

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA MARKOVIČ

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA MARKOVIČ

**VPLIV RESVERATROLA IN NJEGOVIH ANALOGOVI NA AKTIVNOST
ESTROGENSKIH RECEPTORJEV**

**INFLUENCE OF RESVERATROL AND ITS ANALOGUES ON THE MODULATION
OF ESTROGEN RECEPTORS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Kemijskem inštitutu, Odsek za okoljske vede in inženirstvo, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Tatjane Tišler.

Zahvala

Za pomoč pri izvedbi magistrske naloge sem hvaležna vsem, ki so mi pomagali. Somentorica doc. dr. Tatjana Tišler in mentorica prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm., sta mi svetovali pri reševanju problemov in me usmerjali na pravo pot razmišljanja. Ob strani so mi stali družinski člani in prijatelji, da sem se lažje in bolj vztrajno lotevala magistrskega dela. Vesela sem tudi, da sem si v času laboratorijskih poskusov lahko delila nasvete z Urško Trogar ter tako spoznala še eno prijateljico.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Tatjane Tišler.

Ljubljana, 2017

Sara Markovič

KAZALO

KAZALO	ii
KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO ENAČB IN PREGLEDNIC	v
POVZETEK	vi
ABSTRACT	viii
SEZNAM OKRAJŠAV.....	x
1 UVOD.....	1
1.1 HORMONI.....	1
1.1.1 STEROIDNI HORMONI.....	2
1.2 ESTROGENSKI RECEPTOR	2
1.3 HORMONSKI MOTILCI	3
1.3.1 RAZDELITEV HM Z ESTROGENSKIM DELOVANJEM	4
1.4 RESVERATROL.....	5
1.4.1 FARMAKOKINETIKA RSV	7
1.4.2 TEHNOLOŠKE SPREMEMBE ZA IZBOLJŠANJE BIOLOŠKE UPORABNOSTI RSV	8
1.4.3 FARMAKODINAMIKA RSV	8
1.4.4 SINTEZA ANALOGOVI RESVERATROLA	15
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE.....	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 IZBIRA KONCENTRACIJE IN PRIPRAVA VZORCEV	18
3.1.2 MODELNI SISTEM/TESTNI ORGANIZEM	19
3.1.3 ASEPTIČNO LABORATORIJSKO DELO	19
3.1.4 LABORATORIJSKA OPREMA.....	20
3.1.5 GOJIŠČE.....	21

3.2	METODE.....	23
3.2.1	TEST CITOTOKSIČNOSTI.....	23
3.2.2	ESTROGENSKI TEST S KVASOVKAMI (TEST YES).....	24
3.2.3	IZRAČUNI.....	27
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	29
4.1	DOLOČITEV CITOTOKSIČNOSTI.....	29
4.2	DOLOČITEV ESTROGENSKE AKTIVNOSTI SPOJIN ZMP IN RSV	31
4.2.1	POVEZAVA MED STRUKTURO PREISKOVANIH SPOJIN IN EA	33
4.2.2	FARMAKOFOR E2.....	35
4.2.3	MOŽNA IZPOSTAVITEV RSV IN DERIVATOV.....	36
4.2.4	PRIMERJAVA RSV IN ZMP ANALOGOVI NA DELOVANJE NA STEROIDNE RECEPTORJE.....	37
5	SKLEP	39
6	LITERATURA	41
7	PRILOGE.....	47
7.1	GENSKA EKSPRESIJA STEROIDNIH HORMONOV	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijske strukture steroidnih hormonov.....	2
Slika 2: Strukturna formula trans- in cis-resveratrol.....	15
Slika 3: Komora z laminarnim pretokom zraka	20
Slika 4: Shema poteka testa določanja estrogenske aktivnosti s kvasovkami.....	24
Slika 5: Razpad klorfenol rdeče β -D-galaktopiranozida	25
Slika 6: Mikrotitrna plošča po inkubaciji s preiskovanimi spojinami in kontrolnimi vzorci.	30
Slika 7: Strukturna formula resveratrola	31
Slika 8: Strukturna formula dietilstilbestrola	31
Slika 9: Estrogenska aktivnost testiranih spojin in kontrol.	32
Slika 10: Estrogenska aktivnost testiranih spojin in kontrol	33
Slika 11: Osnovna struktura analogov resveratrola.....	33
Slika 12: Farmakofor 17β -estradiola.....	36
Slika 13: Splošni mehanizem regulacije genske ekspresije preko steroidnih hormonov.....	47

