenciala endokrine toksičnosti ter za oceno nadaljnjih korakov toksikološkega preučevanja spojin. Program poda afiniteto vezavo za naslednje receptorje: AR, ER α , ER β , GR, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ , RXR α , TR α in TR β . Za receptorje AR, ER α , ER β in GR program napove vezave za dve različni konformaciji, za vezavo kot agonist (oznaka »n« poleg receptorja) in vezavo kot antagonist (oznaka »an« poleg receptorja). Program deluje na platformi DoTS – Docking interface for Target Systems, ki uporablja program AutoDock Vina za napoved sidranja preučevanih spojin v predhodno validirane strukture ligandov (59). Analizirano spojino lahko vnesemo v obliki SMILES kode ali pa jo narišemo s pomočjo programa ChemDoodle Sketcher, ki je integriran v Endocrine Disruptome. Rezultati napovedi afinitete receptorjev do izbrane spojine so podani v obliki številke in obarvani glede na stopnjo verjetnosti vezave: **rdeča** – največja verjetnost vezave, **oranžna** – velika verjetnost vezave, **rumena** – srednja verjetnost vezave, **zelena** – majhna verjetnost vezave. Dobljene številke pomenijo vrednost proste energije vezave izražene v kcal/mol in so določene za vsak receptor posebej. Bolj kot je številka negativna, večja je verjetnost vezave spojine na receptor. Klasifikacijo mejnih vrednosti si lahko pogledamo na spletni strani pri opisu vsakega posameznega receptorja (58). Za vsak receptor je pod opisom tarčnih mest prikazan tudi graf vezave v primeru agonista, za določene receptorje pa še v primeru antagonista. Validacija je bila za vse strukture receptorjev izvedena z močnimi ligandi; posledično avtorji programa opozarjajo na previdnost pri interpretaciji rezultatov vezave

šibkih ligandov – v primeru kronične izpostavljenosti spojini lahko rezultat manjše verjetnosti vezave na receptor še vedno predstavlja potencialno nevarnost za zdravje.

3.3.3. PROGRAMI ZA NAPOVED REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI

DEREK NEXUS:

- **Uporabljen program:** Derek Nexus, Lhasa Limited, Yorkshire, UK
- **Različica:** Derek Nexus: 4.1.0; Nexus: 2.0.0
- **Dostop:** plačljiv program na računalniku Fakultete za farmacijo
- **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 bil razvit na podlagi ekspertnega sistema za napoved metabolizma kemijskih spojin pod okriljem znanstvenikov organizacije Lhasa Limited in napove toksičnost preučevanih spojin. Baza podatkov, na kateri program deluje, se stalno dopolnjuje z novimi spoznanji na področju toksikologije (60). Program je namenjen *in silico* preučevanju spojin v zgodnjih fazah toksikoloških analiz ali za pripravo na čim bolj usmerjeno raziskovalno delo *in vitro* ali *in vivo*. Operira na podlagi mehanizmov delovanja različnih spojin, kemijskih reakcij, poznanih toksikoloških primerov in pravil za določevanje posameznih vrst toksičnosti - med njimi tudi vidike reproduktivne toksičnosti, kancerogenost, mutagenost, genotoksičnost in iritacije različnih organov ter organskih sistemov (61). Pri ugotavljanju vidikov reproduktivne toksičnosti nam je program izdal opozorilo v primeru razvojne toksičnosti, teratogenosti ali testikularne toksičnosti ter posebej označil del strukture, ki je odgovoren za dobljeni rezultat. Za določanje verjetnosti uporablja devet različnih stopenj: *certain* – gotovo, *probable* – verjetno, *plausible* – možno, *equivocal* – dvoumno, *doubted* – dvomljivo, *improbable* – malo verjetno, *impossible* – nemogoče, *open* – odprto/ni dokazov, *contradicted* – kontradiktorno/ obstaja dokaz za in proti. Mi smo v nastavitvah določili, da želimo podatke samo za spojine, ki imajo vsaj dvoumno verjetnost za reproduktivno toksičnost. Vnos spojine v sistem je

možen z risanjem kemijske strukture ali z uvozom strukture v obliki formata sdf, mol ali skc.

VEGANIC – MODELA ZA RAZVOJNO/REPRODUKTIVNO TOKSIČNOST:

- **Uporabljen program:** VegaNIC, Istituto di Ricerce Farmacologiche Mario Negri, Milano, Italy
- **Različica:** 1.0.1
- **Dostop:** program je na voljo za prenos na: <http://www.vega-qsar.eu/download.html>
- **Uporabljene nastavitve:** model: Developmental Toxicity Classification Model version 2.1.7 (CAESAR); model: Developmental/Reproductive Toxicity virtual library version 1.0.0 (PG)

Prvi model »Developmental Toxicity Classification Model (CAESAR)« poda rezultate v obliki kvalitativne napovedi razvojne toksičnosti na podlagi binarne klasifikacije Uprave ZDA za hrano in zdravila (Food and Drug Administration (FDA)), ki je implementirana znotraj programa Vega (57). Model je razširitev prvotnega modela CAESAR, ki je prosto dostopen na spletu. Projekt CAESAR je ustanovila in podprla Evropska komisija za specifične potrebe uredbe REACH s poudarkom na napovedovanju faktorja biokoncentracije, senzibilizacij na koži, kancerogenosti, mutagenosti in razvojne toksičnosti (62). Drugi model »Developmental/Reproductive Toxicity virtual library (PG)« poroča v obliki kvalitativne napovedi razvojne in reproduktivne toksičnosti, ki temelji na binarni klasifikaciji verjetnosti in je prav tako vgrajen znotraj platforme Vega. Model obsega virtualno knjižnico 641 toksičnih spojin, ki so jih opisali v raziskavi podjetja Procter & Gamble (57). Potencialne toksične spojine so identificirali in jih razdelili v 25 kategorij, ki jih model ob vnosu spojine implementira in poskuša najti ujemanje med vneseno, analizirano spojino in spojino iz virtualne knjižnice. V primeru ujemanja je spojina označena kot toksična. Za analizo spojin je na voljo vnos v obliki SMILES kode ali pa v formatu mol. V poročilu programa se izpiše ali je spojina razvojno/reproduktivno toksična ali ne, poleg tega pa je označena še stopnja zanesljivosti napovedi: (a) tri rumeno obarvane zvezdice pomenijo, da je napoved zanesljiva, in da se analizirana spojina nahaja znotraj območja uporabnosti modela (***) (b) dve obarvani zvezdici pomenita, da bi se

spojina lahko nahajala zunaj modela območja uporabnosti modela in tako obstajajo dvomi o zanesljivosti napovedi (**); (c) ena obarvana zvezdica pa pomeni, da se vnesena spojina nahaja izven območja uporabnosti modela in tako napoved ni zanesljiva (**).

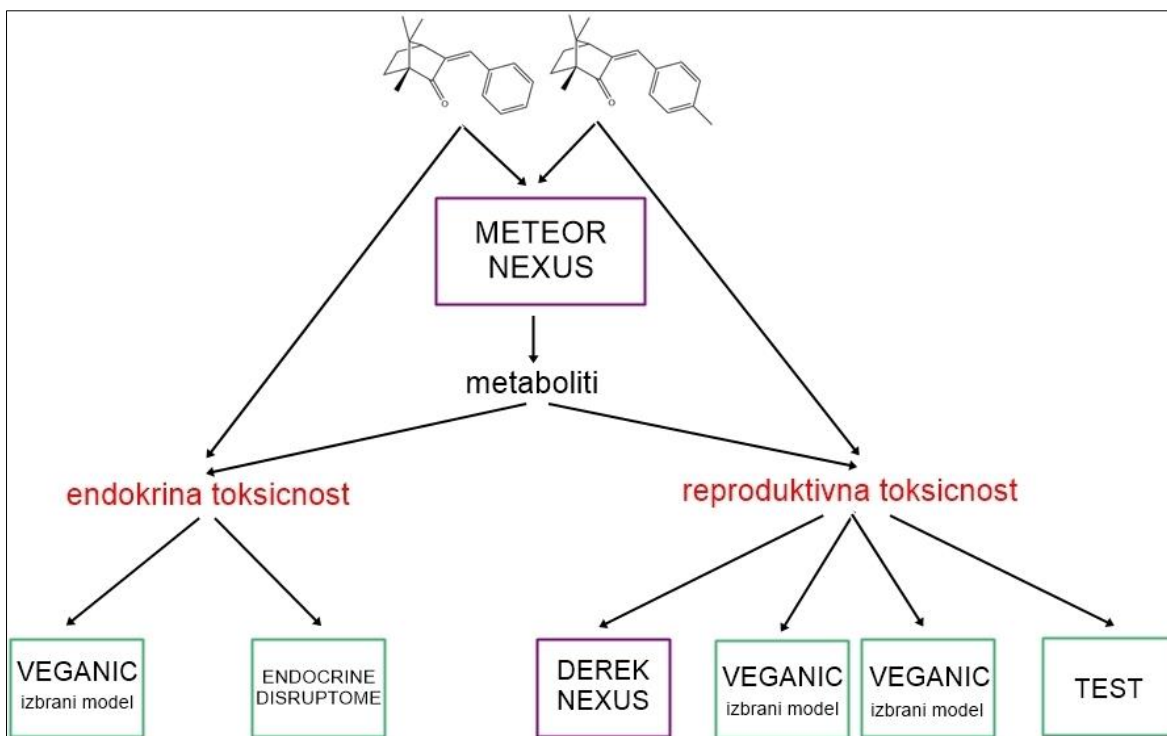
TEST:

- **Uporabljen program:** Toxicity Estimation Software Tool (TEST), ZDA EPA
- **Različica:** 4.1
- **Dostop:** program je na voljo za prenos na: <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>
- **Uporabljene nastavitve:** Endpoint: Developmental toxicity; Method: Consensus

Program TEST izhaja iz modelov QSAR in je bil razvit z namenom enostavnega ocenjevanja toksičnosti spojin. Matematični modeli s pomočjo linearnih funkcij napovejo toksičnost na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti strukture preučevane spojine (63). Pri napovedih so upoštevani različni parametri toksičnosti, na primer izračuni LC50 (koncentracija, ki povzroči smrt pri 50% izpostavljenih osebkov/živali) pri ribah, LD50 (odmerek, ki povzroči smrt pri 50% izpostavljenih osebkov/živali) pri podganah, bioakumulacijski faktorji, mutagenost in razvojna toksičnost. Trenutni model programa obsega naslednje fizikalne parametre: vrelišče, plamenišče, površinsko napetost, viskoznost, gostoto, vodotopnost, termično prevodnost, parni tlak in tališče. V program se spojina lahko vnese v obliki SMILES kode, formata mol ali pa se jo nariše v grafični vmesnik. Poročilo analize je podano v obliki url povezave, ki se ga po želji lahko shrani v pdf dokument, zajema pa napoved verjetnosti razvojne toksičnosti izbrane spojine.

3.4. POTEK DELA Z UPORABLJENIMI METODAMI

Za boljšo preglednost smo potek dela z uporabljenimi *in silico* metodami prikazali na spodnji sliki. Programi ekspertnega sistema Nexus so plačljivi, ostali programi pa so prosto dostopni za uporabo na spletu oz. za namestitev na računalnik. Pri uporabi programa VEGANIC in TEST je za delovanje potrebna predhodna namestitev in vzpostavitev delovanja preko programa Java.



Slika 1: Shematski prikaz poteka dela *in silico* vrednotenja metabolizma, endokrine in reproduktivne toksičnosti; legenda: vijolični okvir – plačljiv programi, zeleni okvir – prosto dostopen program za prenos in namestitvev ali za uporabo na spletu.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. METABOLIZEM 3-BK in 4-MBK

Za ugotavljanje metabolizma 3-BK in 4-MBK smo uporabili program Meteor Nexus. Poleg reakcije metabolizma nam program izpiše tudi encime, ki sodelujejo pri določeni reakciji; v našem primeru so to bili citokrom P450 (CYP450), glutation-S-transferaza (GST), alkohol-dehidrogenaza (ADH), uridindifosfat – glukuronoziltransferaza (UGT), sulfotransferaza (SULT), epoksid hidrolaza (EH), peroksidaza, peptidaza, N-acetiltransferaza (NAT). Potek metabolizma program označi s stopnjo verjetnosti, v našem primeru smo določili, da želimo podatke za naslednje stopnje: *certain* – gotovo, *probable* – verjetno, *plausible* – možno, *equivocal* – dvomno. Omenjene stopnje verjetnosti se lahko uporabljajo za znanstveno in strokovno delo, saj s takšnim opisom verjetnosti izrazimo težo do sedaj zbranih dokazov, ki so upoštevane v programu (8, 64).

Rezultate programa, poti biotransformacij in metabolite izbranih derivatov kafe smo za boljšo preglednost poteka metabolizma predstavili v obliki napovednih shem.

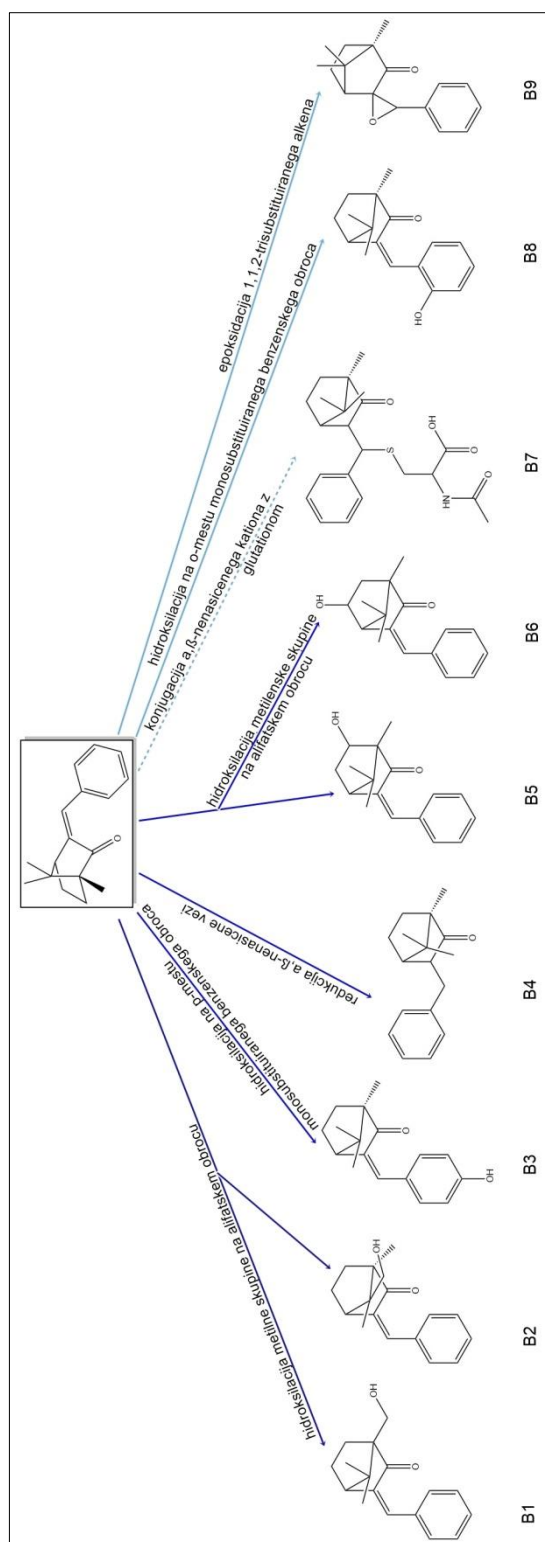
4.1.1. 3-BENZILIDENKAFRA

Napoved metabolizma 3-BK po programu Meteor Nexus nam v prvi stopnji reakcij poda rezultat za sedem poti metabolizma:

I. STOPNJA

1. S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na alifatskem obroču do produkta **B1** in **B2** (stopnja verjetnosti: verjetno)
2. S CYP450 katalizirana hidroksilacija na *p*-mestu monosubstituiranega benzenskega obroča do produkta **B3** (stopnja verjetnosti: možno)
3. Z encimsko katalizirana redukcija α,β -nenasičene vezi do produkta **B4** (stopnja verjetnosti: možno)
4. S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilenske skupine na alifatskem obroču do produkta **B5** in **B6** (stopnja verjetnosti: možno)

5. Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **B7** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
6. S CYP450 katalizirana hidroksilacija na *o*-mestu monosubstituiranega benzenskega obroča do produkta **B8** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
7. S CYP450 katalizirana epoksidacija 1,1,2-trisubstituiranega alkena do produkta **B9** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



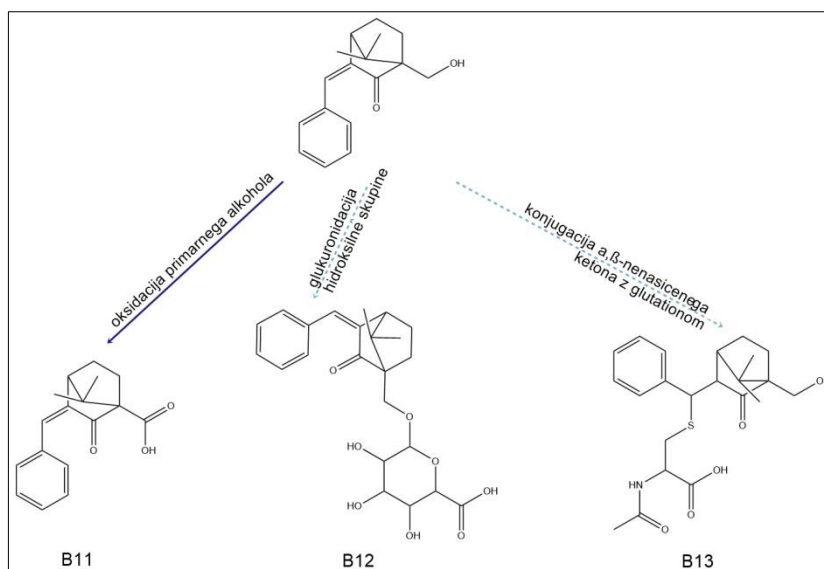
Slika 2: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA 3-BK Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

Rezultati v drugi stopnji napovedanih poti metabolizma iz produktov **B1**, **B2**, **B3**, **B4**, **B5**, **B6**, **B8**, **B9**, ki smo jih dobili v prvi stopnji:

II. STOPNJA

1a. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta B1

- Z ADH katalizirana oksidacija primarnega alkohola do produkta **B11** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **B12** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega ketona z glutationom do produkta **B13** (stopnja verjetnosti: dvoumno)

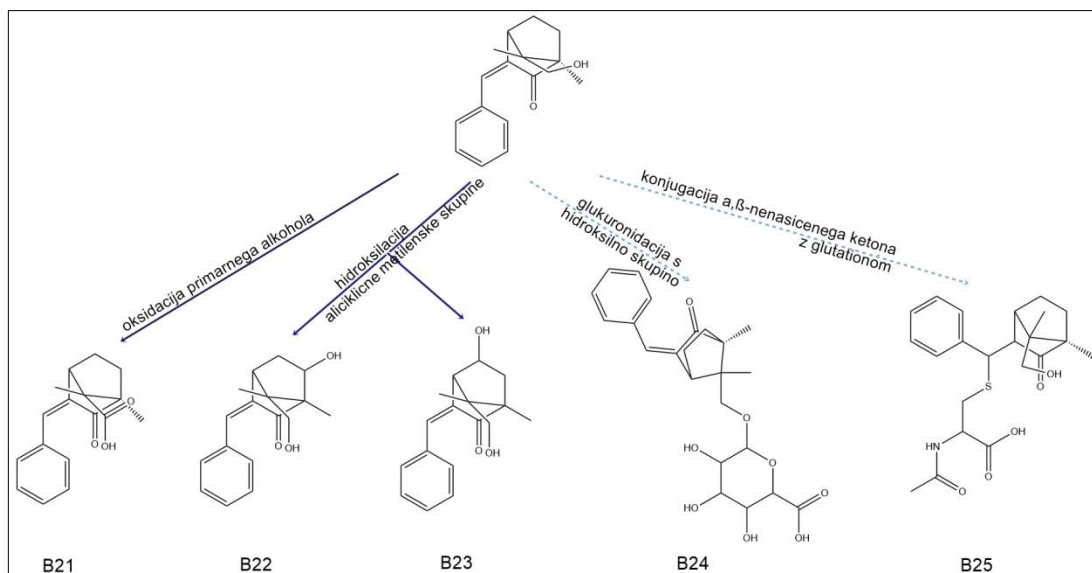


Slika 3: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE B1 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