KAZALO ENAČB IN PREGLEDNIC

Enačba 1: Dodatek kvasovk v rastni medij	27
Enačba 2: Estrogenska aktivnost.....	27
Enačba 3: Relativna estrogenska aktivnost	28
Enačba 4: Zaviranje rasti kvasovk.....	28
Preglednica I: Preiskovane spojine	17
Preglednica II: Seznam uporabljene laboratorijske opreme.....	20

POVZETEK

Učinki hormonskih motilcev (HM) predstavljajo velik problem tako za okoljevarstveno področje kot tudi za ljudi. Pri razvoju novih učinkovin je treba preiskati možne neželene učinke, kamor spadajo tudi učinki na hormonski sistem. Resveratrol (RSV) je naravni polifenol, ki so ga našli v več kot 70 različnih rastlinskih vrstah ter mu dokazali številne pozitivne učinke na naše zdravje: deluje antioksidativno, kardioprotektivno, kemoprotektivno, vpleta se v procese staranja, ugodno deluje pri zdravljenju sladkorne bolezni itd. Že zdaj se uporablja v obliki prehranskega dopolnila, nadalje bi ga lahko v obliki zdravil koristno uporabljali preventivno za preprečevanje oziroma za zdravljenje številnih sodobnih bolezni, kot so srčno-žilna obolenja, sladkorna bolezen, debelost ter Alzheimerjeva demenca. Z RSV se lahko srečamo vsak dan, saj se nahaja v rdečem vinu, nekaterem sadju in oreščkih. Vendar bo treba zaradi njegovega hitrega in obsežnega metabolizma prvega prehoda ter posledično slabe biološke uporabnosti bodisi s tehnološkimi procesi izboljšati njegove farmakokinetične lastnosti bodisi uporabiti njegove strukturne analoge z boljšo biološko uporabnostjo in razširjenim farmakodinamičnim delovanjem. Zaradi estrogenskih strukturnih elementov RSV in njegovih potencialnih analogov je možna vezava z estrogenskim receptorjem (ER), kar lahko moti hormonsko ravnovesje, po drugi strani pa bi te snovi zaradi njihovih estrogenskih lastnosti uporabili kot zdravilne učinkovine.

Na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani sta bila za androgene in glukokortikoidne lastnosti RSV in 1,2,4-oksadiazolnih analogov že izvedena *in vitro* luciferazna testa. Z namenom pridobitve informacij, ali se RSV in njegovi analogi vežejo tudi z ER, smo izvedli test določanja estrogenske aktivnosti s kvasovkami (test YES). Kvasovke so predstavljale modelni sistem in so imele integrirano sekvenco DNK za humani estrogenski receptor (hER) ter plazmid z estrogensko odzivnimi elementi (ERE). V omenjenih predhodnih testih so določili naslednje preiskovane koncentracije na podlagi citotoksičnosti in obarjanja v testu celične viabilnosti (test MTS): 10 μM in 25 μM . Vendar smo se zaradi drugačnega testnega organizma, ki je drugače občutljiv od celičnih linij, ki so bile predhodno uporabljene, in samega postopka izvedbe testa odločili za pripravo najvišjih možnih koncentracij v dimetilsulfoksidu (DMSO). Naše preiskovane koncentracije so tako znašale: ZMP-15 243,9 μM , ZMP-17 392,9 μM , ZMP-20 495,6 μM , ZMP-21 396,9 μM , ZMP-23 207,5 μM , ZMP-24 208,7 μM , ZMP-25 181,9 μM in RSV 438,1 μM .