1b. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta B2:

- Z ADH katalizirana oksidacija primarnega alkohola do produkta **B21** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **B22** in **B23** (stopnja verjetnosti: možno)

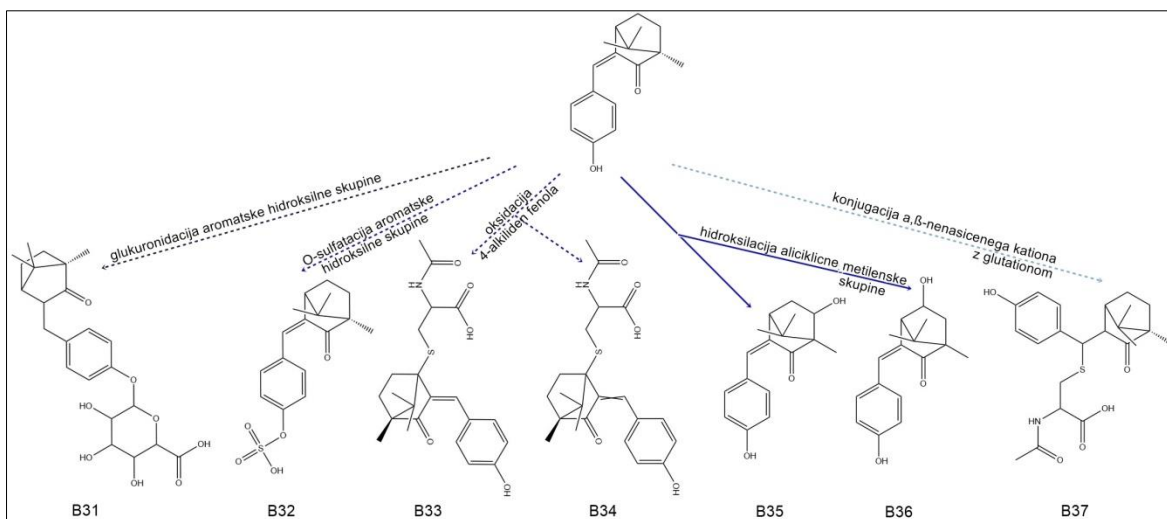
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **B24** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega ketona z glutationom do produkta **B25** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 4: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE B2 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

2. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta B3:

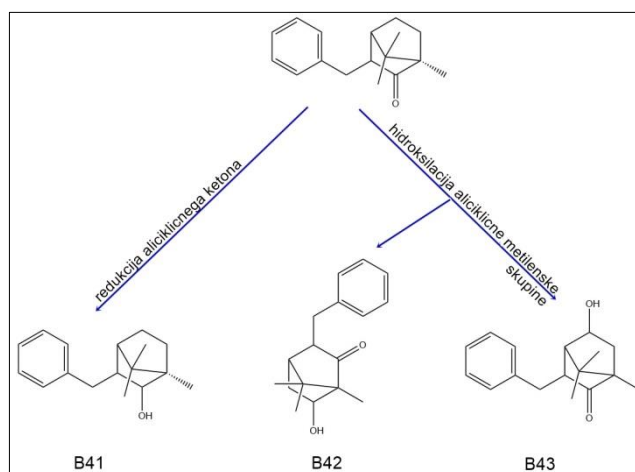
- Z UGT katalizirana glukuronidacija aromatske hidroksilne skupine do produkta **B31** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija aromatske hidroksilne skupine do produkta **B32** (stopnja verjetnosti: možno)
- S CYP450/peroksidazo/GST/GT/peptidazo/NAT katalizirana večstopenjska oksidacija 4-alkiliden fenola do produkta **B33** in **B34** (stopnja verjetnosti: možno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **B35** in **B36** (stopnja verjetnosti: možno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **B37** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 5: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE B3 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

4. Napoved nadaljnega metabolizma produkta B4:

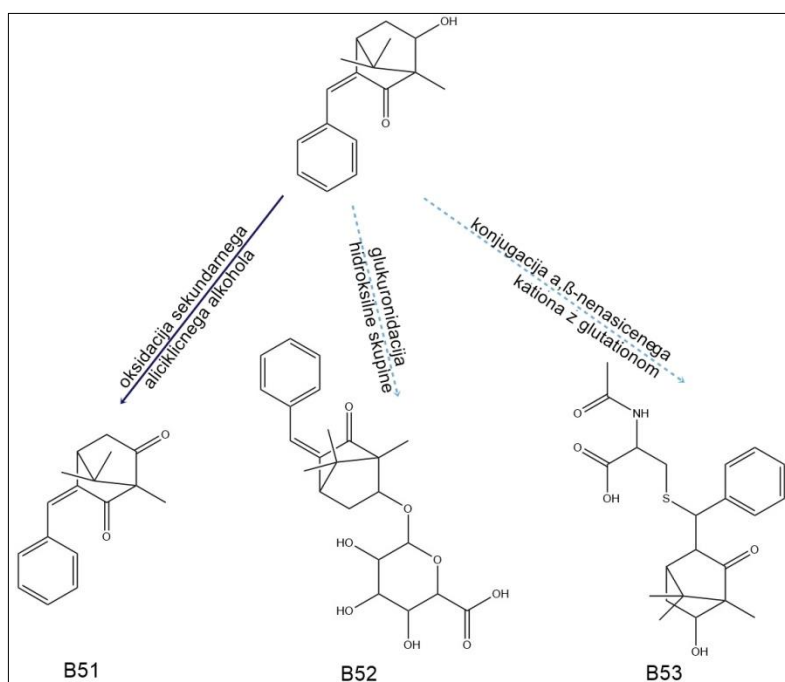
- Z ADH katalizirana redukcija alicikličnega ketona do produkta **B41** (stopnja verjetnosti: možno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **B42** in **B43** (stopnja verjetnosti: možno)



Slika 6: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE B4 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

5. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta B5:

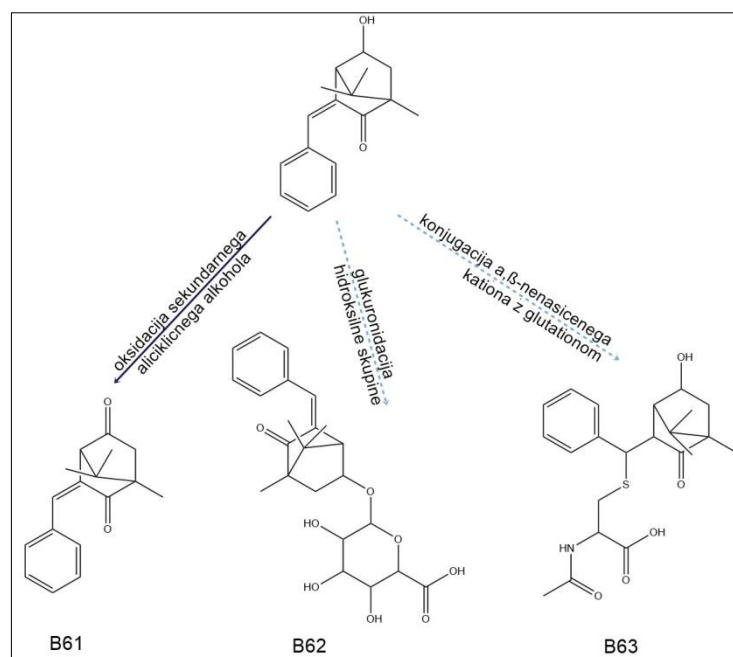
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarnega alicikličnega alkohola do produkta **B51** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **B52** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **B53** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 7: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE B5 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

6. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta B6:

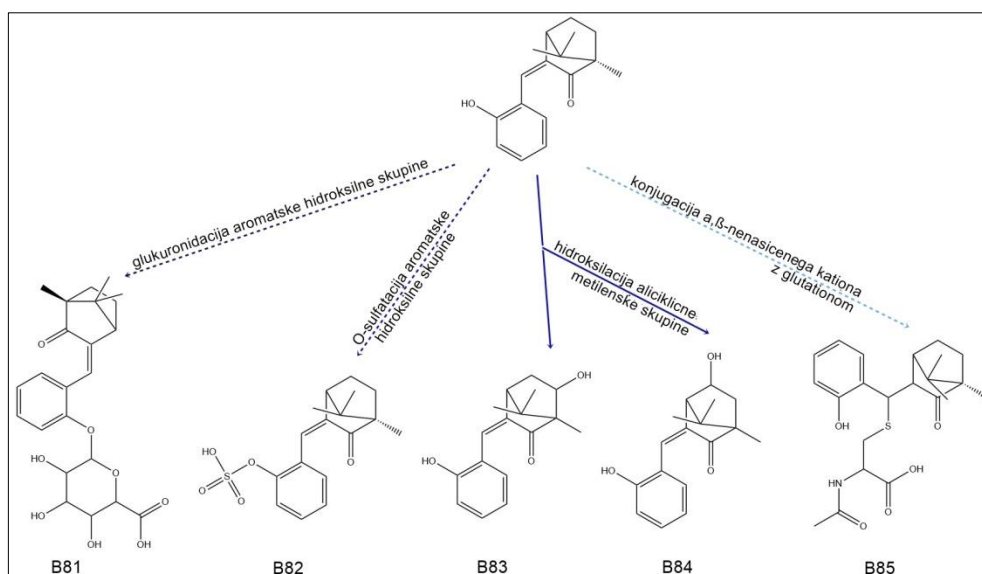
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarnega alicikličnega alkohola do produkta **B61** (stopnja verjetnosti: možno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **B62** (verjetnost: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **B63** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 8: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE B6 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

7. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta B8:

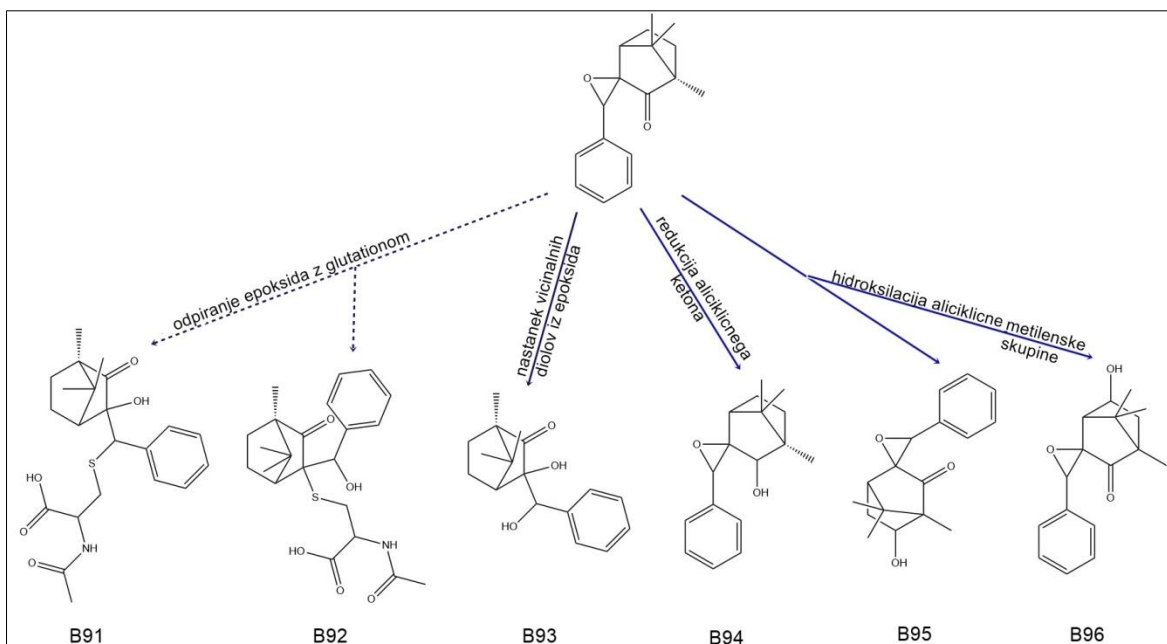
- Z UGT katalizirana glukuronidacija aromatske hidroksilne skupine do produkta **B81** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija aromatske hidroksilne skupine do produkta **B82** (stopnja verjetnost: možno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **B83** in **B84** (stopnja verjetnost: možno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **B85** (stopnja verjetnost: dvoumno)



Slika 9: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE B8 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

8. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta B9:

- Z GST katalizirano odpiranje epoksida z glutationom do produkta **B91** in **B92** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z EH kataliziran nastanek vicinalnih diolov iz epoksida do produkta **B93** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z ADH katalizirana redukcija alicikličnega ketona do produkta **B94** (stopnja verjetnosti: možno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **B95** in **B96** (stopnja verjetnosti: možno)



Slika 10: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE B9 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

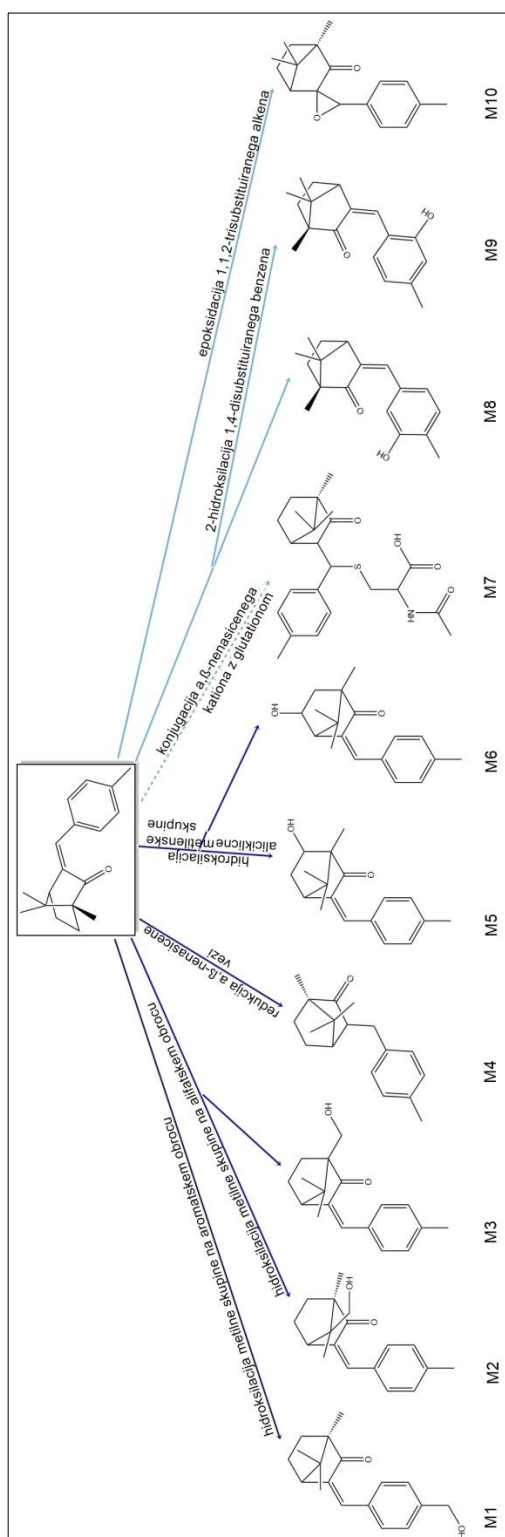
4.1.2. 4-METILBENZILIDENKAFRA

Napoved metabolizma za 4-MBK po programu Meteor Nexus nam po prvi stopnji reakcij poda rezultate za sedem poti metabolizma:

I. STOPNJA

1. S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M1** (stopnja verjetnosti: verjetno)
2. S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na alifatskem obroču do produkta **M2** in **M3** (stopnja verjetnosti: možno)
3. Encimsko katalizirana redukcija α,β -nenasičene vezi do produkta **M4** (stopnja verjetnosti: možno)
4. S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **M5** in **M6** (stopnja verjetnosti: možno)

5. Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega ketona z glutationom do produkta **M7** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
6. S CYP450 katalizirana 2-hidroksilacija 1,4-disubstituiranega benzena do produkta **M8** in **M9** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
7. S CYP450 katalizirana epoksidacija 1,1,2-trisubstituiranega alkena do produkta **M10** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



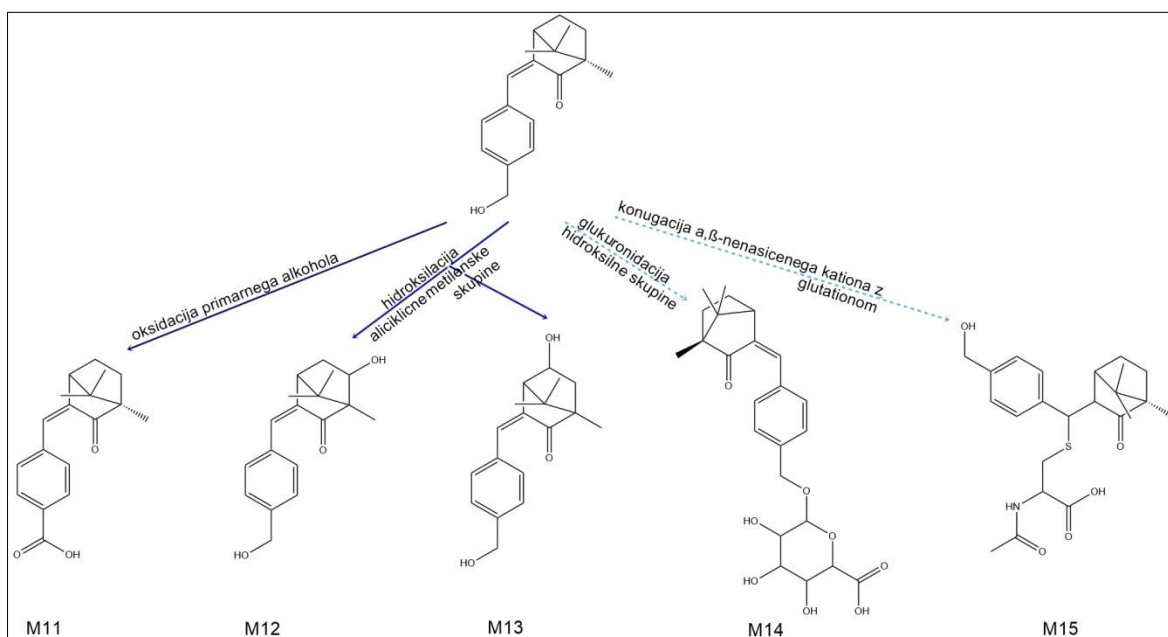
Slika 11: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA 4-MBK Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

V drugi stopnji napovedane poti metabolizma iz produktov **M1**, **M2**, **M3**, **M4**, **M5**, **M6**, **M8**, **M9**, **M10**, ki smo jih dobili kot rezultat napovedi prve stopnje:

II. STOPNJA

1. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta **M1**:

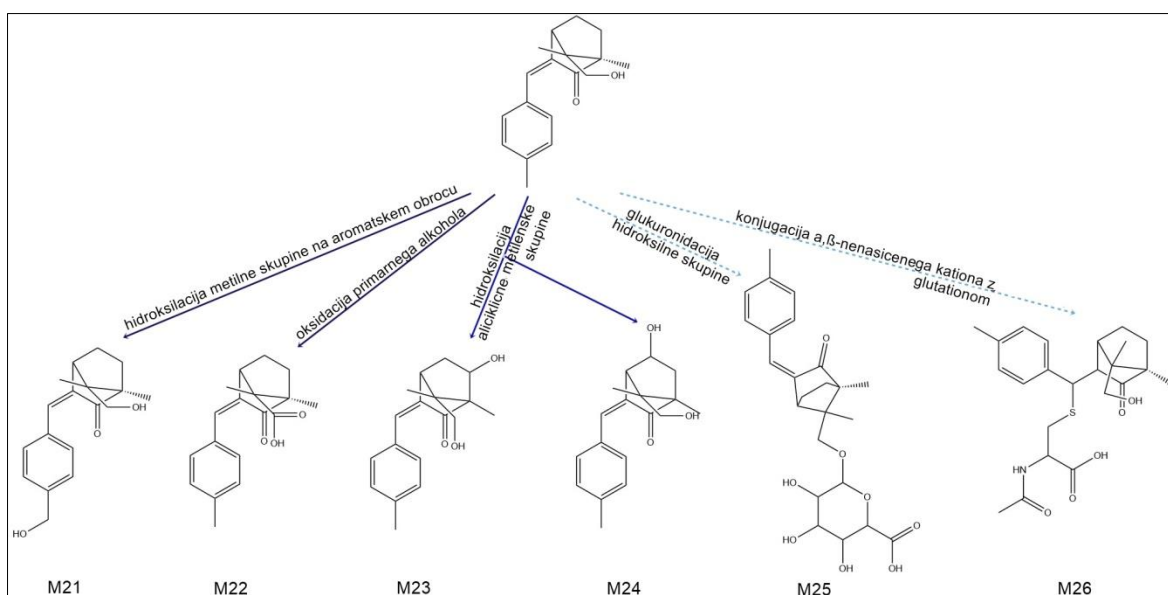
- Z ADH katalizirana oksidacija primarnega alkohola do produkta **M11** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **M12** in **M13** (stopnja verjetnosti: možno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **M14** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **M15** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 12: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M1 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

2a. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta M2:

- S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M21** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z ADH katalizirana oksidacija primarnega alkohola do produkta **M22** (stopnja verjetnost: verjetno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **M23** in **M24** (stopnja verjetnosti: možno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **M25** (stopnja verjetnost: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **M26** (stopnja verjetnosti: dvoumno)

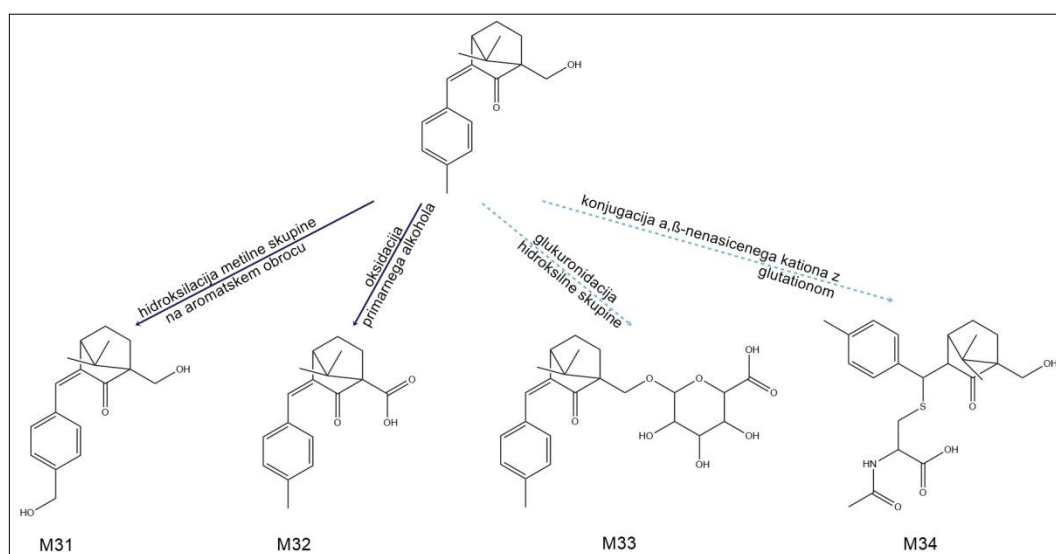


Slika 13: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M2 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

2b. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta M3:

- S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M31** (stopnja verjetnosti: verjetno)

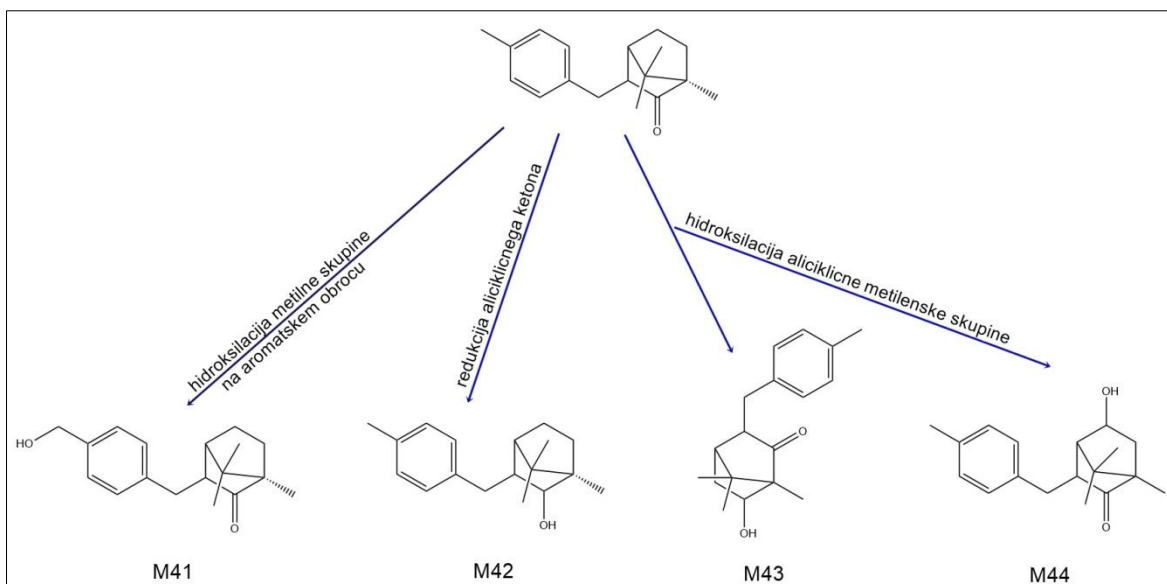
- Z ADH katalizirana oksidacija primarnega alkohola do produkta **M32** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **M33** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **M34** (stopnja verjetnost: dvoumno)



Slika 14: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M3 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

3. Napoved nadaljnje metabolizma produkta M4:

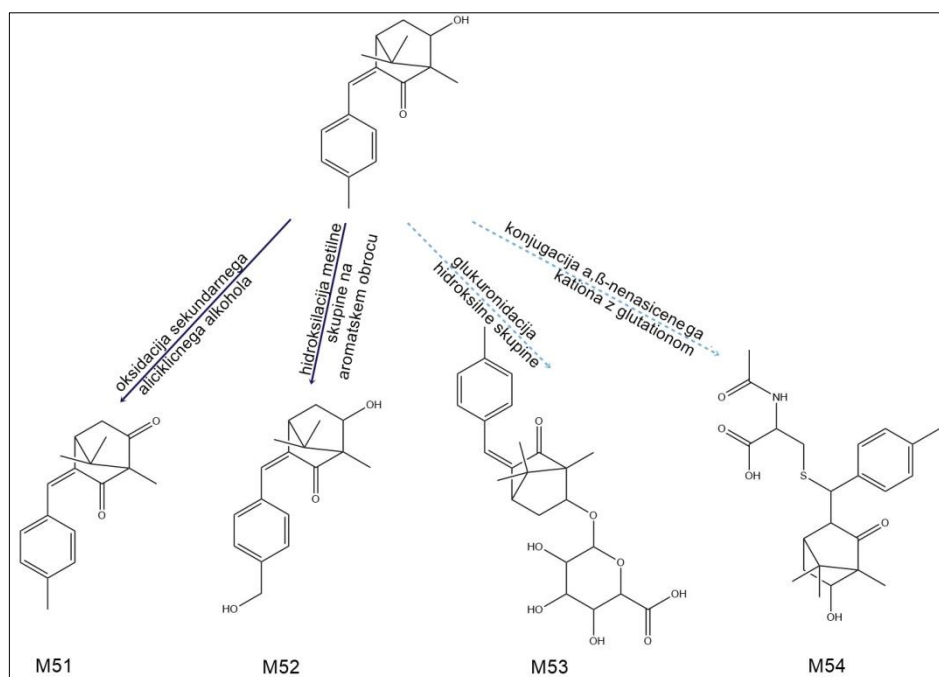
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M41** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z ADH katalizirana redukcija alicikličnega ketona do produkta **M42** (stopnja verjetnosti: možno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **M43** in **M44** (stopnja verjetnost: možno)



Slika 15: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M4 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

4a. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta M5:

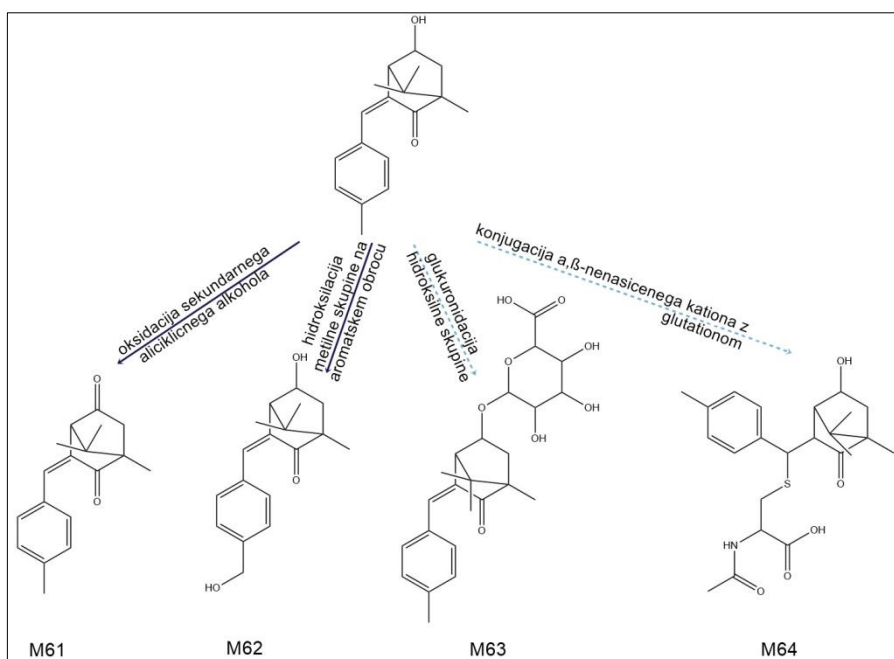
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarnega alicikličnega alkohola do produkta **M51** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M52** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **M53** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **M54** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 16: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M5 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

4b. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta M6:

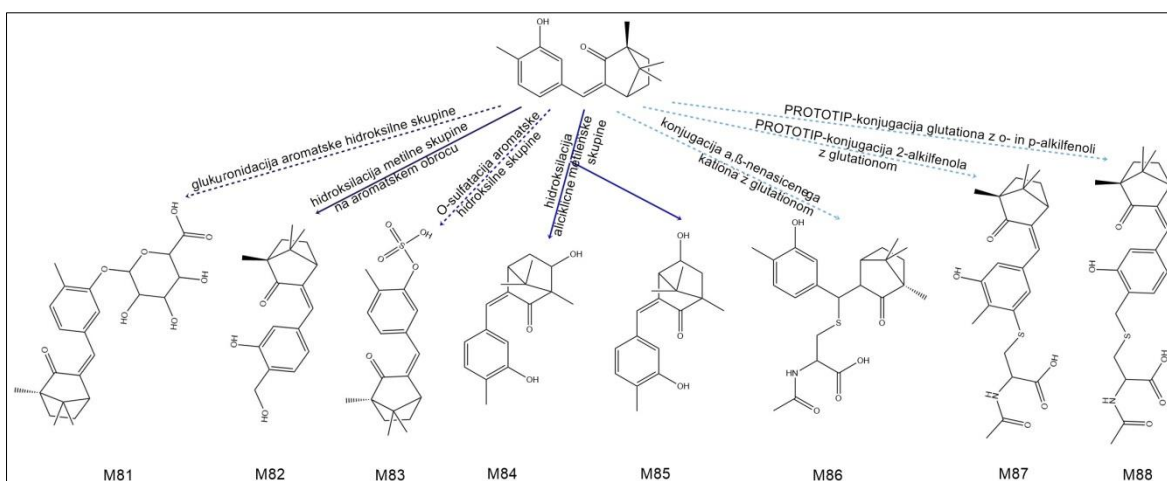
- Z ADH katalizirana oksidacija sekundarnega alicikličnega alkohola do produkta **M61** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M62** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z UGT katalizirana glukuronidacija hidroksilne skupine do produkta **M63** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **M64** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 17: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M6 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

5a. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta M8:

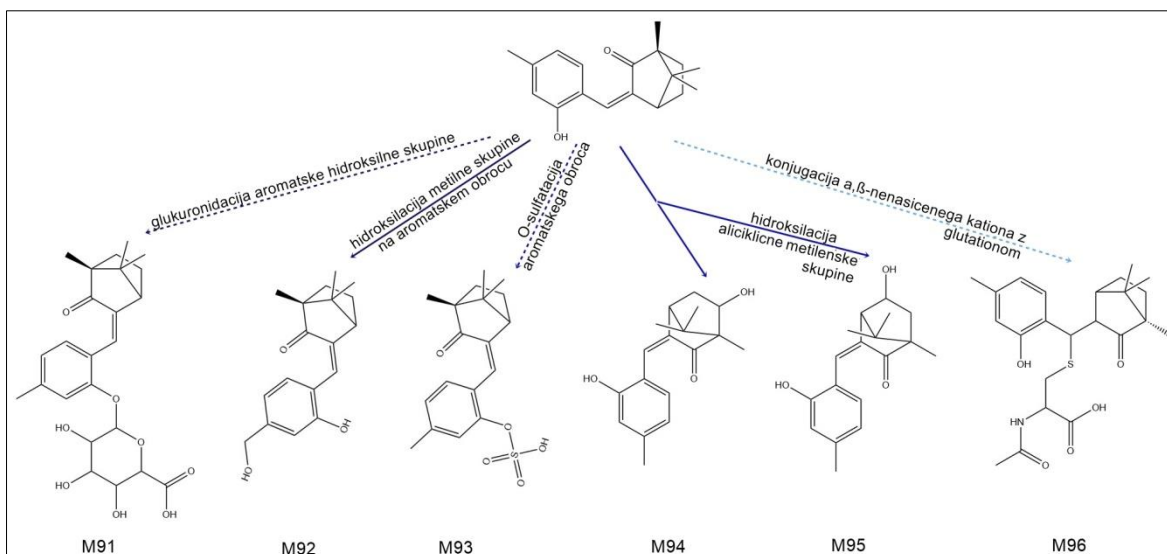
- Z UGT katalizirana glukuronidacija aromatske hidroksilne skupine do produkta **M81** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M82** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija aromatske hidroksilne skupine do produkta **M83** (stopnja verjetnosti: možno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **M84** in **M85** (stopnja verjetnosti: možno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **M86** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- PROTOTIP-konjugacija 2-alkilfenola z glutationom do produkta **M87** (stopnja verjetnosti: dvoumno)
- PROTOTIP-konjugacija glutationa z o- in p-alkilfenoli do produkta **M88** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 18: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M8 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

5b. Napoved nadaljnjega metabolizma produkta M9:

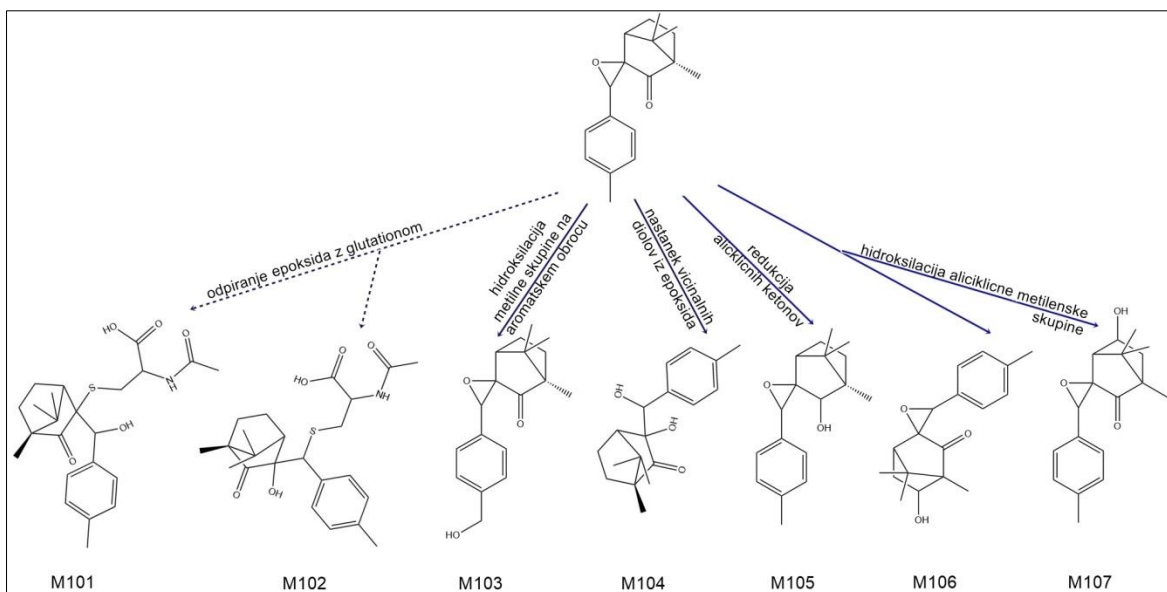
- Z UGT katalizirana glukuronidacija aromatske hidroksilne skupine do produkta **M91** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M92** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S SULT katalizirana O-sulfatacija aromatskega obroča do produkta **M93** (stopnja verjetnost: možno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **M94** in **M95** (stopnja verjetnosti: možno)
- Z GST katalizirana konjugacija α,β -nenasičenega kationa z glutationom do produkta **M96** (stopnja verjetnosti: dvoumno)



Slika 19: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M9 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

6. Napoved nadaljnega metabolizma produkta M10:

- Z GST katalizirano odpiranje epoksida z glutationom do produkta **M101** in **M102** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču do produkta **M103** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z EH kataliziran nastanek vicinalnih diolov iz epoksida do produkta **M104** (stopnja verjetnosti: verjetno)
- Z ADH katalizirana redukcija alicikličnih ketonov do produkta **M105** (stopnja verjetnosti: možno)
- S CYP450 katalizirana hidroksilacija aliciklične metilenske skupine do produkta **M106** in **M107** (stopnja verjetnosti: možno)

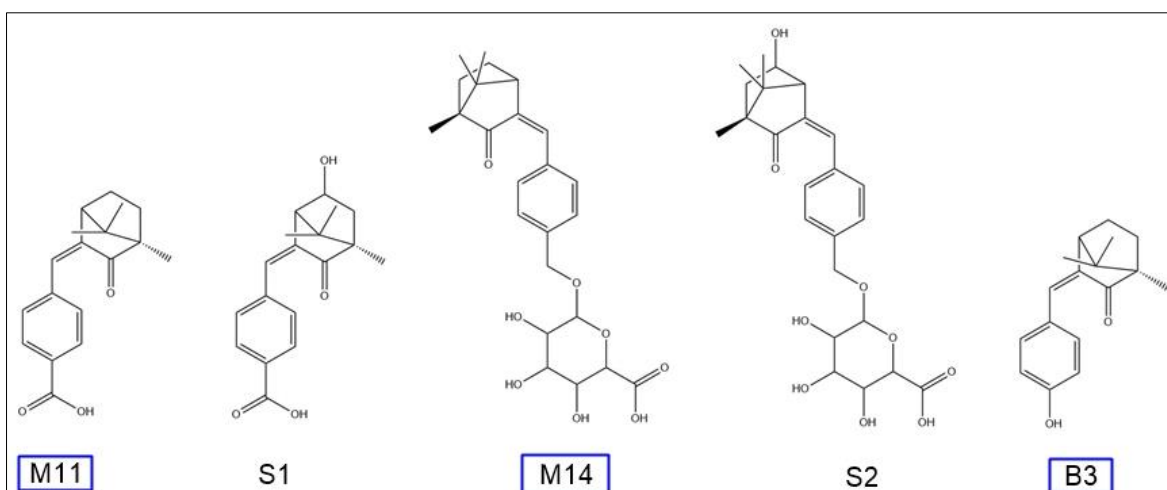


Slika 20: NAPOVEDNA SHEMA METABOLIZMA SPOJINE M10 Z OPISOM REAKCIJ; legenda: verjetnost poteka metabolizma: temno modra = verjetno, modra = možno, svetlo modra = dvoumno; faze metabolizma: polna črta – reakcija metabolizma 1. faze, prekinjena črta – reakcija metabolizma 2. faze.

4.1.3. RAZPRAVA

Računalniški program je predvidel najverjetnejše reakcije metabolizma, in sicer je za 3-BK in 4-MBK predvidel reakcije hidroksilacije, redukcijo dvojne vezi, ciklizacije - nastanek epoksidnega obroča in redukcijo ketona. V naslednji stopnji po hidroksilaciji je reakcija potekala v smeri oksidacije nastalih primarnih alkoholov do ketona oz. karboksilne skupine. Kot reakcije 2. faze metabolizma je program pretežno napovedal konjugacije z glutationom, sulfatom in z glukuronsko kislino. Reakcije napovedane kot najbolj verjetne (stopnja verjetnosti: verjetno) so bile hidroksilacija metilne skupine na alifatskem obroču, oksidacija primarnega alkohola, oksidacija sekundarnega alicikličnega alkohola, nastanek vicinalnih diolov iz epoksida, hidroksilacija metilne skupine na aromatskem obroču, glukuronidacija aromatske hidroksilne skupine in odpiranje epoksida z glutationom. *In vivo* raziskava prisotnosti metabolitov 4-MBK v urinu in krvi podgan po peroralnem dajanju je dokazala prisotnost dveh glavnih metabolitov: **3-(4-karboksibenziliden)kafre**, ki ustreza našemu metabolitu **M11**, in 3-(4-karboksibenziliden)-6-hidroksikafre (65). Metabolita 3-(4-metilbenziliden)-6-hidroksi kafre program v obsegu naših nastavitvev sicer ni napovedal, smo pa kot rezultat dobili metabolit, ki ima hidroksilirano metilensko

skupino na alicikličnem obroču, vendar brez nadaljnje oksidacije benzilne hidroksilne skupine na aromatu. Nastanek metabolita **M11** je naš program napovedal kot verjeten in v tem primeru ugotavljamo zanesljivo napovedno moč programa. Z raziskavo *in vivo* je prav tako bila dokazana prisotnost **glukuronidiranih derivatov 3-(4-karboksibenziliden)kafre** in 3-(4-karboksibenziliden)-6-hidroksikafre; program je tudi v našem primeru napovedal prisotnost prvega glukuronidiranega metabolita, ki ustreza naši spojini **M14**, verjetnost njenega nastanka pa označil kot dvoumno. Raziskava prisotnosti metabolitov 4-MBK v plazmi in urinu ljudi ter plazmi podgan po topikalnem nanosu je ponovno pokazala prisotnost obeh zgoraj omenjenih hidroksiliranih metabolitov 1. faze in pripadajočih glukuronidiranih spojin 2. faze metabolizma (66). V eni od raziskav so *in vivo* preučevali prisotnost metabolitov 3-BK po topikalnem nanosu na kožo podgan. Metaboliti niso bili natančno strukturno definirani, saj so iskali 2 specifična fragmenta strukture 3-BK. Preučevali so farmakokinetiko, rezultati pa so pokazali na prisotnost 3-BK oz. njenih metabolitov v maščobnem tkivu, možganih, mišicah, plazmi in testisih; v jetrih so našli precej manjše količine iskanih fragmentov in tako so sklepali na možnost prisotnosti metabolitov z drugačno kemijsko strukturo od izhodne spojine 3-BK (67). *In vitro* raziskava, ki se je osredotočila na analizo metabolitov 3-BK v hepatocitih jeter ljudi in podgan, je pokazala, da metaboliti zelo hitro prehajajo v celice jeter, da je metabolizem intenzivnejši pri podganah kot pri človeku, s HPLC metodo pa so detektirali tudi 4-hidroksiliran metabolit **B3**; v mnenju SCCS iz leta 2013 so navedli, da je omenjena raziskava nepopolna, zaključili pa so tudi, da so za študije metabolizma potrebne natančnejše raziskave in obsežnejši opis poteka metabolizma (68, 69). Pri *in vivo* preučevanju metabolitov 3-BK na podganah so kot glavni metabolit zaznali **3-(4-hidroksibenziliden)kafro**, ki ustreza strukturi našega metabolita **B3** (69, 70); nastanek tega metabolita je bil pri naši *in silico* analizi označen kot možen, kar kaže na zanesljivo napovedno moč programa.



Slika 21: Metaboliti izbranih derivatov kafe, ki so jih zaznali pri *in vivo* raziskavah metabolizma; **M11** je 3-(4-karboksibenziliden)kafra in je metabolit 4-MBK; **S1** je 3-(4-karboksibenziliden)-6-hidroksikafra in je metabolit 4-MBK; **M14** je glukuronidiran derivat 3-(4-karboksibenziliden)kafre in je metabolit 4-MBK; **S2** je glukuronidiran derivat 3-(4-karboksibenziliden)-6-hidroksikafre in je metabolit 4-MBK; **B3** je 3-(4-hidroksibenziliden)kafra in je metabolit 3-BK; z modrim okvirjem so označene spojine, ki smo jih pravilno napovedali tudi z *in silico* metodo.

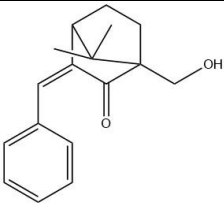
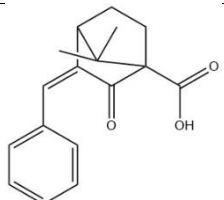
Program je poleg hidroksiliranih metabolitov napovedal še možen nastanek metabolitov z reducirano dvojno vezjo in dvoumen nastanek spojin z epoksidnim obročem, ki jih v dosedanjih raziskavah še niso identificirali. V raziskavah so preučevali metabolite v urinu, krvi in plazmi, kjer lahko pričakujemo bolj hidrofilne metabolite, kar glukuronidirane ter hidroksilirane spojine vsekakor so. Čeprav vse reakcije biotransformacije zmanjšajo lipofilnost izhodnih derivatov kafe, imata metabolita z reducirano dvojno vezjo in epoksidnim obročem višji logP kot ostali metaboliti. To nakazuje na možnost, da bi se lahko metaboliti z reducirano dvojno vezjo v večjem obsegu distribuiral v organih z večjo prisotnostjo lipidnih komponent, metaboliti z epoksidnim obročem pa so zelo nestabilni, zato bi verjetno prej razpadli. V prid tej predpostavki govori tudi dejstvo, da so s podrobnimi raziskavami že zaznali derivate kafe v maščobnem tkivu, možganih, jetrih, mišicah in testisih (67, 24). Obstaja možnost, da nekatere *in silico* napovedane reakcije v telesu ne potekajo, vendar pa bi glede na dozdajšnje najdbe metabolitov derivatov kafe v tkivih človeka in živali bilo smiselno preučiti še možnost nahajanja manj hidrofilnih metabolitov, ki smo jih strukturno definirali pri našem delu. Če vzamemo v obzir študije, ki so dokazale prisotnost metabolitov 3-BK in 4-MBK v telesnih izločkih in tkivih ljudi in podgan po peroralnem dajanju ter topikalnem nanosu, nam program z napovedjo poti

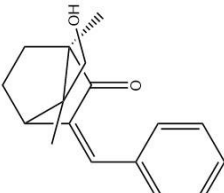
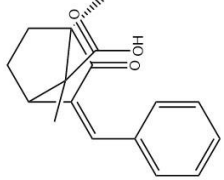
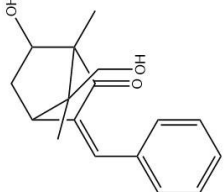
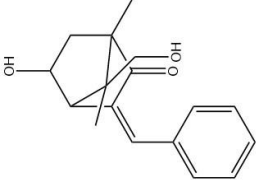
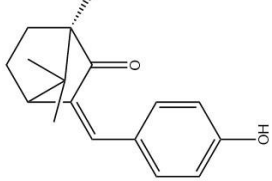
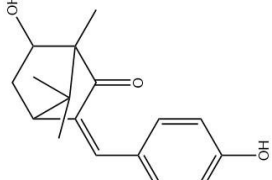
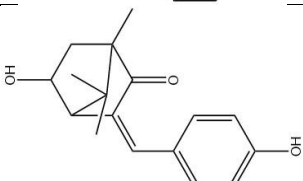
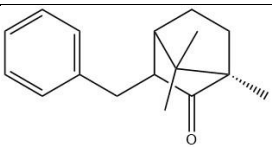
metabolizma in strukturami metabolitov omogoča boljšo pripravo in načrtovanje usmerjene detekcije v *in vivo/in vitro* raziskavah ter posledično tudi stroškovno in časovno učinkovitejše raziskovalno delo. Za določanje varnosti derivatov kafe kot UV-filtrov v kozmetičnih izdelkih je smiselno del študij detekcij metabolitov izvajati *in vivo* po topikalnem nanosu pri ljudeh, saj je absorpcija skozi nepoškodovano človeško kožo bistveno slabša od absorpcije pri živalih, biotransformacije pa pri ljudeh potekajo tudi manj intenzivno kot pri živalih (66, 68). Študije metabolizma spojin, ki vključujejo nanos na človeško kožo imajo za zakonodajne spremembe v uredbi o kozmetičnih izdelkih večjo težo pri presoji in običajno hitreje privedejo do končnih odločitev o morebitnih spremembah najvišje dovoljene koncentracije sestavine ali prepovedi uporabe sestavine.

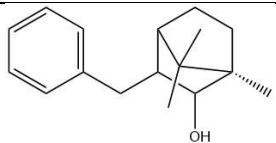
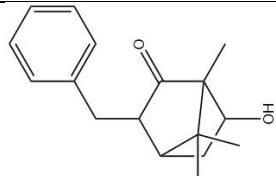
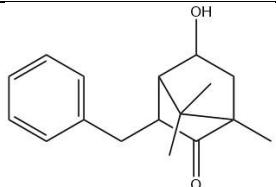
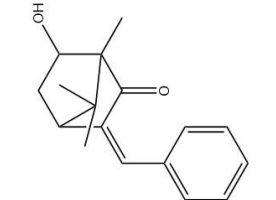
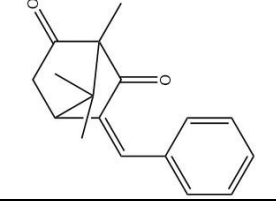
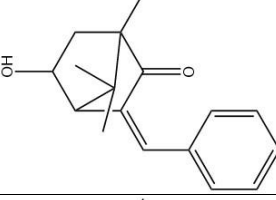
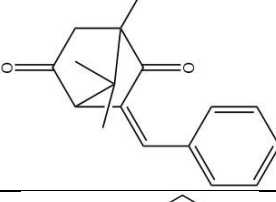
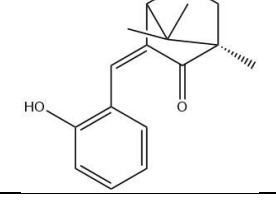
4.2. ZBRANI METABOLITI

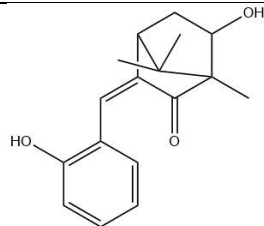
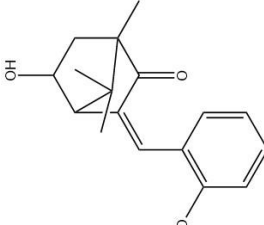
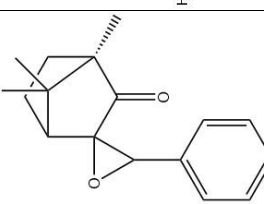
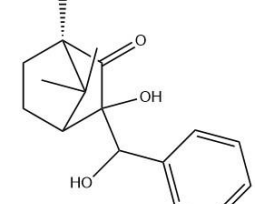
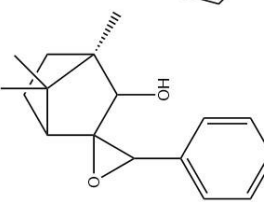
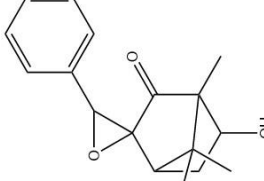
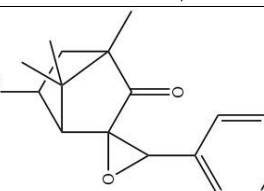
Za raziskavo endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti 3-BK in 4-MBK smo v preglednici zbrali 62 metabolitov 1. faze biotransformacije, ki jih je napovedal program Meteor Nexus. Metabolitov 2. faze biotransformacije nismo vključili, saj so le-ti konjugirani, večinoma neaktivni in vodotopni ter se hitro izločijo iz telesa, predvsem skozi ledvica.

Preglednica IV: Zbrani metaboliti 3-BK in 4-MBK za nadaljnjo raziskavo endokrinih učinkov in reproduktivne toksičnosti; metaboliti, ki smo jih dobili v prvi stopnji reakcij so označeni z rumeno, vsi ostali pa so rezultat druge stopnje reakcij in izhajajo iz označenih metabolitov.

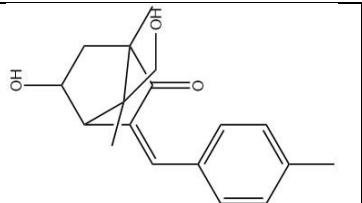
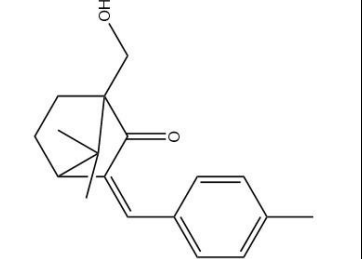
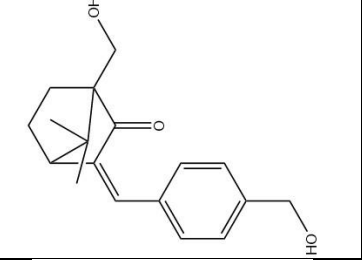
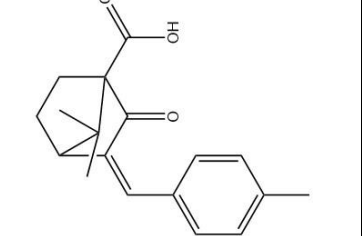
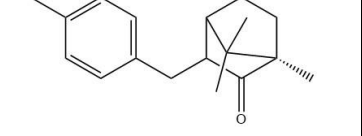
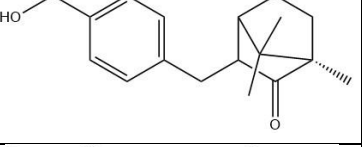
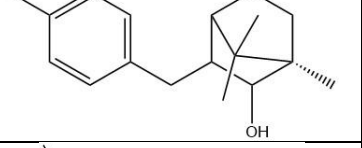
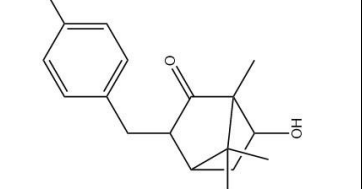
ŠT.	METABOLIT DERIVATA KAFRE	SMILES METABOLITA	IZHODNI DERIVAT KAFRE	logP
<u>1</u> (B1)		<chem>C1CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=CC=C3)=O)CO</chem>	3-benzilidenkafra	3,2
<u>2</u> (B11)		<chem>C1CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=CC=C3)=O)C(=O)O</chem>	3-benzilidenkafra	3,35

<u>3</u> (B2)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)CO)=CC3=CC=CC=C3)=O)C</chem>	3-benzilidenkafra	2,97
<u>4</u> (B21)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C(=O)O)=CC3=CC=CC=C3)=O)C</chem>	3-benzilidenkafra	3,38
<u>5</u> (B22)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)CO)=CC3=CC=CC=C3)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	1,56
<u>6</u> (B23)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)CO)=CC3=CC=CC=C3)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	1,32
<u>7</u> (B3)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)O)=O)C</chem>	3-benzilidenkafra	3,85
<u>8</u> (B35)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)O)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	2,44
<u>9</u> (B36)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)O)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	2,2
<u>10</u> (B4)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)CC3=CC=CC=C3)=O)C</chem>	3-benzilidenkafra	4,26

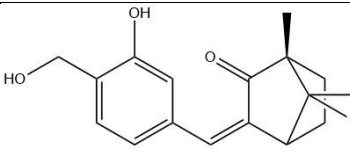
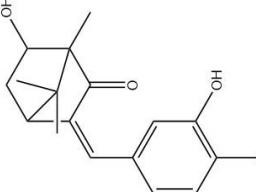
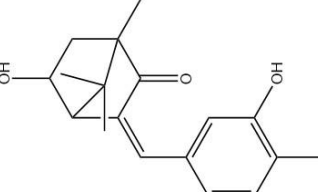
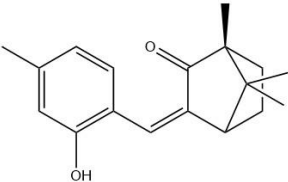
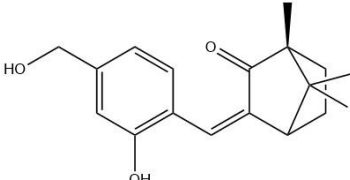
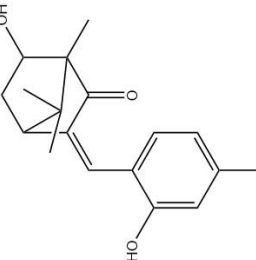
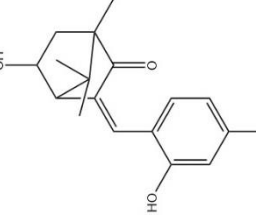
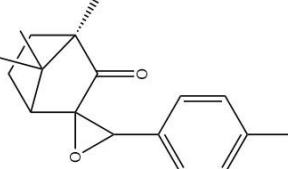
11 (B41)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)CC3=CC=CC=C3)O)C</chem>	3-benzilidenkafra	5,04
12 (B42)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)CC3=CC=CC=C3)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	2,98
13 (B43)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)CC3=CC=CC=C3)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	2,7
14 (B5)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=CC=C3)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	3,1
15 (B51)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=CC=C3)=O)C)=O</chem>	3-benzilidenkafra	3,34
16 (B6)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=CC=C3)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	2,87
17 (B61)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=CC=C3)=O)C)=O</chem>	3-benzilidenkafra	3,28
18 (B8)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)=CC=CC=C(C=3O)=O)C</chem>	3-benzilidenkafra	3,85

<u>19</u> (B83)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC=CC=3O)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	2,44
<u>20</u> (B84)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC=CC=3O)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	2,2
<u>21</u> (B9)		<chem>C1C[C@]2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=CC=C3)O4)=O)C</chem>	3-benzilidenkafra	3,79
<u>22</u> (B93)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)C(C3=CC=CC=C3)O)O)=O)C</chem>	3-benzilidenkafra	2,31
<u>23</u> (B94)		<chem>C1C[C@]2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=CC=C3)O4)O)C</chem>	3-benzilidenkafra	3,28
<u>24</u> (B95)		<chem>C1C(C2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=CC=C3)O4)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	2,5
<u>25</u> (B96)		<chem>C1(CC2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=CC=C3)O4)=O)C)O</chem>	3-benzilidenkafra	1,7

26 (M1)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)CO)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,48
27 (M11)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)C(=O)O)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	4,26
28 (M12)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)CO)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,07
29 (M13)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)CO)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	1,83
30 (M2)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)CO)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,47
31 (M21)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)CO)=CC3=CC=C(C=C3)CO)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	1,93
32 (M22)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C(=O)O)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,88
33 (M23)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)CO)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,05

34 (M24)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)CO)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	1,82
35 (M3)		<chem>C1CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)CO</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,7
36 (M31)		<chem>C1CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)CO)=O)CO</chem>	metilbenzilidenkafra	2,17
37 (M32)		<chem>C1CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C(=O)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,85
38 (M4)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	4,76
39 (M41)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)CC3=CC=C(C=C3)CO)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,23
40 (M42)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)CC3=CC=C(C=C3)C)O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	5,53
41 (M43)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,48

42 (M44)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,2
43 (M5)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,6
44 (M51)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,84
45 (M52)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)CO)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,07
46 (M6)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,37
47 (M61)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,78
48 (M62)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC3=CC=C(C=C3)CO)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	1,83
49 (M8)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC(=C(C=3)O)C)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	4,3

50 (M82)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC(=C(C=3)O)CO)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,77
51 (M84)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC(=C(C=3)O)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,89
52 (M85)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC(=C(C=3)O)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,65
53 (M9)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC(=C(C=3)O)C)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	4,35
54 (M92)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC(=C(C=3)O)CO)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,82
55 (M94)		<chem>C1C(C2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC(=CC=3O)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,94
56 (M95)		<chem>C1(CC2(C(C(C1C2(C)C)=CC=3C=CC(=CC=3O)C)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,7
57 (M10)		<chem>C1C[C@]2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=C(C=C3)C)O4)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	4,29

58 (M103)		<chem>C1C[C@]2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=C(C=C3)CO)O4)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,75
59 (M104)		<chem>C1C[C@]2(C(C(C1C2(C)C)C(C3=CC=C(C=C3)C)O)O)=O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,81
60 (M105)		<chem>C1C[C@]2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=C(C=C3)C)O4)O)C</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3,78
61 (M106)		<chem>C1C(C2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=C(C=C3)C)O4)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	3
62 (M107)		<chem>C1(CC2(C(C4(C1C2(C)C)C(C3=CC=C(C=C3)C)O4)=O)C)O</chem>	4-metilbenzilidenkafra	2,2

4.3. ENDOKRINO DELOVANJE

4.3.1. PROGRAM VEGANIC - RELATIVE BINDING AFFINITY MODEL

S programom VegaNIC z modelom Relative Binding Affinity Model smo napovedali endokrino toksičnost kot posledico vezave spojin na ER. Program znotraj izbranega modela napove ali se spojina veže na receptor in vzporedno poda oceno zanesljivosti napovedi v treh stopnjah: visoka, srednja ali nizka.