Spojini ZMP-15 in ZMP-20 sta očitno pokazali vpliv vezave z ER, prav tako je spojina ZMP-23 nakazala interakcijo, vendar z manjšo jakostjo. V literaturi o estrogenosti RSV najdemo nasprotujoče si rezultate. Večinoma študije kažejo, da je RSV estrogenski agonist *in vitro* pri koncentracijah 10–25 μM , *in vivo* pri podganah po odmerku 100 μg , ki doseže plazemsko koncentracijo 0,31 μM , pa ne. Kakorkoli že, spojine se med seboj razlikujejo v strukturi, spremembe v naravi funkcionalnih skupin in razporeditev pa vodijo v razlike v delovanju na molekularnem nivoju. Ugotovili smo, da so za vezavo z ER bili najbolj primerni 1,2,4-oksadiazolni analogi z dvema hidroksilnima skupinama na določeni razdalji. Na obroču A je to mesto 4 ali 5 ter na obroču B je to mesto 4'. Pri zamenjavi hidroksilnih skupin v metoksi skupine se je zmanjšal estrogenski učinek. Prav tako, so spojine z dvema hidroksilnima skupinama pokazale manjšo estrogensko aktivnost (EA) v primerjavi s tistimi z eno samo hidroksilno skupino na aromatskem obroču A.

KLJUČNE BESEDE: resveratrol, analogi resveratrola, hormonski motilci, estrogenski receptor, kvasovke

ABSTRACT

Effects of endocrine disruptors represent an enormous issue in the environmental field and also for us, human species. When searching for new active ingredients it is needed to find their possible side effects, for example disturbance of the hormone system. Resveratrol (RSV) is a natural polyphenol that was found in more than seventy different plant species and showed many positive effects on our health; it has antioxidative, cardioprotective and chemoprotective properties, it interferes with the process of aging, it has positive impact on the treatment of diabetes mellitus etc. Already now it is being used in the form of a dietary supplement and in the future it could be useful in preventive medicine or in the treatment of numerous modern diseases, such as cardiovascular problems, diabetes mellitus, obesity and Alzheimer's disease. We can come across RSV on a daily basis, because it is present in red wine, different fruits and nuts. Nevertheless, its fast and extensive metabolism and consequent poor bioavailability has forced us to improve its pharmacokinetic properties through technological processes or use its structural analogues with better availability and expanded pharmacodynamic properties. Because of estrogen structure elements of RSV and its potential analogues, it is possible for it to bind to estrogen receptor (ER), which could lead to disruption of the hormone balance. On the other hand estrogen effects could be used as an active ingredient.

At the Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana were done *in vitro* luciferase assays for androgen and glucocorticoid properties of RSV and its 1,2,4-oxadiazol analogues. With the aim to find out more information about the binding to estrogen receptor of RSV and its analogues we performed Yeast estrogen screen assay (YES assay). Genetically modified yeast cells represented a model system and had integrated DNA sequence for human estrogen receptor (hER) and plasmid with estrogen responsive elements (ERE). In the cell proliferation assay (MTS assay) were determined concentrations 10 μM and 25 μM based on cytotoxicity and precipitation. However, because of the different test organisms, which are differently sensitive, and the procedure as such, we decided to prepare as high concentrations as possible in a dimethyl sulfoxide (DMSO). So, our examined concentrations were: ZMP-15 243,9 μM , ZMP-17 392,9 μM , ZMP-20 495,6 μM , ZMP-21 396,9 μM , ZMP-23 207,5 μM , ZMP-24 208,7 μM , ZMP-25 181,9 μM and RSV 438,1 μM .

Compounds ZMP-15 and ZMP-20 have significantly shown binding effects to ER, also compound ZMP-23 indicated estrogenicity, but with lower strength. In the literature we found

opposite estrogen aspects of RSV - most studies have shown that it is estrogen agonist *in vitro* at concentrations 10-25 μM , but not *in vivo* in rats at 0,31 μM plasma concentration, which has been achieved after rats were given 100 μg dosage of RSV. Nonetheless, compounds vary in structure, modifications in the nature of functional groups and their organisation lead to functional differences on molecular level. The change of hydroxyl group to methoxyl group decreased the estrogen effect. We found out that 1,2,4-oxadiazole analogues with two hydroxyl groups on certain distance are the most appropriate for binding with ER. On aromatic ring A is the best position of hydroxyl group 4 or 5 and on aromatic ring B is position 4'. Also, compounds with two hydroxyl groups have shown lower estrogenic activity (EA) compared to those with only one hydroxyl group on aromatic ring A.