Rezultati za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrana derivata kafe so naslednji:

- Za **negativno kontrolo timol** smo dobili rezultat, da ni aktiven na ER, kar potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela.
- Za **pozitivno kontrolo BPA** smo dobili rezultat, da je aktiven na ER, kar potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela.
- Za **3-BK** smo dobili rezultat, da je aktivna na ER, in sicer z visoko zanesljivostjo.
- Za **4-MBK** smo dobili rezultat, da je aktivna na ER, in sicer z visoko zanesljivostjo.

Preglednica V: Rezultati programa VegaNIC za napoved endokrine toksičnosti preko ER za timol, BPA, 3-BK in 4-MBK; legenda: *** visoka zanesljivost, ** srednja zanesljivost, * nizka zanesljivost; rdeče obarvano - spojina je aktivna, zeleno obarvano – spojina ni aktivna, rumeno obarvano - spojina se nahaja ali se lahko nahaja izven območja uporabnosti napovednega modela; dodana oznaka E – v bazi modela obstajajo eksperimentalni podatki.

SPOJINA	REZULTAT
timol (negativna kontrola)	*** E
BPA (pozitivna kontrola)	*** E
3-benzilidenkafra	***
4- metilbenziliden kafra	***

Rezultati za zbrane metabolite izbranih derivatov kafe so naslednji:

- Za dihidroksilirana metabolite 3-BK (**5, 6**) je program napovedal neaktivnost na ER.
- Za dihidroksilirane metabolite 4-MBK (**28, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 45, 48**) je program napovedal neaktivnost na ER.
- Za na aromatskem obroču hidroksilirane metabolite 3-BK (**7, 8, 9, 18, 19, 20**) in za metabolita 3-BK z reducirano dvojno vezjo (**10, 11**) je program napovedal, da so aktivni na ER.
- Za metabolita 4-MBK z reducirano dvojno vezjo (**38, 40**), za na aromatskem obroču hidroksilirane metabolite 4-MBK (**49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56**) in za enega od metabolitov z epoksidnim obročem (**60**) je program napovedal, da so aktivni na ER.

- Za 63% analiziranih metabolitov je program javil, da se nahajajo ali se lahko nahajajo izven območja uporabnosti modela, zato teh rezultatov ne moremo smatrati kot verodostojne.

Preglednica VI: Rezultati programa VegaNIC za napoved endokrine toksičnosti preko ER za metabolite 3-BK in 4-MBK; legenda: *** visoka zanesljivost, ** srednja zanesljivost, * nizka zanesljivost; rdeče obarvano - spojina je aktivna z visoko zanesljivostjo; svetlo rdeče – spojina je aktivna, ampak se lahko nahaja izven območja uporabnosti modela; temno zeleno obarvano – spojina ni aktivna z visoko zanesljivostjo; zeleno obarvano – spojina ni aktivna, ampak se lahko nahaja izven območja uporabnosti modela; svetlo zeleno – spojina ni aktivna z nizko zanesljivostjo in se nahaja izven območja uporabnosti modela.

METABOLIT	REZULTAT
<u>1</u>	*
<u>2</u>	**
<u>3</u>	*
<u>4</u>	**
<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>	**
<u>28</u>	***
<u>29</u>	***
<u>30</u>	*
<u>31</u>	**

METABOLIT	REZULTAT
<u>32</u>	**
<u>33</u>	***
<u>34</u>	***
<u>35</u>	*
<u>36</u>	**
<u>37</u>	**
<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>	***
<u>55</u>	***
<u>56</u>	***
<u>57</u>	*
<u>58</u>	*
<u>59</u>	*
<u>60</u>	***
<u>61</u>	*
<u>62</u>	*

4.3.2. PROGRAM ENDOCRINE DISRUPTOME

Program Endocrine Disruptome smo uporabili za napoved verjetnosti vezave na dvanajst hormonskih receptorjev, in vezavo na dve različni konformaciji za štiri izmed teh receptorjev. Podani rezultati so v obliki številčnih vrednosti in obarvani glede na stopnjo verjetnosti vezave na receptor: **rdeča** – največja verjetnost vezave, **oranžna** - velika verjetnost vezave, **rumena** – srednja verjetnost vezave in **zelena** – majhna verjetnost vezave.

Rezultati napovedi vezave na hormonske receptorje za negativno in pozitivno kontrolo ter izbrana derivata kafe so naslednji:

- Za **negativno kontrolo timol** je program napovedal srednjo verjetnost vezave na receptor AR an in majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **pozitivno kontrolo BPA** je program napovedal največjo verjetnost vezave na AR an, veliko verjetnost vezave na AR, srednjo verjetnost vezave na ER α , ER β , GR, TR α in TR β ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **3-BK** je program napovedal največjo verjetnost vezave na AR an in ER β , veliko verjetnost vezave na AR in ER β an, srednjo verjetnost vezave na ER α , ER α an, GR in TR α ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.
- Za **4-MBK** je program napovedal največjo verjetnost vezave na AR, AR an in ER β , veliko verjetnost vezave na ER α , ER β an in TR β , srednjo verjetnost vezave na ER α an, GR, LXR β , RXR α in TR α ter majhno verjetnost vezave na ostale receptorje.

Preglednica VII: Rezultati programa Endocrine Disruptome za napoved endokrine toksičnosti 3-BK, 4-MBK, neaktivne in pozitivne kontrole preko vezave na različne receptorje; legenda: rdeče – največja verjetnost vezave, oranžna – velika verjetnost vezave, rumena – srednja verjetnost vezave, zelena –majhna verjetnost vezave.

SPOJINA	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
TI-MOL	-7,1	-6,7	-6,1	-5,9	-6,1	-6,0	-6,3	-5,9	-6,8	-6,9	-6,2	-6,3	-6,1	-6,2	-6,8	-6,6
BPA	-8,3	-8,5	-8,3	-8,5	-8,4	-8,1	-7,5	-7,5	-8,2	-8,0	-7,7	-7,5	-7,6	-7,9	-8,4	-8,7
3-BK	-8,6	-8,8	-8,8	-8,8	-9,9	-8,8	-8,2	-8,0	-9,5	-10,0	-7,7	-7,1	-6,8	-9,7	-8,2	-10,3
4-MBK	-8,8	-8,7	-9,1	-8,8	-9,3	-8,8	-8,6	-8,0	-9,8	-10,5	-7,7	-7,5	-7,3	-10,2	-7,6	-9,9

Rezultati verjetnosti vezave za zbrane metabolite izbranih derivatov kafe so naslednji:

- Na receptor AR je program napovedal **največjo verjetnost** vezave za metabolite 2, 7, 8, 11, 15, 21, 23, 24, 28, 32, 35, 36, 39, 40, 43, 45, 47, 49, 51, 52, 57 - 62. Te metabolite smo dobili po različnih poteh hidroksilacij in nadaljnjih oksidacij: z uvedbo karboksilne, hidroksilne in ketonske skupine; nekatere smo dobili po redukciji dvojne vezi; v skupino največje verjetnosti vezave na AR pa so se uvrstili tudi skoraj vsi metaboliti s prisotnim epoksidnim obročem. Srednjo verjetnost vezave je napovedal za metabolite 3, 6, 16, 31 in 56. Za vseh preostalih enaintrideset metabolitov je napovedal veliko verjetnost vezave.
- Na receptor AR_{an} je program napovedal **največjo verjetnost** vezave za metabolite 2, 4, 7 - 11, 13 - 17, 20, 21, 23, 24, 29, 35, 38, 39, 42, 46, 47, 48, 51, 52, 57 - 62. Te metabolite smo dobili po različnih poteh hidroksilacij in oksidacij, redukcij dvojne vezi ter epoksidaciji. Srednjo verjetnost vezave je napovedal za metabolit 27. Za vseh preostalih devetindvajset metabolitov je napovedal veliko verjetnost vezave.
- Na receptor ER_α je program napovedal **največjo verjetnost** vezave za metabolite 7, 8, 21, 49, 57, 58 in 62. Ti metaboliti so nastali po hidroksilaciji aromatskega obroča in po epoksidaciji. Srednjo verjetnost vezave je napovedal za metabolite 3, 4, 6, 10, 11, 13, 20, 22, 27, 30, 31, 34, 37 - 40. Za vseh preostalih devetintrideset metabolitov je napovedal veliko verjetnost vezave.
- Na receptor ER_α_{an} je program napovedal **veliko verjetnost** vezave za metabolit 49, ki ima na hidroksilirani aromatski obroč. Srednjo verjetnost vezave je napovedal za metabolite 2, 7, 8, 14, 15, 17, 18, 21, 23 - 27, 37 - 40, 47, 50, 53, 54, 57 - 62. Za vse preostale metabolite je napovedal majhno verjetnost vezave.
- Na receptor ER_β je program napovedal **največjo verjetnost** vezave za metabolite 1, 2, 4, 7, 9, 14 - 21, 23, 26, 37, 50, 54, 57, 58, 60 in 62. Ti metaboliti so nastali po hidroksilacijah, nadaljnjih oksidacijah, med njimi je tudi večina epoksidiranih spojin. Veliko verjetnost vezave je napovedal za metabolite 3, 5, 6, 8, 10, 12, 25, 29 - 32, 35, 36, 38, 39, 43, 46, 48, 49, 53 in 55. Srednjo verjetnost vezave je napovedal za metabolite 11, 13, 22, 24, 27, 28, 34, 40 - 42, 44, 45, 47, 51, 52, 56 in 61. Za preostala dva metabolita je napovedal majhno verjetnost vezave.

- Na receptor ER β an je program napovedal **največjo verjetnost** vezave za metabolita 15 in 23, prvi nastane po hidroksilaciji in nadaljnji oksidaciji do ketona, drugi pa ima epoksidni obroč. Veliko verjetnost vezave je napovedal za metabolite 1, 7, 18, 21, 44, 47 in 58. Srednjo verjetnost vezave je napovedal za metabolite 2, 4, 8, 10 - 12, 14, 17, 19, 20, 25, 26, 33, 36, 37, 40, 43, 50, 51, 53, 54, 55, 57 in 60. Za preostalih devetindvajset metabolitov je napovedal majhno verjetnost vezave.
- Na receptor GR je program za vse metabolite napovedal **srednjo verjetnost** vezave.
- Na receptor GR an je program za vse metabolite napovedal **majhno verjetnost** vezave.
- Na receptor LXR α je program napovedal **srednjo verjetnost** vezave za metabolite 26, 27, 30, 32, 49, 50, 53, 55 in 56. Ti metaboliti so hidroksilirani, nekateri nadalje oksidirani do karboksilne skupine. Za vse preostale metabolite je napovedal majhno verjetnost vezave.
- Na receptor LXR β je program napovedal **srednjo verjetnost** vezave za metabolite 27, 41 in 53. Med temi metaboliti najdemo spojino s karboksilno skupino, spojini po hidroksilaciji in redukciji dvojne vezi. Za vse preostale metabolite je napovedal majhno verjetnost vezave.
- Na receptorje PPAR α , PPAR β in PPAR γ je program za vse metabolite napovedal **majhno verjetnost** vezave.
- Na receptor RXR α je program napovedal srednjo verjetnost vezave za metabolite 27, 38, 44, 47 in 49. Za vse preostale metabolite je napovedal majhno verjetnost vezave.
- Na receptor TR α je program napovedal **srednjo verjetnost** vezavo za 2/3 vseh metabolitov. Za vse preostale metabolite je napovedal majhno verjetnost vezave. Srednjo verjetnost vezave imajo metaboliti, ki so nastali po različnih reakcijah biotransformacije - razen za epoksidirane spojine, za te dobimo rezultat majhno verjetnost vezave.
- Na receptor TR β je program napovedal **veliko verjetnost** vezave za metabolite 1, 2, 8, 10, 14 - 19, 26, 29, 35, 37, 39, 44, 47, 48, 50 - 52 in 55. Ti metaboliti so

hidroksilirani in nekateri nadaljnje oksidirani do karboksilne skupine ali ketona. Za metabolit **22** je napovedal majhno verjetnost vezave. Za vse preostale metabolite je napovedal srednjo verjetnost vezave.

Za metabolite derivate kafe je program napovedal **največje verjetnosti** vezave na **androgene** in **estrogenske receptorje**. Med njimi so tako hidroksilirane in nadaljnje oksidirane spojine, spojine z reducirano dvojno vezjo kot tudi spojine z epoksidnim obročem. **Velika verjetnost** vezave na **tiroidni receptor β** je napovedana za 2/3 vseh metabolitov, ki so produkt različnih reakcij, med njimi so izvzete spojine z epoksidnim obročem.

Preglednica VIII: Rezultati programa Endocrine Disruptome za napoved endokrine toksičnosti metabolitov derivatov kafe preko vezave na različne receptorje; legenda: rdeče – največja verjetnost vezave, oranžna – velika verjetnost vezave, rumena – srednja verjetnost vezave, 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
1	-8,4	-8,4	-9,0	-8,4	-9,4	-8,7	-8,0	-8,2	-8,7	-9,1	-7,6	-7,0	-6,7	-9,3	-7,1	-9,9
2	-8,9	-9,1	-9,0	-8,8	-9,7	-8,6	-8,3	-8,0	-9,3	-9,6	-7,8	-7,2	-6,9	-9,2	-7,7	-9,9
3	-7,8	-8,0	-8,6	-8,3	-9,1	-8,2	-8,0	-8,0	-9,3	-9,0	-7,8	-7,4	-7,8	-9,3	-7,4	-9,2
4	-8,5	-8,5	-8,8	-8,2	-9,5	-8,6	-8,2	-7,9	-9,3	-9,7	-7,8	-6,7	-6,9	-9,1	-7,1	-9,4
5	-8,2	-8,4	-9,0	-8,1	-9,2	-8,3	-7,9	-7,6	-8,9	-8,7	-7,3	-7,0	-6,7	-8,5	-7,6	-9,3
6	-7,9	-8,3	-8,4	-8,0	-8,9	-7,8	-7,8	-7,8	-8,7	-9,2	-7,5	-6,5	-7,0	-8,8	-7,7	-8,9
7	-8,9	-8,8	-9,5	-9,3	-9,8	-9,0	-8,6	-8,1	-9,7	-9,7	-7,9	-7,8	-7,7	-9,7	-8,6	-9,4
8	-8,7	-8,7	-9,5	-8,9	-9,2	-8,6	-8,4	-8,1	-9,0	-9,2	-7,9	-7,8	-7,3	-8,7	-8,4	-9,6
9	-8,5	-8,8	-9,2	-8,6	-9,4	-8,3	-8,0	-8,2	-9,5	-9,7	-7,9	-7,1	-7,1	-9,4	-8,4	-8,8
10	-8,6	-8,7	-8,8	-8,5	-8,8	-8,5	-8,2	-7,3	-9,6	-8,5	-7,5	-7,3	-7,5	-9,7	-8,2	-9,5
11	-8,7	-8,8	-8,6	-8,5	-8,5	-8,5	-8,2	-7,2	-9,4	-9,4	-7,5	-7,5	-7,5	-9,4	-7,8	-9,0
12	-8,4	-8,4	-9,1	-8,4	-9,2	-8,4	-9,1	-7,8	-9,4	-9,9	-7,6	-7,2	-7,0	-9,0	-6,9	-8,8
13	-8,3	-8,5	-8,8	-8,5	-8,4	-8,3	-8,0	-7,9	-8,8	-9,4	-7,7	-7,2	-7,3	-9,5	-7,9	-9,0
14	-8,5	-8,6	-9,0	-8,7	-9,6	-8,4	-8,1	-8,1	-9,1	-9,0	-7,7	-7,2	-6,8	-9,2	-8,1	-10,1
15	-8,8	-9,1	-9,1	-8,9	-9,8	-9,1	-8,5	-8,3	-9,3	-9,2	-8,2	-6,9	-7,0	-9,4	-8,1	-10,5
16	-8,1	-8,5	-8,9	-8,4	-9,3	-8,3	-8,0	-8,2	-9,4	-9,6	-7,8	-6,9	-6,9	-9,5	-8,1	-9,5
17	-8,6	-8,9	-9,1	-8,7	-9,4	-8,4	-8,4	-8,2	-9,3	-9,5	-7,9	-7,1	-7,1	-9,9	-8,0	-10,4
18	-8,6	-8,4	-9,3	-8,8	-9,6	-8,8	-8,4	-8,1	-9,8	-9,6	-7,5	-7,0	-7,6	-9,3	-8,2	-9,5
19	-8,4	-8,4	-9,1	-8,5	-9,4	-8,4	-8,2	-8,2	-9,1	-9,3	-8,0	-7,1	-6,7	-9,3	-8,1	-9,7
20	-8,2	-8,6	-8,8	-8,4	-9,3	-8,4	-8,4	-8,0	-9,6	-10,0	-7,6	-7,0	-6,8	-8,9	-8,1	-9,1
21	-8,7	-8,7	-9,4	-9,2	-9,5	-8,7	-7,9	-8,1	-9,0	-9,3	-7,1	-6,7	-6,7	-9,1	-6,7	-8,5

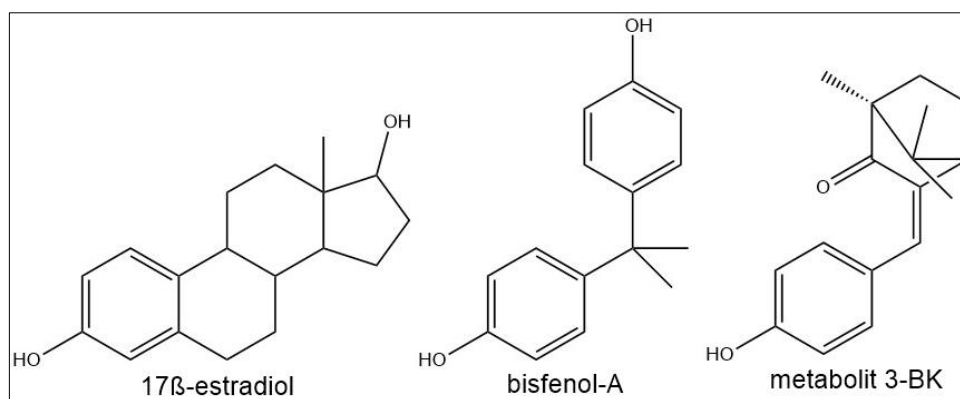
22	-8,3	-8,2	-8,7	-8,4	-8,5	-8,3	-7,8	-7,7	-9,1	-9,4	-7,4	-7,3	-7,7	-8,2	-7,5	-7,8
23	-8,8	-9,0	-9,2	-9,0	-9,5	-9,1	-7,9	-7,9	-9,1	-9,1	-7,8	-6,8	-6,5	-8,2	-7,2	-8,3
24	-8,7	-8,6	-9,0	-9,1	-8,5	-8,2	-8,0	-8,0	-9,0	-9,2	-7,5	-6,8	-6,6	-9,3	-6,4	-8,4
25	-8,3	-8,4	-9,3	-8,9	-9,1	-8,5	-7,9	-7,9	-9,0	-9,2	-7,4	-6,4	-6,8	-9,2	-6,8	-8,3
26	-8,4	-8,0	-9,1	-9,0	-9,5	-8,4	-9,0	-8,2	-10,0	-10,0	-8,0	-7,3	-7,8	-10,0	-7,8	-9,6
27	-8,2	-7,0	-8,3	-8,8	-8,6	-8,3	-9,0	-7,7	-10,3	-10,5	-8,3	-7,3	-7,8	-10,3	-7,5	-9,1
28	-8,7	-8,3	-9,0	-8,4	-8,7	-8,3	-8,7	-8,1	-9,2	-9,8	-7,5	-7,2	-7,2	-9,2	-7,5	-9,3
29	-8,5	-8,5	-9,0	-7,8	-9,1	-8,0	-8,4	-8,1	-9,5	-9,6	-7,9	-7,2	-7,3	-9,8	-7,5	-9,7
30	-8,3	-7,9	-8,7	-8,6	-8,8	-8,0	-8,3	-8,0	-10,0	-9,8	-8,2	-7,6	-8,1	-9,9	-7,1	-8,6
31	-8,1	-8,0	-8,8	-8,2	-9,1	-8,0	-8,2	-8,1	-9,5	-9,4	-6,3	-7,0	-7,1	-9,8	-7,0	-9,1
32	-8,7	-8,2	-9,1	-8,0	-8,9	-8,3	-8,8	-8,0	-10,0	-10,2	-8,1	-6,3	-7,2	-9,6	-7,1	-8,7
33	-8,6	-8,3	-8,9	-8,1	-7,7	-8,6	-8,2	-7,4	-9,0	-9,7	-7,4	-6,8	-7,3	-8,1	-7,0	-9,1
34	-8,2	-8,2	-8,5	-7,3	-8,2	-8,0	-8,1	-7,4	-9,2	-9,5	-7,6	-7,0	-7,6	-9,0	-7,0	-8,0
35	-8,7	-8,5	-9,2	-8,4	-8,9	-8,3	-8,8	-7,7	-9,4	-9,8	-8,2	-7,4	-6,7	-9,7	-6,6	-9,5
36	-8,8	-8,2	-9,1	-8,0	-6,1	-8,5	-8,8	-7,8	-9,0	-9,4	-7,4	-7,4	-6,7	-9,7	-6,6	-9,1
37	-8,4	-8,1	-8,8	-8,7	-9,4	-8,5	-9,2	-7,5	-9,5	-10,3	-8,1	-7,1	-6,5	-9,7	-6,6	-9,6
38	-8,5	-8,5	-8,8	-8,9	-9,0	-8,0	-8,6	-7,6	-9,6	-10,2	-8,0	-7,6	-7,0	-10,1	-8,8	-9,1
39	-8,8	-8,5	-8,7	-8,8	-9,2	-8,3	-8,8	-7,8	-9,4	-9,9	-7,3	-7,6	-6,7	-9,9	-8,5	-9,6
40	-8,8	-8,3	-8,5	-8,8	-8,6	-8,4	-8,9	-7,6	-9,6	-9,9	-7,8	-7,7	-7,0	-9,9	-8,2	-8,9
41	-8,4	-8,3	-8,9	-8,4	-8,6	-8,2	-8,7	-7,5	-9,7	-10,4	-7,4	-8,1	-7,7	-9,3	-7,5	-8,8
42	-8,6	-8,5	-8,9	-8,4	-8,2	-8,3	-8,5	-8,1	-9,4	-9,9	-8,0	-7,6	-7,5	-9,6	-8,2	-8,8
43	-8,8	-8,4	-9,0	-8,6	-8,8	-8,5	-8,4	-7,9	-9,6	-10,1	-7,7	-7,1	-7,5	-9,2	-7,8	-9,8
44	-8,3	-8,4	-9,2	-8,6	-8,3	-8,9	-8,9	-8,2	-9,8	-10,2	-8,5	-7,6	-7,5	-10,2	-7,8	-10,3
45	-8,8	-8,3	-9,0	-8,4	-8,6	-8,3	-8,7	-8,1	-9,2	-9,8	-7,6	-7,2	-7,2	-9,2	-7,5	-9,3
46	-8,5	-8,6	-9,2	-8,1	-9,0	-8,2	-8,5	-8,0	-9,6	-9,6	-8,0	-7,5	-7,7	-9,9	-7,6	-9,3
47	-8,7	-8,8	-9,3	-8,8	-8,7	-8,7	-8,8	-7,8	-9,7	-10,3	-8,1	-7,7	-7,7	-10,4	-7,6	-9,5
48	-8,5	-8,5	-9,0	-7,8	-9,1	-8,0	-8,4	-8,1	-9,5	-9,6	-7,9	-7,2	-7,3	-9,8	-7,5	-9,7
49	-8,8	-8,4	-9,4	-9,6	-9,1	-8,2	-8,8	-8,4	-10,5	-10,2	-8,1	-7,7	-7,6	-10,1	-7,8	-9,4
50	-8,6	-8,4	-9,2	-9,2	-9,3	-8,4	-8,7	-8,4	-10,0	-9,7	-8,0	-7,2	-7,4	-9,7	-7,6	-9,7
51	-9,0	-8,5	-9,3	-8,4	-8,5	-8,5	-8,6	-8,1	-9,6	-10,0	-8,1	-7,4	-7,3	-8,9	-7,8	-10,2
52	-8,9	-8,7	-9,1	-8,0	-8,5	-7,8	-8,7	-8,1	-9,7	-9,8	-8,2	-7,8	-7,7	-9,6	-7,8	-9,6
53	-8,3	-8,1	-9,3	-9,2	-8,9	-8,5	-8,7	-8,0	-10,3	-10,5	-8,0	-7,0	-7,3	-9,6	-7,5	-9,0
54	-8,3	-7,8	-9,1	-8,7	-9,3	-8,5	-8,6	-8,2	-9,8	-10,0	-6,1	-7,1	-7,0	-9,5	-7,5	-8,7
55	-8,2	-8,2	-9,1	-8,1	-8,9	-8,4	-8,9	-8,1	-9,9	-9,6	-8,1	-7,4	-7,5	-8,7	-7,7	-9,7
56	-7,9	-8,3	-9,1	-8,3	-8,6	-8,1	-8,4	-8,1	-10,0	-10,1	-8,1	-7,6	-7,6	-9,3	-7,7	-8,4
57	-9,1	-9,1	-9,4	-9,5	-9,8	-8,6	-8,3	-7,7	-9,6	-9,9	-7,5	-6,5	-7,0	-9,4	-6,4	-9,2
58	-9,3	-9,1	-9,5	-9,2	-9,9	-8,8	-8,1	-7,8	-9,2	-9,3	-7,1	-6,6	-6,7	-8,9	-5,7	-8,4
59	-8,7	-8,6	-9,0	-8,7	-8,0	-7,8	-8,1	-7,5	-9,3	-10,1	-8,0	-7,7	-7,0	-8,4	-7,6	-8,2
60	-9,2	-9,2	-9,1	-8,8	-9,5	-8,5	-8,1	-7,5	-9,7	-9,6	-8,2	-7,0	-7,0	-8,5	-5,6	-8,8
61	-8,7	-8,7	-9,3	-9,3	-8,6	-8,0	-8,3	-7,8	-9,6	-9,7	-7,2	-6,4	-6,9	-9,3	-6,2	-9,0
62	-8,8	-9,0	-9,6	-8,9	-9,4	-8,1	-8,3	-7,6	-9,5	-9,5	-7,5	-6,5	-7,2	-9,4	-4,9	-9,0

4.3.3. RAZPRAVA

Vezava na ER za 3-BK in 4-MBK je bila z visoko zanesljivostjo napovedana s programom VegaNIC, s programom Endocrine Disruptome pa smo največjo verjetnost vezave obeh derivatov kafe dobili kot agonist na ER β in visoko verjetnost vezave kot antagonist na ER β . Rezultati napovedi vezave metabolitov na ER so nam s programom Endocrine Disruptome pokazali večjo verjetnost vezave na agonistični konformaciji ER α in ER β in večinoma majhno do srednjo verjetnost vezave na antagonistični konformaciji ER α in ER β . Iz dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da imajo največjo afiniteto za vezavo na ER β metaboliti z uvedeno hidroksilno skupino na aromatskem ali alicikličnem obroču ter metaboliti z uvedeno karboksilno ali ketonsko skupino. Aliciklični obroč s hidroksilno ali ketonsko skupino povezan s fenolnim strukturnim delom izkazuje podobnost z endogenim ligandom 17 β -estradiolom in zato ni nepričakovano, da smo za te metabolite dobili največjo verjetnost vezave. Za metabolite z epoksidnim oboročem se napovedi programov razlikujeta: program VegaNIC je napovedal visoko verjetnost vezave samo za en metabolit z epoksidnim oboročem, Endocrine Disruptome pa za večino metabolitov z epoksidnim oboročem. Med metaboliti z epoksidnim oboročem imajo največjo afiniteto na ER β tiste spojine, ki nimajo še dodatno uvedene hidroksilne spojine na obroč, kar tudi v tem primeru kaže na določene strukturne podobnosti z endogenim ligandom 17 β -estradiolom. Če primerjamo napoved verjetnosti vezave na ER izhodnih derivatov kafe z njunimi metaboliti, se za vezavo kot agonist na ER α iz območja srednje do visoke verjetnosti pri metabolitih verjetnost vezave še poveča do največje verjetnosti vezave. Pri vezavi kot agonist na ER β ostaja največja verjetnost vezave tudi pri 35% vseh metabolitov. Pri vezavi kot antagonist na ER α in ER β verjetnost vezave pri metabolitih večinoma ostaja v območju srednje in visoke verjetnosti oz. pri nekaterih metabolitih se zmanjša na majhno verjetnost vezave. *In vivo* in *in vitro* raziskave endokrinih učinkih izbranih derivatov kafe so razkrile delovanje na estrogenske, androgene, progesteronske in tiroidne receptorje. Aktivnost na ER α in ER β so v eni od raziskav ugotavljali *in vitro* na tumorski celični liniji MCF-7 ter *in vivo* na maternicah podgan: rezultati na tumorskih celicah so pokazali, da ima 3-BK večjo afiniteto vezave do ER β kot 4-MBK (3-BK z EC50: 0,68 μ M in za 4-MBK z EC50: 3,9 μ M), hkrati pa so dokazali tudi vpliv 3-BK in 4-MBK na celično

proliferacijo (71). Raziskava *in vivo* na ribah je pokazala, da ima 3-BK desetkrat močnejše estrogeno delovanje kot 4-MBK, in da ga vrednosti ED (vrednosti učinkovitih doz) uvrščajo med spojine z močnejšim estrogenim delovanjem; za 3-BK je bila ED50: 16 mg/kg/injekcijo (72); vezavo na ER glede na napovedi *in silico* metod z največjo verjetnosto in visoko zanesljivostjo izkazujeta oba izbrana derivata kafe. V raziskavi *in vivo* na podganah so za 3-BK in 4-MBK poročali o spremenjenih vrednostih mRNA na estrogensko reguliranih genih v prostati, maternici in možganih (73), v *in vivo* raziskavi na podganah pa so po peroralnem dajanju 3-BK ugotovili moteno ekspresijo genov, ki so regulirani preko receptorjev ER α in ER β (75). *In vitro* preučevanje delovanja 3-BK na človeške ER α receptorje je pokazalo tako agonistično kot antagonistično delovanje (74), delovanje 3-BK in 4-MBK na ER α pa so dokazali tudi z *in vitro* poizkusi na človeških celicah placente (76). Naši *in silico* rezultati so z visoko zanesljivostjo napovedali biološko aktivnost 3-BK in 4-MBK na estrogenskih receptorjih, program Endocrine Disruptome je največjo verjetnost vezave pokazal na ER β kot agonist in visoko verjetnost vezave na ER β kot antagonist. Metaboliti, ki so v programu VegaNIC z visoko zanesljivostjo pokazali estrogensko delovanje, so nastali s hidroksilacijo na *p*- in *o*-mestu aromatskega obroča: **7**, **18** (3-BK), z redukcijo dvojne vezi: **10**, **11**, **38**, **40** (3-BK in 4-MBK), hidroksilacijo aromatskega in/ali alicikličnega obroča: **49-56** (4-MBK) ter s tvorbo epoksidnega obroča in hkratno redukcijo ketona na alicikličnem obroču: **60** (4-MBK). Estrogeno aktivnost so v raziskavah pokazali tudi *p*-substituirani alkilfenoli (83), ki jih najdemo tudi med našimi metaboliti: **7**, **8**, **9** (3-BK). Če primerjamo te rezultate s programom Endocrine disruptome, smo za metabolite z reducirano dvojno vezjo (3-BK, 4-MBK) dobili le srednjo in visoko verjetnost vezave, prav tako tudi pri hidroksilaciji na aromatu in alicikličnem obroču (4-MBK) nismo dobili največje verjetnosti vezave. Endocrine Disruptome je sicer največjo afiniteto vezave na agonistično konformacijo ER β napovedal za 35% metabolitov in na agonistično konformacijo ER α za 11% metabolitov; vezava kot antagonist za metabolite je bila za večino napovedana kot malo ali srednje verjetna. Oba programa sta torej pravilno napovedala estrogensko aktivnost za derivata kafe, kar se tiče njunih metabolitov pa je z raziskavami potrjen metabolit **7** v obeh *in silico* metodah izkazal aktivnost na ER z največjo stopnjo verjetnosti vezave na oba jedrna receptorja. Program VegaNIC je za

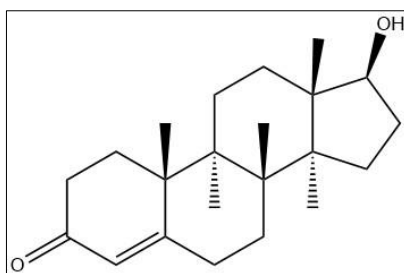
napoved endokrinih učinkov pri pozitivni kontroli napovedal aktivnost z visoko zanesljivost, za negativno kontrolo pa neaktivnost z visoko napovedno zanesljivostjo, kar je v skladu z znanimi učinki BPA in timola. Program Endocrine Disruptome je pravilno napovedal majhno verjetnost vezave negativne kontrole, vendar je pri pozitivni kontroli napovedal le srednjo verjetnost vezave na ER α in ER β . Glede na ugotovljeno večjo afiniteto 3-BK na ER od BPA (82), obstaja možnost, da je izbrana pozitivna kontrola šibkejši ligand in ga zato program ne uvršča med spojine z največjo verjetnostjo vezave. Primerjava rezultatov *in vivo/in vitro* z našimi rezultati *in silico* nam kaže na to, da se visoka zanesljivost in največja verjetnost vezave 3-BK in 4-MBK pri naši analizi ujema s poročanimi rezultati vezave na ER v raziskavah; relativna afiniteta vezave na humani ER β glede na endogeni ligand 17 β -estradiol (IC₅₀: 2,13 ng) je bila v eni izmed raziskav ovrednotena na 0,02% za 3-BK (IC₅₀: 11,8 μ M) in 0,006% za 4-MBK (IC₅₀: 3,53 μ M) (71). Glede na to, da je 4-MBK v EU dovoljena za uporabo v kozmetičnih izdelkih, bi bilo smiselno opraviti nadaljnje *in vivo/in vitro* raziskave. V *in vitro* Yeast Estrogen Screen (YES) testu, ki poteka na gensko modificiranih glivah kvasovkah z vključenim DNA zapisom za humani ER α , je raziskava za 4-MBK pokazala na 8% vrednosti maksimalnega odziva, povzročene s 17 β -estradiolom; vrednosti EC₅₀ so znašale za 3-BK 44,2 μ M in za 4-MBK 44,3 μ M (78). V mnenju SCCS za 4-MBK sicer navajajo dejstvo o njegovih estrogenih učinkih, vendar omenjajo občutno manjšo afiniteto vezave do ER kot pozitivna kontrola 17 β -estradiol (79). Rezultate o estrogenih učinkih 4-MBK navaja študija, ki je ugotovila boljše aktivacijo na ER od fitoestrogenov kot sta resveratrol in genistein; ta raziskava tudi poroča o bolj izraženi agonistični aktivnosti na ER β kot na ER α (81). V študiji estrogenega delovanja 3-BK in 4-MBK, v kateri so izpostavili pomembnost selektivnosti med delovanjem na ER α in ER β , ne izključujejo možnosti, da so ravno metaboliti odgovorni za aktivnosti na različnih podtipih ER (82). Pri našem raziskovanju *in silico* je bila za 4-MBK in njene metabolite največja verjetnost aktivacije napovedana za ER β , ki se najmočneje izražajo v jajčnikih. Za nadaljnje raziskave dokazovanja estrogenske aktivacije 4-MBK in njegovih metabolitov predlagamo bolj usmerjeno preučevanje delovanja na ER β skupaj z raziskavo metabolitov v različnih organih in organskih sistemih.



Slika 22: Struktura 17β-estradiola kot endogenega agonista na ER, struktura BPA za katero je dokazana aktivnost na ER in struktura metabolita 3-BK (naš metabolit **7**), katerega obstoj je dokazan z raziskavami *in vivo* in ki je v obeh *in silico* metodah bil z veliko verjetnostjo napovedan kot agonist na ER.

Vezava na AR za 3-BK in 4-MBK je bila napovedana z največjo verjetnostjo na antagonistično in z visoko do največjo verjetnostjo na agonistično konformacijo receptorja. Rezultati napovedi vezave metabolitov na AR so nam s programom Endocrine Disruptome pokazali največjo verjetnost vezave kot agonist za 42% metabolitov in kot antagonist za 52% metabolitov. Iz dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da imajo največjo afiniteto za vezavo na AR metaboliti z uvedeno hidroksilno ali/in ketonsko skupino, metaboliti z reducirano dvojno vezjo in metaboliti z epoksidnim obročem. Če primerjamo napoved verjetnosti vezave na AR izhodnih derivatov kafe z njunimi metaboliti, ostajajo napovedi v območju najvišje do visoke verjetnosti. Glede na strukturo testosterona, ki ima na androstan steroidnem skeletu prisotno ketonsko in hidroksilno skupino, je glede na strukture naših metabolitov, ki imajo večinoma uvedeno hidroksilno in/ali ketonsko skupino, vezava pričakovana. Vezava na AR je bila z *in silico* metodami napovedana kot agonist in kot antagonist. Aktivnost na androgenih receptorjih so raziskovali *in vitro* na tumorski celični liniji MDA-kb2, kjer 3-BK in 4-MBK nista izkazovala agonistične aktivnosti na AR (80). Z *in vitro* raziskavo na humanih receptorskih sistemih ter *in vivo/in vitro* raziskavo na ribah so ugotovili antiandrogeno delovanje obeh derivatov kafe (74). V *in vitro* raziskavi na človeških celicah placent je bila antagonistična aktivnost na AR dokazana samo za 4-MBK, ne pa tudi za 3-BK; oba derivata kafe sta bila testirana še za agonistične androgene učinke, vendar jih niso zaznali (76). Mnenje SCCS o 4-MBK izvira iz leta 2008 in v njem še ni navedenih novih dokazov o androgeni aktivnosti, ki so bili

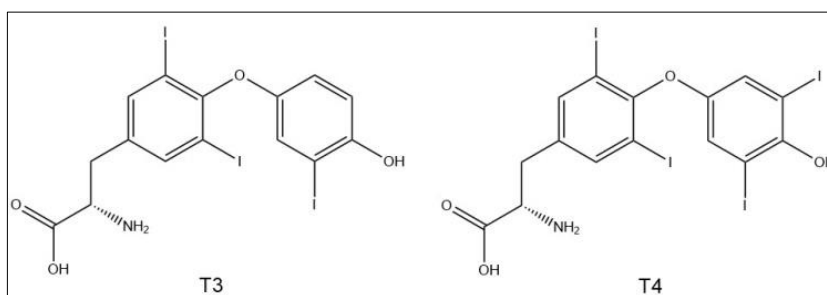
ugotovljeni kasneje, kot je na primer zgoraj omenjena študija *in vitro* na celicah človeške placente iz leta 2013 (76). Glede na to, da so metabolite derivatov kafe našli tudi v testisih, je glede na novejša raziskava, ki poročajo o antiandrogenem delovanju 4-MBK in močne napovedne kazalce vezave tudi za večino metabolitov v naši *in silico* analizi, smiselno razmišljati v smeri dodatnih *in vitro/in vivo* raziskav, ki bi se osredotočale predvsem na antiandrogene učinke.