KEYWORDS: resveratrol, resveratrol analogues, hormone disruptors, estrogen receptor, yeast

SEZNAM OKRAJŠAV

ADI	dovoljen dnevni vnos
AR	androgeni receptor
COX	ciklooksigenaza
CPRG	klorfenol rdeče β -D-galaktopiranozid
DES	dietilstilbestrol
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E2	17β -estradiol
EA	estrogenska aktivnost
ER	estrogenski receptor
ERE	estrogensko odzivni elementi
GR	glukokortikoidni receptor
hER	humani estrogenski receptor
HM	hormonski motilci
IGF-1	inzulinu podoben rastni dejavnik 1
LAF komora	komora z laminarnim pretokom zraka
LDL	nizkogostotni lipoproteini
MAPK	z mitogeni aktivirana protein kinaza
MTS	test celične viabilnosti (MTS barvilo: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol)
NOS	sintaza dušikovega oksida
OD	optična gostota
PI3K/Akt	fosfoinozimid-3-kinaza/protein kinaza B
PR	progesteronski receptor
REA	relativna estrogenska aktivnost
RNK	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RSV	resveratrol
YES	test določanja estrogenske aktivnosti s kvasovkami

1 UVOD

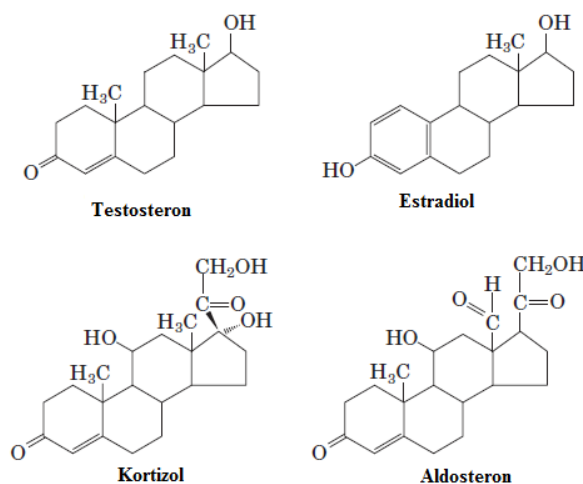
Resveratrol (RSV) je naravni polifenol, ki ga že dolgo uporabljajo v tradicionalni kitajski in japonski medicini. Danes se na tržišču pojavlja kot prehransko dopolnilo z antioksidativnim delovanjem. Njegove ugodne farmakološke lastnosti v prihodnosti lahko izkoristimo pri tipičnih boleznih sodobnega sveta, kot so srčno-žilna ter rakava obolenja, sladkorna in nevrodegenerativne bolezni. Za varno uporabo je treba preiskati njegove toksikološke učinke, kamor spada tudi delovanje na hormonski sistem. Hormonskim motilcem (HM) se posveča več pozornosti šele zadnji dve desetletji in vse več študij potrjuje, da tudi RSV interagira z endokrinim sistemom. RSV je v študijah pokazal izjemno nizko biološko uporabnost, kar je ena od njegovih slabih lastnosti za doseganje ustreznega terapevtskega učinka. Zato so razvili analoge, ki bi ohranili aktivnost in povečali razpolovno dobo. V nalogi, ki je predstavljena v nadaljevanju, smo želeli ugotoviti, ali analogi RSV, pripravljene z namenom izboljšanja farmakokinetičnih lastnosti RSV in katerim so že določili androgene in glukokortikoidne učinke, izkazuje interakcije z estrogenskimi receptorji (ER) tako kot RSV.

1.1 HORMONI

Skoraj vsak proces v organizmu je reguliran preko enega ali več hormonov: vzdrževanje krvnega tlaka, volumen krvi, elektrolitsko ravnotežje, embriogeneza, spolna diferenciacija, razvoj, razmnoževanje, lakota, prehranjevalne navade, prebava itd. Centralni živčni sistem prejema informacije od notranjih in zunanjih senzorjev. Njegov koordinacijski center je hipotalamus. Hormoni so kemijski posredniki, ki uravnavajo aktivnost celic ali tkiv. Delujejo preko specifičnih receptorjev v hormonsko občutljivih tarčnih celicah, s katerimi se vežejo z visoko afiniteto. Razdeljeni so glede na pot, kako pridejo od mesta nastanka do tarčnega tkiva. Endokrini hormoni se sprostijo v kri in so preneseni do tarčnih celic po telesu (npr. inzulin, glukagon, glukokortikoidi). Parakrini hormoni se sprostijo v ekstracelularni prostor in difuzno prehajajo do sosednjih tarčnih celic (npr. melatonin). Avtokrini hormoni delujejo na iste celice, ki jih sprostijo (npr. eikozanoidni hormoni). Hormone lahko delimo tudi glede na njihovo delovanje. Vodotopni peptidni hormoni (npr. inzulin) ponavadi delujejo preko receptorjev plazemske membrane in sprožijo hitre psihološke ali biokemijske odgovore. Nasprotno nevodotopni hormoni (npr. tiroidni in spolni hormoni) izkazujejo maksimalen odziv v tarčnih tkivih šele po nekaj urah ali dnevih. Vežejo se namreč na jedrne receptorje in kot transkripcijski faktorji spremenijo gensko ekspresijo in posledično sintezo bolj ali manj reguliranih proteinov (1).