Slika 23: Struktura testosterona.

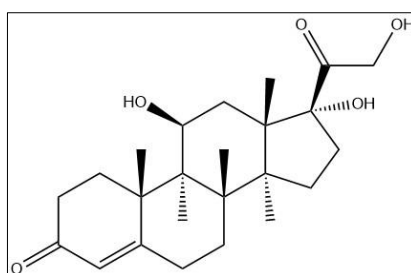
Vezava na TR za 3-BK in 4-MBK je bila napovedana z visoko verjetnostjo za TR β in s srednjo verjetnostjo za TR α . Rezultati napovedi vezave metabolitov na TR so pokazali na visoko do srednjo verjetnost vezave na TR β in srednjo do nizko verjetnost vezave na TR α . Iz dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da imajo visoko verjetnost vezave na TR β metaboliti z uvedeno hidroksilno, karboksilno ali ketonsko skupino. Aktivnost na tiroidnih receptorjih so preučevali *in vivo* na podganah, kjer so poročali o povečanju teže ščitnice po peroralnem dajanju višjih doz 4-MBK (73). Z drugo raziskavo *in vitro* na tumorski celični liniji FTC-133 so ugotovili, da 4-MBK ne inhibira tiroperoksidaze, zmanjša pa raven tiroksina (T4) (84). Rezultati ene izmed študij *in vivo* na podganah pa so pokazali, da 4-MBK zniža serumsko koncentracijo T4, poveča se izločanje ščitnico stimulirajočega hormona (TSH), a hkrati se poviša serumska koncentracija trijodtironina (T3); glede na rezultate so sklepali na inhibicijo tiroperoksidaze in hkratno aktivacijo dejodinaze pri pretvorbi T4 v T3 (85). TR β je jedrni receptor za T3 in povečana aktivnost na tem receptorju bi lahko bila vzrok za izmerjene višje serumske koncentracije T3. Naši rezultati *in silico*, dobljeni s programom Endocrine Disruptome, so napovedali veliko verjetnost vezave 3-BK in 4-MBK na TR β ter veliko do srednjo verjetnost vezave na TR β za praktično vse dobljene metabolite. V strukturi T3 in T4 sta prisotni hidroksilna in

karboksilna skupina, slednja se tudi v raziskavah delovanja spojin na ščitnico omenja kot pomembna pri vezavi na tiroidne receptorje (97). Tudi naši metaboliti, za katere je bila napovedana vezava z visoko verjetnostjo, imajo v svoji strukturi karboksilno in hidroksilno skupino in vezava na TR je glede na to strukturno podobnost pričakovana. Dozdajšnje ugotovitve *in vivo/in vitro* raziskav skupaj z rezultati *in silico* podpirajo smiselnost nadaljnjih usmerjenih raziskav selektivnega delovanja za obe podskupini TR receptorjev.



Slika 24: Strukturi trijodtironina (T3) in tiroksina (T4).

Vpliv derivatov kafe (3-BK in 4-MBK) na **aktivacijo in inhibicijo receptorjev GR, LXR, PPAR, RXR** je *in vitro/in vivo* manj raziskan, *in silico* rezultati pa so za 3-BK, 4-MBK in za večino analiziranih metabolitov napovedali majhno verjetnost vezave. Srednja verjetnost vezave je bila napovedana na agonistični konformaciji glukokortikoidnega receptorja za oba izbrana derivata kafe in za vse njune metabolite, kar glede na strukturo glukokortikoidov na osnovi steroidnega skeleta, keto in hidroksilnimi skupinami ni presenetljivo. Rezultate lahko uporabimo kot kazalec za eno od morebitnih poti za nadaljnje raziskave endokrinih učinkov derivatov kafe.



Slika 25: Struktura glukokortikoida kortizola.

3-BK je v EU prepovedana sestavina, glede na opravljene raziskave in dozdajšnje dokaze o endokrinih učinkih, ki lahko vodijo do nastanka raka, bi jo bilo smiselno popolnoma

prepovedati tudi v ZDA in v azijskih državah. V ZDA se sicer ne sme uporabljati kot UV filter, lahko pa se uporablja za zaščito ostalih sestavin v kozmetičnem izdelku. 3-BK je v primerjavi z BPA po peroralnem zaužitju celo desetkrat bolj toksična v smislu endokrinih učinkov posredovanih preko ER (71, 77). 4-MBK je dovoljen UV-filter in se uporablja tudi kot UV-absorbent za zaščito ostalih sestavin. Uporaba 4-MBK ni vezana samo na kozmetične izdelke za zaščito pred soncem, ampak tudi na ostale negovalne izdelke ter dekorativo. Glede na že izvedene študije in nekatere dvome o dejanskih endokrinih učinkih nam naši rezultati koristijo za nadaljnje bolj usmerjene raziskave – hormonski sistem deluje povezano, s svojim izjemno obširnim sistemom delovanja preko številnih receptorjev pa vpliva na vse organe v telesu. Strukturne podobnosti izbranih derivatov kafe in njihovih metabolitov obstajajo z večimi endogenimi lignadi kot so 17 β -estradiol, testosteron, T3, T4 in glukokortikoidi, zato je pomembno njihovo nadaljnje raziskovanje endokrine toksičnosti.

4.4. NAPOVED REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI

Za napoved reproduktivne toksičnosti smo uporabili različne programe – ekspertni sistem in QSAR modele. Rezultate računalniških programov Derek Nexus, VegaNIC in TEST smo dobili v različnih zapisih, zato smo jih z namenom večje preglednost združili v eno skupno preglednico (Preglednica IX).

4.4.1. REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM DEREK NEXUS

Program Derek Nexus je pri metabolitih, pri katerih obstaja verjetnost za razvojno toksičnost, teratogenost ali testikularno toksičnost, izdal opozorilo v izpisanem poročilu. Stopnje verjetnosti za posamezno toksičnost so opredeljene v treh stopnjah verjetnosti: verjetno – *probable*, možno – *plausible* in dvoumno – *equivocal*.

- Za negativno kontrolo (timol) program ni izdal opozorila, za pozitivno kontrolo (BPA) pa je izdal opozorilo o dvoumni verjetnosti za testikularno toksičnost. Za 3-BK in 4-MBK program ni izdal opozorila o teratogenosti, razvojni ali testikularni toksičnosti.

- Za metabolite 21, 23, 24, 25, 57, 58, 60, 61 in 62 je program izdal opozorilo o **možni verjetnosti za razvojno toksičnost**. Ti metaboliti imajo v svoji strukturi epoksidni obroč. Rezultati o verjetnosti za reproduktivno toksičnost zbranih metabolitov derivatov kafe so predstavljeni v preglednici IX.

4.4.2. REZULTATI, PRIDOBLENI S PROGRAMOM VEGANIC – DEVELOPMENTAL/REPRODUCTIVE TOXICITY LIBRARY

S programom VegaNIC z modelom Developmental/Reproductive Toxicity Library (PG) 1.0.0 smo napovedali razvojno/reproduktivno toksičnost spojin. Rezultati so podani v obliki aktivnosti ali neaktivnosti spojine, zanesljivost napovedi pa je podana v treh stopnjah in označena s številom zvezdic: visoka (***), srednja (**), ali nizka (*). Če se je spojina nahajala izven območja uporabnosti modela, se je to izpisalo v poročilu programa.

- Za negativno kontrolo (timol) smo dobili podatek, da se nahaja izven območja uporabnosti modela. Za pozitivno kontrolo (BPA) je z visoko zanesljivostjo (***) napovedal razvojno/reproduktivno toksičnost. Za 3-BK in 4-MBK je rezultat izven območja uporabnosti modela.
- Za metabolite izbranih derivatov kafe je program pri vseh izdal opombo, da se nahajajo izven območja uporabnosti modela, tako da v tem modelu programa VegaNIC nismo dobili uporabnih rezultatov. Rezultati za metabolite so podani v preglednici IX.

4.4.3. REZULTATI, PRIDOBLENI S PROGRAMOM VEGANIC – DEVELOPMENTAL TOXICITY

S programom VegaNIC z modelom Developmental Toxicity (CAESAR) 2.1.7 smo napovedali razvojno toksičnost. Rezultate v smislu aktivnosti/neaktivnosti nam je podal še z oceno zanesljivosti napovedi v treh stopnjah: visoka (***), srednja (**), ali nizka (*). V primeru, da se je spojina nahajala ali bi se lahko nahajala izven območja uporabnosti napovednega modela, je to bilo dopisano v končnem poročilu rezultatov - vse te primere smo v razpredelnici IX posebej označili.

- Za negativno kontrolo (timol) in za pozitivno kontrolo (BPA) je program z visoko zanesljivostjo (***) napovedal razvojno toksičnost. Za 3-BK in 4-MBK je program z visoko zanesljivostjo (***) napovedal razvojno toksičnost.
- Za metabolite 1, 2, 5, 7, 8, 10 - 12, 14, 15, 18, 19, 22, 27, 30, 33, 35, 37, 38, 40 - 44, 46, 47, 49, 51, 53, 55 in 59 je program z visoko zanesljivostjo (***) napovedal razvojno toksičnost. Ti metaboliti imajo v svoji strukturi uvedeno hidroksilno, karboksilno ali ketonsko skupino, med nje pa spadajo tudi metaboliti z reducirano dvojno vezjo. Med metaboliti, za katere ni bila napovedana reprodukativna toksičnost, prav tako najdemo strukture z uvedeno hidroksilno, karboksilno in ketonsko skupine ter metabolite z reducirano dvojno vezjo, tako da konkretnih zaključkov glede značilnih strukturnih fragmentov, ki jih program označi kot reprodukativno toksične, ne moremo podati. Vsi ostali metaboliti se nahajajo ali se lahko nahajajo izven območja uporabnosti modela; med te sodijo tudi vsi metaboliti z epoksidnim obročem. Rezultati za metabolite so podani v preglednici IX.

4.4.4. REZULTATI, PRIDOBLJENI S PROGRAMOM TEST

Program TEST nam je napovedal ali je spojina razvojno toksična ali ne. Rezultat je bil podan tudi v obliki številčne vrednosti, kjer vrednosti nad 0,50 (nad 50%) pomenijo, da je spojina razvojno toksična, hkrati pa ta vrednost opredeljuje tudi stopnjo verjetnosti (višji kot je procent, višja je verjetnost, da je spojina razvojno toksična). Poleg numeričnega rezultata je pri vsaki spojini tudi opisano ali je ali ni razvojno toksična.

- Za negativno kontrolo (timol) je program napovedal, da je razvojno toksična z verjetnostjo 0,99. Za pozitivno kontrolo (BPA) je program napovedal, da je razvojno toksična z verjetnostjo 0,68. Za 3-BK je napovedana razvojna toksičnost z verjetnostjo 0,53; za 4-MBK pa je prav tako napovedana razvojna toksičnost, in sicer z verjetnostjo 0,63.
- Za vse metabolite, razen za metabolit številka 21, je program napovedal, da so razvojno toksični. Glede na dobljene rezultate se na ta program ne moremo zanesti, napovedna moč je nezanesljiva, saj je celo za negativno kontrolo timol napovedal 99% razvojno toksičnost. Dobljene vrednosti so predstavljene v preglednici IX.

Preglednica IX: Rezultati napovedi za različne vidike reproduktivne toksičnosti programov Derek Nexus, TEST in dveh modelov programa VegaNIC; legenda: negativni znak (-) – ni podanega opozorila za reproduktivno toksičnost, zvezdice na rumeni podlagi – spojina se nahaja ali se lahko nahaja izven območja uporabnosti modela, zvezdice na rdeči podlagi – spojina je razvojno toksična, številka na rdeči podlagi – spojina je razvojno toksična, številka na zeleni podlagi – spojina ni razvojno toksična.

METABOLIT	DEREK NEXUS REPORT	VEGANIC - Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) 1.0.0	VEGANIC - Developmental Toxicity model (CAESAR) 2.1.7	TEST
<u>1</u>	-	*	***	0,92
<u>2</u>	-	*	***	1,03
<u>3</u>	-	*	*	0,86
<u>4</u>	-	*	*	0,97
<u>5</u>	-	*	***	0,92
<u>6</u>	-	*	*	0,89
<u>7</u>	-	*	***	0,90
<u>8</u>	-	*	***	0,94
<u>9</u>	-	*	*	0,92
<u>10</u>	-	*	***	0,79
<u>11</u>	-	*	***	0,78
<u>12</u>	-	*	***	0,84
<u>13</u>	-	*	*	0,85
<u>14</u>	-	*	***	0,83
<u>15</u>	-	*	***	0,96
<u>16</u>	-	*	*	0,81
<u>17</u>	-	*	*	0,70
<u>18</u>	-	*	***	0,90
<u>19</u>	-	*	***	0,77
<u>20</u>	-	*	*	0,68
<u>21</u>	možna razvojna toksičnost	*	**	0,49
<u>22</u>	-	*	***	0,65
<u>23</u>	možna razvojna toksičnost	*	*	0,68
<u>24</u>	možna razvojna toksičnost	*	**	0,87
<u>25</u>	možna razvojna toksičnost	*	**	0,86
<u>26</u>	-	*	**	0,74
<u>27</u>	-	*	***	0,99
<u>28</u>	-	*	**	0,83
<u>29</u>	-	*	*	0,77
<u>30</u>	-	*	***	0,82
<u>31</u>	-	*	*	0,72
<u>32</u>	-	*	*	1,01
<u>33</u>	-	*	***	0,94

<u>34</u>	-	*	*	0,79
<u>35</u>	-	*	***	0,76
<u>36</u>	-	*	**	0,91
<u>37</u>	-	*	***	1,01
<u>38</u>	-	*	***	0,66
<u>39</u>	-	*	**	0,72
<u>40</u>	-	*	***	0,69
<u>41</u>	-	*	***	0,89
<u>42</u>	-	*	***	0,85
<u>43</u>	-	*	***	0,71
<u>44</u>	-	*	***	0,78
<u>45</u>	-	*	**	0,83
<u>46</u>	-	*	***	0,77
<u>47</u>	-	*	***	0,66
<u>48</u>	-	*	*	0,77
<u>49</u>	-	*	***	0,89
<u>50</u>	-	*	**	0,96
<u>51</u>	-	*	***	0,74
<u>52</u>	-	*	*	0,82
<u>53</u>	-	*	***	0,93
<u>54</u>	-	*	**	0,90
<u>55</u>	-	*	***	0,79
<u>56</u>	-	*	*	0,74
<u>57</u>	možna razvojna toksičnost	*	*	0,57
<u>58</u>	možna razvojna toksičnost	*	*	0,91
<u>59</u>	-	*	***	0,67
<u>60</u>	možna razvojna toksičnost	*	*	0,61
<u>61</u>	možna razvojna toksičnost	*	**	0,86
<u>62</u>	možna razvojna toksičnost	*	**	0,84

4.4.5. RAZPRAVA

Reprodukтивna toksičnost zajema več vplivov na sposobnost razmnoževanja in razvoj. Toksični učinki so lahko prisotni med razvojem zarodka v maternici, po rojstvu z zaužitjem toksičnih spojin z materinim mlekom, spremembe pa so lahko pridobljene pred rojstvom in se izrazijo kasneje. V raziskavi, kjer so ugotavljali prisotnost UV-filtriv v materinem mleku, so ugotovili njihovo prisotnost v 82% odvzetih vzorcev in primerjava prisotnosti v vzorcih je korelirala z uporabo kozmetičnih izdelkov z UV-filtri kot je 4-

MBK (98). Reproductivna toksičnost je lahko tudi posledica endokrinih učinkov med razvojem ploda. V eni izmed raziskav so posebno pozornost namenili vplivu hormonskih motilcev na nosečnice in majhne otroke, saj lahko imajo motnje ščitnice škodljive učinke na živčni sistem; v njej povzemajo podatke študij, ki smo jih navajali tudi mi, in zaključujejo, da so študije glede učinkov UV-filtrov na ščitnico trenutno še vedno pomanjkljive (86). Teratogenost 3-BK so do zdaj preučevali *in vivo* na miših, podganah in zajcih (87), največji vpliv na reprodukcijo so zaznali pri podganah. V eni izmed raziskav so podganam peroralno dajali 3-BK in opazovali učinke na prvi in na drugi generaciji. Druga generacija podganjih samic je do parjenja in podganjih samcev izkazovala odklonilno vedenje. Iz te študije izhaja vrednost NOAEL, ki so jo v mnenju SCCS uporabili za izračun MoS za 3-BK (69), ki je znašala manj od 100 in posledično je SCCS sklenil, da 3-BK ni varen za uporabo v kozmetičnih izdelkih. Vrednotenje rezultata MoS je sicer odvisno tudi od obravnave od primera do primera, dodatnih dokazov pri primerjavi vplivov na žival in človeka ter od pogojev raziskave (88). Takšen poseben primer je bil ravno pri vrednotenju rezultata MoS za 4-MBK. Kljub MoS vrednosti manjši od 100 je prišlo do dodatnih ugovorov glede pomembnosti razlik v farmakokinetiki med testiranimi živalmi in ljudmi ter podatkom, da so podgane bolj podvržene toksičnim učinkom na ščitnico kot ljudje (79) in 4-MBK je ostala kot varna in dovoljena sestavina v EU. V raziskavi iz leta 2009, torej eno leto po izdanem mnenju SCCS, da je 4-MBK varna, so *in vivo* na podganah preučevali nevroendokrine parametre, ki regulirajo razmnoževanje in njihov vpliv na potomce. Ugotovili so spremenjene vrednosti gonadotropinov luteinizirajočega in folikle stimulirajočega hormona pri naslednji generaciji, torej potomcih, in prišli do zaključka, da 4-MBK moti izločanje gonadotropinov, ki so kontrolirani preko hipotalamusa (89).