1.1.1 STEROIDNI HORMONI

Steroidi so oksidirani derivati sterolov, imajo steroidni skelet, vendar jim manjka alkilna veriga, pripeta na D obroč, kot je to značilno za holesterol. So preveč hidrofobni, da bi se raztopili v krvi, zato se prenašajo s specifičnimi prenašalnimi proteini od mesta sprostitve do tarčnih organov. Skozi plazemsko membrano preidejo z enostavno difuzijo in se vežejo na specifične receptorske proteine v jedru. Za celotni učinek traja več kot en dan – zamik je potreben za spremembe v RNK sintezi in posledično v sintezi proteinov. Obstajajo pa tudi izjeme: nekateri učinki steroidov se pojavijo hitro, npr. estrogensko uravnana dilatacija krvnih žil, ki gre preko membranskih receptorjev s stimulacijo endotelne sintaze dušikovega oksida (eNOS). Glavne skupine steroidnih hormonov so moški in ženski spolni hormoni ter hormoni nadledvične skorje (slika 1). Testosteron je moški spolni hormon, ki nastaja v testisih in iz katerega nastane hormon 5α -dihidrotestosteron. 17β -estradiol (E2) je glavni ženski spolni hormon, ki nastaja v ovarijih in v placenti. V skorji nadledvične žleze se sintetizirajo mineralokortikoidi (aldosteron), ki kontrolirajo reabsorbcijo elektrolitov v ledvicah, in glukokortikoidi (kortizol), ki regulirajo glukoneogenezo ter zmanjšajo vnetne procese (1–3).



Slika 1: Kemijske strukture steroidnih hormonov (prirejeno po 1)

1.2 ESTROGENSKI RECEPTOR

Estrogeni so steroidni hormoni, ki uravnavajo rast, diferenciacijo in funkcijo moških ter ženskih reproduktivnih organov, mlečnih žlez, skeletnega in srčno-žilnega sistema. Najmočnejši in najbolj dominanten estrogen je E2, poleg njega sta v telesu prisotna tudi estron in estriol (4). Učinke endogeni estrogeni izkazujejo preko dveh intracelularnih jedrnih receptorjev: $ER\alpha$ in $ER\beta$, od katerih je vsak kodiran s posebnimi geni. Določene funkcionalne skupine kažejo visoko stopnjo homologije, zato $ER\alpha$ in $ER\beta$ interagirata z identičnimi DNK-

odzivnimi elementi in kažeta podobno vezavno afiniteto do estrogenov. ER α je prevladujoča izooblika, izražena v dojkah, maternici, materničnem vratu, vagini in v nekaterih drugih organih. ER β je predvsem izražen v ovarijih, prostati, testisih, vranici, pljučih, hipotalamusu in priželjcu (5).

Mehanizmi estrogenskega signaliziranja so naslednji:

1. Klasični mehanizem (priloga, slika 13): V odsotnosti hormona je receptor vezan v multiproteinski inhibitorni kompleks v citoplazmi tarčnih celic. Vezava liganda povzroči konformacijsko spremembo v ER, translokacijo v jedro in promocijo homoligi heterodimerizacije ter visoko vezavno afiniteto do specifičnih regulatornih sekvenc v DNK, ki se imenujejo estrogensko odzivni elementi (ERE). Ti receptorji delujejo na transkripcijo DNK preko koaktivatorjev in korepresorjev (4, 5).
2. Od ligandov neodvisni mehanizem: Funkcija ER je lahko uravnana preko ekstracelularnih signalov v odsotnosti E2. Primer sta polipeptidna rastna faktorja: epidermalni rastni faktor in inzulinu podoben rastni dejavnik 1 (IGF-1), ki aktivirata ER in povečata ekspresijo tarčnih proteinov ER (5).
3. Od ERE neodvisni genomski učinki: Agonist, vezan na ER, lahko vpliva na gensko regulacijo v odsotnosti direktne vezave receptorskega kompleksa na DNK. To se zgodi z modulacijo funkcije drugih transkripcijskih faktorjev preko interakcij protein-protein v jedru. Interakcija ER z aktivacijskim proteinom 1 je tipičen primer (5).
4. Signalizacija preko receptorjev na celični membrani: Nekateri učinki estrogenov so tako hitri, da ne morejo biti odvisni od aktivacije RNK in proteinske sinteze. To so učinki E2 preko oblik ER na celični površini, ki aktivirajo z mitogeni aktivirano protein-kinazno (MAPK) in fosfoinozimid-3-kinazno (PI3K/Akt) signalno pot v kostnih, endotelijskih in nevroblastnih celicah. V delovanje so vpleteni intracelularni transdukcijski proteini. Lahko pride do spremenjene funkcije proteinov v citoplazmi in regulacije genske ekspresije (4, 5).

1.3 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilci (HM) so eksogene substance ali mešanice, ki motijo normalno funkcijo endokrinega sistema in posledično povzročajo neželene učinke na naše zdravje. Vplivajo na ženski reproduktivni sistem (povečano tveganje za pojav raka dojk, genitalni rak in endometriozo), moški reproduktivni sistem (pojav oligospermije, povečano tveganje za pojav raka mod in prostate ter prirojene genitalne napake; kriptorhizem in hipospadija), plodnost,

tiroidni in živčni sistem (6). Mehanizmov delovanja HM je več: posnemajo učinke endogenih hormonov (t. i. mimetiki), so antagonisti endogenih hormonov, motijo njihovo sintezo ali metabolizem ter motijo funkcijo hormonskih receptorjev (6). Skrb zaradi izpostavljenosti HM so izrazile številne mednarodne ustanove: Evropska komisija, Evropski parlament, Ameriška okoljevarstvena agencija, Organizacija za ekonomsko sodelovanje in razvoj, organizacija WHO za program o kemijski varnosti, nevladne organizacije in kemična industrija (6). HM v telo največ vnašamo s hrano, ki vsebuje naravne bioflavonoide. V primerjavi z njimi igrajo ksenoestrogeni iz industrijskih kemičnih ostankov v hrani minimalno vlogo (7).

1.3.1 RAZDELITEV HM Z ESTROGENSKIM DELOVANJEM

V nadaljevanju smo se osredotočili na HM, ki imajo potrjen vpliv na ER in se uporabljajo v velikih količinah ali pa se nahajajo kot polutanti v okolju.

1.3.1.1 Sintetične industrijske kemikalije z estrogenskim učinkom

Industrijskih kemikalij z estrogenskim učinkom je ogromno, zato ni presenetljivo, da motijo hormonsko delovanje na različne načine. Vpliv na moški reproduktivni sistem je pokazal klordekon ali kepon (pesticid), ki strukturno sicer ni podoben E2, ampak vseeno vpliva na oligospermijo, izgubo libida, impotenco (8). Prav tako so kemikalije, npr. benzilbutilftalat, dibutilftalat (mehčala), butilhidroksianizol (antioksidant), p-fenilfenol (dodatek v gumah), o-fenilfenol (razkužilo), p-nonilfenol (detergenti in sestavni del plastike), najdene v odtokih rek v Veliki Britaniji, imele vpliv na moški reproduktivni sistem, in sicer so povzročile feminizacijo samcev rib (6–8). Posledice izpostavljenosti estrogenom na ženska rodila so dokazali dieldrinu (insekticid), ki prispeva k nastanku raka dojke. Vendar za poliklorirane bifenile (PCB) (uporaba v industriji), dikloro-difenil-trikloroetan (pesticid) in heksaklorobenzen (fungicid) v plazmi tega niso mogli dokazati, možne izpostavitvene koncentracije so namreč prenizke (6). Neplodnost so odkrili pri samčkih podgan, ki so bili prenatalno izpostavljeni metoksikloru (pesticid), ker vpliva na gensko ekspresijo (metilacijske spremembe DNK) (6, 8). Predvidevali so, da izpostavljenost HM lahko vpliva tudi na spol rojenih otrok. Po nesreči v italijanskem mestu Seveso, kjer je prišlo do izpostavitve tetraklordibenzodioksina (dioksin oz. TCDD, herbicid), so poročali o večjem številu rojenih deklic. To razmerje je kasneje upadlo (6). Pri TCDD-ju so opazili tudi učinke na tiroidni sistem pri glodalcih, prav tako pri PCB in kloriranih pesticidih. PCB ne povzročajo le hipotiroidizma, ampak tudi nevrokemijske in nevroendokrine učinke na živalih. Pri otrocih, rojenim materam, ki so uživale visoke nivoje PCB in poliklorirane dibenzofurane, prisotne v