Programi, ki smo jih uporabili za napovedi reproductivne toksičnosti so glede rezultatov neenotni. Derek Nexus nam za izbrana derivata kafe ni napovedal reproductivne toksičnosti, VegaNIC model »Developmental/Reproductive Toxicity Library (PG)« je napovedal, da sta spojini izven območja uporabnosti modela, VegaNIC model »Developmental Toxicity (CAESAR)« in program TEST sta za oba UV filtra napovedala pozitiven rezultat, prvi celo z visoko zanesljivostjo. Program Derek Nexus nam je pri

analizi metabolitov napovedal možno razvojno toksičnost za metabolite s prisotnim epoksidnim obročem v strukturi. Glede na to, je struktura epoksidnega obroča lahko razlog za toksičnost, se po drugi strani pri študijah različnih spojin z epoksidnim obročem postavlja vprašanje, v kakšnem obsegu so takšni metaboliti zares prisotni v telesu in v kakšnem obsegu jih telo naprej metabolizira v neškodljive spojine (90). Program VegaNIC model »Developmental/Reproductive Toxicity Library (PG)« se je za naše analizirane metabolite kot tudi za izbrana derivata kafe izkazal kot neuporaben, saj za nobeno spojino nismo dobili rezultata – vsi so izven območja uporabnosti modela. Glede na to, da ta model bazira na virtualni knjižnici podatkov, je to za določeno skupino spojin seveda možno. Predlagali bi, da se ta model v programu VegaNIC nadgradi, saj derivati kafe glede na vse študije in polemike predstavljajo pomembno strukturno skupino za raziskovanje reproduktivne toksičnosti. Program VegaNIC model Developmental Toxicity (CAESAR) je z visoko zanesljivostjo napovedal razvojno toksičnost za večino metabolitov, ne pa tudi za epoksidirane metabolite, kar ponovno kaže na neenotnost, posledično nezanesljivost in vprašljivo uporabnost takšnih podatkov za nadaljnje delo. Program TEST je za praktično vse strukture metabolitov napovedal razvojno toksičnost, sicer z različnimi vrednosti za verjetnost, rezultati pa še dodatno kažejo na neenotnost pri *in silico* metodah za napovedovanje reproduktivne toksičnosti. Do zdaj izvedene študije nakazujejo na reproduktivno toksičnost 3-BK in 4-MBK, vendar bi bile potrebne še nadaljnje raziskave. Iz naših podatkov pridobljenih *in silico* lahko zaključimo, da v tem trenutku programi še niso dovolj zanesljivi, baze podatkov od koder črpajo informacije za napoved reproduktivne toksičnosti pa so nepopolne. Dva programa sta tudi za negativno kontrolo napovedala visoko verjetnost reproduktivne toksičnosti, kar je še dodaten dokaz o potrebnih dopolnitvah in dodelavah teh programov. Sklepamo, da je timol bil pozitiven zaradi fenolne skupine v svoji strukturi, pri čemer ga je program neustrezno primerjal z drugimi endokrinimi in reproduktivno toksičnimi spojinami, ki imajo omenjen fragment v svoji strukturi. Za učinkovito uporabo v raziskavah oz. usmerjeno nadaljnje delo bi bile potrebne programske izboljšave ter še kompleksnejši nabor informacij in baz preučevanih spojin.

Prepoved uporabe 3-BK v kozmetičnih izdelkih je bila izdana 28. julija 2015. 4-MBK je v EU dovoljena sestavina, ki se lahko kot UV-filter uporablja v koncentraciji do največ 4% v gotovem izdelku, uporablja pa se tudi kot UV-absorbent za zaščito ostalih sestavin. V zadnjem mnenju SCCS o 4-MBK, ki je bilo objavljeno 2008, so bile predstavljene diskusije o dobljenih rezultatih glede meje varnosti. Mnenje, da je sestavina v omenjeni koncentraciji varna, je vezano samo na uporabo v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem, ne pa tudi na razpršilce in aerosole, ki jih lahko inhaliramo ali za ličila/balzame za ustnice, ki jih lahko zaužijemo. 4-MBK so zaznali tudi v vodah in ribah na različnih delih sveta, kar kaže na to, da smo preko onesnaženja okolja s kozmetičnimi izdelki derivatom kafe izpostavljeni tudi s hrano. V raziskavi bioakumulacije in biomagnifikacije 4-MBK v ribah v iberskih rekah so ugotovili koncentracije v rangu $\mu\text{g/g}$ suhe teže, poleg tega pa so najvišje koncentracije izmerili v ribah predatorjih, ki so pogoste v naši prehrani (99). Na trgu so izdelki za zaščito pred soncem s 4-MBK v obliki balzamov za ustnice, razpršil in aerosolov, zato menimo, da bi takšne tehnološke oblike prav tako morali upoštevati pri ponovni obravnavi varnosti. Velika popularizacija lepotnih socialnih medijev, kozmetičnih blogov in vlogov, ki po svetu prerašča meje hobija v dobičkonosen poklic, pomeni tudi povečano uporabo kozmetičnih izdelkov, predvsem dekorative, kjer se UV-filtri uporabljajo za zaščito ostalih sestavin. Za namene spletnih objav danes ni nič neobičajnega, če uporabnice nanesejo tudi do deset različnih odtenkov posameznega ličila na dan in zato bi predlagali, da se pri novih obravnavah razmisli tudi o spremenjenih navadah potrošnikov. Podobnost strukture in metabolitov 4-MBK s 3-BK, več študij s potrjenim delovanjem na hormonskih receptorjih podpirajo namero, da se varnost sestavine 4-MBK ponovno oceni. Za varnost pri uporabi kozmetičnih izdelkih so pomembne vse funkcije sestavine in zato je smiselno, da se le-te združeno upoštevajo pri ponovnih ocenah tveganja.

5. SKLEP

- a) Za 3-BK in 4-MBK smo z *in silico* metodo napovedali najverjetnejše reakcije metabolizma 1. in 2. faze. Glede na dozdajšnje *in vivo/in vitro* raziskave smo kot rezultat dobili tudi tri spojine, ki so bile dokazane kot metaboliti.
- b) *In silico* napovedi za endokrino delovanje 3-BK in 4-MBK se večinoma ujemajo z dokazi *in vivo/in vitro* testiranj. Po pregledu do zdaj opravljenih raziskav smo ugotovili, da izraža 4-MBK bolj selektivno delovanje na ER β , kar se ujema z našimi *in silico* ugotovitvami. Selektivnost delovanja na posamezne podtipe ER s hkratnim ujemanjem *in vitro/in vivo/in silico* metod predstavlja pomemben podatek pri nadaljnjih ciljanih raziskavah na ER β . 4-MBK izkazuje antiandrogeno delovanje tako v študijah *in vivo/in vitro* kot tudi pri našem delu *in silico* ter predstavlja še dodaten argument za nadaljnje raziskave in ponovno oceno tveganja. Oba derivata kafe izkazujeta aktivnost na TR, z našo *in silico* metodo pa smo tudi na tem primeru podprli smiselnost preučevanj učinkov na posameznih podtipih receptorjev.
- c) *In silico* metode za ugotavljanje reproduktivne toksičnosti so se za derivate kafe trenutno izkazale kot neuporabne. Programi so glede rezultatov neenotni, pozitivne rezultate smo dobili tudi pri negativni kontroli, poleg tega pa eden izmed modelov niti nima dovolj podatkov za kakršnekoli rezultate izbranih derivatov kafe in njihovih metabolitov.
- d) *In silico* metode so zaenkrat še premalo zanesljive, da bi lahko nadomestile *in vivo/in vitro* raziskave. Pri našem delu smo ugotovili njihovo uporabnost pri napovedih metabolizma in endokrinih učinkov, kjer trenutno predstavljajo dobrodošlo pomoč pri ciljanem načrtovanju ter omogočajo časovno in finančno učinkovitejše delo. Podatkovne baze in algoritme programov je lažje izboljševati na primerih, zato lahko takšno *in silico* preučevanje in poročanje konkretno pomaga pri računalniških nadgradnjah.

6. VIRI IN LITERATURA

1. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. Novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih, Annex VI, Reference 18.
2. <http://www.cdc.gov/cancer/skin/statistics/race.htm> (dostop: avgust 2016)
3. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/skin-cancer> (dostop: avgust 2016)
4. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. Novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih, Annex VI, List of UV filters allowed in cosmetic products.
5. Standardisation Mandate Assigned to CEN concerning methods for testing efficiency of sunscreen products, 2006, European Commission, Enterprise and industry directorate-general, consumer goods, M/389 EN.
6. Commission recommendation on the efficiency of sunscreen products and the claims made relating thereto, 2006, Official Journal of the European Union, notified under document number C (2006) 4089.
7. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-06-571_sl.htm (dostop: avgust 2016)
8. ISO 21348 Definitions of Solar Irradiance Spectral Categories.
9. Svobodová AR, Galandáková A, Sianská J, Doležal D, Lichnovska J, VolstaloVA J: DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light. Archives of Dermatol Research, 2012; 304: 407-412.
10. Halliday GM, Byrne SN, Damian DL: Ultraviolet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, 2012; 30: 214-221.
11. Lang G, Malaval A, Malle G : Sulphonamides derived from 3-benzylidene camphor and their application as UV filters, Patent US 4588839 A. Številka prijave US 06/511, 646. Datum objave 13 maj 1986.
12. Da Silva LP, Ferreira PJO, Miranda MS, Esteves da Silva JCG: A theoretical study of the UV absorption of 4-methylbenzylidene camphor: from the UVB to the UVA region. Photochemical & Photobiological Sciences 2014; 14:456-472.
13. Petauer T: Leksikon rastlinskih bogastev, prva izdaja, NUK, Ljubljana, 1993:131-132.
14. <https://www.drugs.com/npp/rosemary.html> (dostop: avgust 2016)

15. Alberts D, Hess M: Fundamentals of Cancer Prevention. Third edition, Springer, New York, 2014:311.
16. <http://www.codecheck.info/inhaltsstoff/4-Methylbenzylidene-Camphor> (dostop: avgust 2016)
17. <https://www.priceline.com.au/search/?limit=60&q=cancer+council> (dostop: avgust 2016)
18. Dancik Y, Bigliardi P, Bigliardi-Qi M: What happens in the skin? Integrating skin permeation kinetics into studies of developmental and reproductive toxicity following topical exposure. *Reproductive toxicity* 2015; 58; 252-281.
19. Monti D, Chetoni P, Burgalassi S, Tampucci S, Centini M, Anselmi C: 4-Methylbenzylidene camphor microspheres:reconstituted epidermis (Skintech) permeation and distribution. *International Journal of Cosmetic science* 2015; 37, 298-305.
20. <http://www.episkin.com/EPISKIN.asp> (dostop: avgust 2016)
21. <http://pharmazie-lehrbuch.de/kapitel/4-7.pdf> (dostop: avgust 2016)
22. Berne RM, Levy MN, Koepfen BM, Stanton Ba: *Physiology*, Fifth Edition, Mosby, St. Louis, Missouri, 2004: 719-728.
23. <http://www.endocrineweb.com/endocrinology/about-endocrine-system> (dostop: avgust 2016)
24. Neave N: *Hormones and Behaviour: A Psychological approach*. *Perspective and Biology Medicine*, Cambridge University Press, Cambridge, 2010; 53:152-155.
25. Goodman HM: *Basic Medical Endocrinology*, Fourth Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2009: 1-26.
26. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis_en.htm (dostop: avgust 2016)
27. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm (dostop: avgust 2016)
28. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf (dostop: avgust 2016)

29. Cassano A, Manganaro A, Martin T, Young D, Piclin N, Pintore M, Bigoni D, Benfenati E: CAESAR models for developmental toxicity. *Chemistry Central Journal* 2010; 4 (Suppl 1): S4.
30. http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/kozmeticni_proizvodi/snovi_ki_so_razvrscene_kot_cmr_snovi/ (dostop: avgust 2016)
31. Raunio H: In silico toxicology – non-testing methods. *Frontiers in Pharmacology* 2011; 2: Article 33.
32. http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_qsars_sl.pdf (dostop: julij 2016)
33. Long A: Drug metabolism in silico – the knowledge-based expert system approach. Historical perspectives and current strategies. *Drug discovery today. Technologies* 2013; 10: 147-53.
34. Nowak P, Wozniakiewicz M, Koscielniak P: Simulation of drug metabolism. *Trends in Analytical Chemistry* 2014; 59: 42-9.
35. <http://accelrys.com/products/datasheets/metabolism.pdf> (dostop: julij 2016)
36. <http://www.drugbank.ca/> (dostop: julij 2016)
37. <http://lsresearch.thomsonreuters.com/pages/solutions/10/metabase> (dostop: julij 2016)
38. <http://www.fujitsu.com/jp/group/kyushu/en/solutions/industry/lifescience/admedatabase/index.html> (dostop: julij 2016)
39. Zhang L, Sedykh A, Tripathi A, Zhu H, Afantiti A, Mouchlis VD, Melagraki G, Rusyn I, Tropsha A: Identification of putative estrogen receptor-mediated endocrine disrupting chemicals using QSAR- and structure-based virtual screening approaches. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013; 272: 67–76.
40. <http://edcs.unicartagena.edu.co/> (dostop: julij 2016)
41. <http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EndocrineDisruptorKnowledgebase/default.htm> (dostop: julij 2015)
42. <http://ctdbase.org/> (dostop: julij 2015)
43. <http://cascade.projectcoordinator.net/projectweb/portalproject/Cascade%20Research.html> (dostop: julij 2015)
44. <http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/dart.htm> (dostop: julij 2015)

45. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm> (dostop: julij 2015)
46. <http://www2.epa.gov/aboutepa/about-national-center-computational-toxicology-ncct> (dostop: julij 2015)
47. Commission Regulation (EU) 2015/1298: amending Annexes II and VI to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products, 2015 July 28.
48. Santa Cruz. Biotechnology, Inc: Thymol Safety Data Sheet, 2009 Nov 22.
49. <https://www.federalregister.gov/articles/2009/03/25/E9-6262/thymol-exemption-from-the-requirement-of-a-tolerance#h-21> (dostop: avgust 2016)
50. Vuorinen A, Odermatt A, Schuster D: *In silico* methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2013; 137: 18-26.
51. http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/dyna/consumervoice/create_cv.cfm?cv_id=716 (dostop: avgust 2016)
52. <https://echa.europa.eu/documents/10162/b217276c-f60e-4461-a94c-ae6809712815> (dostop: avgust 2016)
53. <https://www.lhasalimited.org/products/meteor-nexus.htm> (dostop: avgust 2016)
54. Judson et al: Assessing Confidence in Predictions Using Veracity and Utility – A Case Study on the Prediction of Mammalian Metabolism by Meteor Nexus. Molecular Informatics 2015;34: 284-29.
55. <https://www.lhasalimited.org/Public/Library/Brochures/Meteor%20Nexus.pdf> (dostop: avgust 2016)
56. <http://ceur-ws.org/Vol-1107/paper8.pdf> (dostop: avgust 2016)
57. <http://www.vega-qsar.eu> (dostop: avgust 2016)
58. <http://endocrinedisruptome.ki.si/receptors.html> (dostop: avgust 2016)
59. <http://endocrinedisruptome.ki.si/FAQ.html> (dostop: avgust 2016)
60. <https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm> (dostop: avgust 2016)
61. <https://www.lhasalimited.org/Public/Library/Brochures/Derek%20Nexus.pdf> (dostop:avgust 2016)

62. <http://www.caesar-project.eu/> (dostop: avgust 2016)
63. <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (dostop:avgust 2016)
64. Judson PN, Stalford S, Vessey J: Assessing confidence in predictions made by knowledge-based systems. *Toxicology Research*, 2013, 2: 70-79.
65. Völkel W, Colnot T, Schauer U, Broschard TH, Dekant W: Toxicokinetics and biotransformation of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 216: 331-338.
66. Schauer U, Völkel W, Heusner A, Colnot T, Broschard TH, von Landenberg F, Dekant W: Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats and human after dermal application. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 216: 339-346.
67. Soeborg T, Ganderup N-C, Kristensen J H, Bjerregaard P, Pedersen K L, Bollen P, Hansen S H, Halling-Sorensen B: Distribution of the UV filter 3-benzylidene camphor in rat following topical application. *Journal of Chromatography B*, 2006; 834: 117-121.
68. Glomot R, LeBigot J F: Centre International de Toxicologie, Miserey, France, 1991.
69. SCCS: Opinion on 3-benzylidene camphor, COLIPA n S61, 2013, Jun 18.
70. Kukovetz W R: Report on Percutaneous resorption of Mexoryl SD in man. Institut für Pharmakodynamik und Toxikologie der Universität Graz, 1991.
71. Schlumpf M, Jarry H, Wuttke W, Ma R, Lichtenseiger W: Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology*, 2004, 199: 109-120.
72. Holbech H, Norum U, Korsgaard B, Poul B: The chemical UV-Filter 3-BC causes an oestrogenic effect in an in vivo Fish Assay. *Pharmacology & Toxicology*, 2004; 91: 204-208.
73. Schlumpf et al: Endocrine activity and development toxicity of cosmetic UVC filters – an update. 2004b
74. Kunz PY, 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.

75. Faass O, Schlumpf M, Reolon S, Henseler M, Maerkel K, Durrer S, Lichtensteiger: Female sexual behaviour, estrous cycle and gene expression in sexually dimorphic brain regions after pre- and postnatal exposure to endocrine active UV filters. *Neurotoxicology*, 2009; 30: 249-260.
76. Jimenez-Diaz I, Molina-Molina J M, Zafra-Gomez A, Ballesteros O, Navalon A, Real M, Saenz J M, Fernandez M F, Olea N: Simultaneous determination of the UV filters benzyl salicylate, phenyl salicylate, octyl salicylate, homosalate, 3-(4-methylbenzylidene)camphor and 3-benzylidene camphor in human placental tissue by LC-MS/MS. Assessment of their in vitro endocrine activity. *Journal of Chromatography B*, 2013, 936: 80-87.
77. <https://cosmeticelementreview.wordpress.com/2015/08/12/eu-ban-3-benzylidene-camphor-3-bc/> (dostop: september 2016)
78. Schmitt C, Oetken M, Dittberner O, Wagner M, Oehlmann J: Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Pollution*, 2008; 152: 322-329.
79. SCCP: Opinion on 4-methylbenzylidene camphor, COLIPA n S60, 2008, Jun 24.
80. Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M: UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological sciences*, 2003; 74: 43-50.
81. Mueller SO, Kling M, Firzani A, Mecky A, Duranti E, Shields-Botella J, Delansorne R, Broschard T, Kramer PJ: Activation of estrogen receptor alpha and ERbeta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicology Letters*, 2003; 142: 89-101
82. Schlumpf M, Jarrya H, Wuttke W, Ma R, Lichtensteiger W: Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology*, 2004; 199: 109-120.
83. Tabira Y, Nakai M, Asai D, Yakabe Y, Tahara Y, Shinmyozu T, Noguchi M, Takatsuki M, Shimohigashi Y.: Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *European Journal of Biochemistry*, 1999; 262: 240-245.

84. Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, Ambrugger P, Gruters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wittke W, Kohrle J: Endocrine active compounds affect thyotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology*, 2004; 205: 95-102.
85. Seidlova-Wuttke D, Christoffel J, Rimoldi G, Jarry H, Wuttke W: Comparison of effect of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006; 214:1-7.
86. Boas M, Feldt-Rasmussen U, Main KM: Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012; 355: 240-248.
87. Toxicol Laboratories, Ltd. UK: Report LRL/11/91 Mexoryl SD Oral Mouse Teratology study, 1991.
88. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/opinions/sctee/sct_out110_en.htm (dostop: julij 2016)
89. Carou M E, Deguiz M L, Reynoso R, Szwarcfarb B, Carbone S, Moguilevsky J A, Scacchi P, Ponzio O J: Impact of the UV-B filter 4-(Methylbenzylidene)-camphor (4-MBC) during prenatal development in the neuroendocrine regulation of gonadal axis in male and female adult rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2009; 27: 410-414.
90. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je12.pdf> (dostop: avgust 2016)
91. <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/3-benzylidene-camphor-0> (dostop: september 2016)
92. Janjua NR, Mogensen B, Andersson AM, Petersen JH, Henriksen M, Skakkebaek NE, Wulf HC: Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octylmethoxycinnamate and 3-(4-methylbenzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *The Journal of investigative dermatology*, 2004; 123: 57-61.
93. Faass O, Schlumpf M, Reolon S, Henseler M, Maerkel K, Durrer S, Lichtensteiger W: Female sexual behaviour, estrous cycle and gene expression in sexually dimorphic

- brain regions after pre- and postnatal exposure to endocrine active UV filters. *Neurotoxicology*, 2009; 30:249-260.
94. Fent K, Zenker A, Rapp M: Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution*, 2010; 158: 1817-1824.
95. Magtegaal M, Ternes TA, Baumann W, Nagel R: UV-Filtersubstanzen in Wasser und Fischen. *Umweltchemie und Okotoxikologie*, 1997; 9: 79-86.
96. Emnet P, Gaw S, Norhcott G, Storey B, Graha L: Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base. *Environmental research*, 2015; 136: 331-342.
97. Bhat MK, McPhie P, Ting YT, Zhu XG, Cheng SY: Structure of the carboxy-terminal region of thyroid hormone nuclear receptors and its possible role in hormone-dependent intermolecular interactions. *Biochemistry*, 1995; 34: 10591-10592.
98. Schmupf M, Kypke K, Wittassek M, Angerer J, Mascher H, Mascher D, Vokt C, Birchler M, Lichtensteiger W: Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere*, 2012; 81: 1171-1183.
99. Gago-Ferrero P, Diaz-Cruz MS, Barcelo D: UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *The Science of the total environment*, 2015; 518: 518-525.