ribjem in riževem olju, so izmerili nižji IQ, kognitivno disfunkcijo, zamaknjen mentalni razvoj, slabši vizualni spomin in težave z obnašanjem (6).

1.3.1.2 Naravni estrogeni

Fitoestrogeni so spojine, sintetizirane v rastlinah. Pokazale so estrogenske učinke pri živalih, ki so se prehranjevale s temi rastlinami (8). Glavne tri skupine fitoestrogenov predstavljajo: izoflavoni (genistein v soji in stročnicah), lignani (v hrani, bogati z vlakninami, kot so semena, žita, sadje, jagode, oreščki) in kumestani (kumestrol v detelji, lucerni in špinači) (9, 10). Dokazali pa so, da koncentracije bioflavonoidov v hrani ne povzročajo tveganja za pojav raka dojke (7). Različni mikotoksini, npr. zearalenon, so prav tako naravni estrogeni (7). Zearalenon, ki je produkt glive, je pokazal spremembe v mlečnih žlezah in genitalnem traktu pri prašičih, ki so jedli koruzo, okuženo s to glivo (6).

1.3.1.3 Zdravilne učinkovine z estrogenskim delovanjem

Estrogensko delujoče spojine se uporabljajo v hormonski nadomestni terapiji, kontracepciji, pri zdravljenju raka dojke ter preprečevanju osteoporoze. V nadomestni estrogenski terapiji v menopavzi se uporablja estrogen sam ali v kombinaciji s progesteronom. Poleg tega preprečuje tveganje za srčno kap, osteoporozo in rak kolona. Neželeni učinki so povečanje tveganja za nastanek raka dojke, endometrija in ovarijev (11). Kombinirani oralni kontraceptivi prav tako vsebujejo estrogen in progesteron. Neželeni stranski učinki so povečano tveganje za tromboembolizem in arterijsko trombozo ter nekatere oblike raka. Ugodno delovanje je dokazano pri ženskah, ki imajo probleme z močnimi krvavitvami, dismenorejo, hirsutizmom in aknami. Zmanjšajo tveganje za nastanek raka ovarijev, endometrija in kolorektalnega raka (12). Sintetizirani antiestrogeni, imenovani selektivni estrogenski modulatorji, se uporabljajo v adjuvantni terapiji pri zgodnjih in napredovalih oblikah na ER pozitivnih rakih dojke (tamoksifen) ter pri preprečevanju osteoporoze (raloksifen). Tudi tukaj se pojavljajo neželeni učinki, kot so tromboembolični zapleti, katarakta, vročinski oblivi in nihanje v razpoloženju (13). Včasih se je za preprečevanje spontanega splava uporabljala učinkovina dietilstilbestrol (DES), vendar so kasneje potrdili karcinogeno delovanje in funkcijske spremembe na reproduktivnem (genitalni rak pri potomkah že v najstniškem obdobju), endokrinem in imunskem sistemu (6, 8).

1.4 RESVERATROL

RSV (3,4',5-trihidroksistilben) je polifenol, podoben je sintetičnemu estrogenu DES, saj imata oba stilbensko strukturo. Sestavljen je iz dveh aromatskih obročev, ki sta povezana med sabo

z etilenskim mostom. Aromatski obroč je substituiran s tremi hidroksilnimi skupinami, pripetimi na mestih 3 in 5 na prvem (obroč A) ter na mestu 4' na drugem obroču (obroč B). Obstaja v *trans* in *cis* izomerni obliki (14, 15). Najprej so ga izolirali iz rastline *Veratrum grandiflorum* O. Loes leta 1940, kasneje, leta 1963, še iz posušenih korenin japonskega dresnika (*Polygonum cuspidatum*) (16). V tradicionalni kitajski in japonski medicini ga uporabljajo že mnogo let, in sicer za zdravljenje vnetja (piogeni dermatitis, favus), hipertenzije, hiperlipidemije ter glivičnih obolenj (atletsko stopalo) (17). V grozdju so ga odkrili leta 1976 in leta 1992 potrdili njegovo prisotnost v vinu (18).

Prisotnost RSV so zaznali v več kot 70 različnih rastlinskih vrstah (17). Nahaja se v lupini in semenih grozdja in rdečem vinu, tudi v arašidih, brusnicah, pistacijah, borovnicah, kakavu. V različnih sortah rdečega vina ga je 0,1–14,3 mg/L, medtem ko ga je v belem vinu manj (0,1–2,1 mg/L) zaradi drugačnega postopka pridobivanja (15). Sinteza te spojine poteka v lupini grozdja iz kumarilnega derivata in malonil-CoA v reakciji, ki jo katalizira stilben sintaza. Njen namen je varovanje pred glivičnimi infekcijami in poškodbami sonca (je fitoaleksin) (14).

V hrani je v *cis* in *trans* obliki in je večinoma glikoziliran. Take spojine imenujemo piceidi oz. 3-O- β -D-glukozidi (14). Prevladuje *trans* oblika, ki ima tudi večjo jakost (17). Glikozidacija varuje pred encimsko oksidacijo, s čimer poveča stabilnost in biološko uporabnost. Najverjetneje RSV iz piceidne oblike prehaja v intestinalnem traktu z beta-glikozidazo in/ali laktazo/floridizin hidrolazo v lumnu ali enterocitih intestinalnega trakta (19). V vinu se nahajajo tudi drugi polifenoli, kot so galna kislina in metaboliti RSV (20). V Franciji so našli povezavo, da bi lahko zmerno uživanje rdečega vina, kljub prehrani z visoko vsebnostjo maščob, pripomoglo k znižanju srčnega infarkta za 40 % v primerjavi z ostalimi evropskimi državami. Ta nenavadni pojav so poimenovali francoski paradoks (21). Prav tako so študije o biološki uporabnosti na podganah pripeljale do spoznanja, da povprečno uživanje rdečega vina v daljšem času korelira s pozitivnimi učinki na zdravje (22). Danes lahko RSV kupimo v obliki prehranskega dopolnila. Njegovi ugodni učinki so: srčno-žilno protektivni, antiagregacijski, antioksidativni, protivnetni, antikarcenogeni, antidiabetični in nevrodegenerativno protektivni (Alzheimer, debelost). Izboljša tudi stanje osteoporoze in menopavze brez povečanega tveganja za raka dojk, igra vlogo pri staranju, deluje antimikotično in protivirusno. Lastnosti so preučevali na živalskih in človeških modelih, *in vitro* in *in vivo* (15, 18, 20, 23).

1.4.1 FARMAKOKINETIKA RSV

1.4.1.1 Absorbcija in distribucija

RSV ima nizko topnost v vodi (< 0,05 mg/mL), a se kljub temu peroralno apliciran dobro absorbira – vsaj 70%. Večinoma se absorbira z difuzijo preko epitelija, nato se v plazmi veže na lipoproteine in albumin (15, 24). *In vivo* študija je pokazala porazdelitev RSV in njegovih metabolitov v plazmi, urinu, žolču, dvanajstniku, ledvicah, jetrih, srcu, možganih in pljučih. Nespremenjen RSV je najbolj pogost v srčnem tkivu, in sicer pol ure po aplikaciji. Sulfatiran metabolit se pojavlja v urinu, jetrih, možganih, glukuronidni metabolit pa v plazmi in ledvicah. Možno je, da se RSV nalaga v maščevju, saj je lipofilne narave in se od tam počasi sprošča. Visoko akumulacijo so še posebej opazili v intestinalnih epitelih celicah (15, 24).

1.4.1.2 Metabolizem

RSV se hitro in obsežno metabolizira, učinek prvega prehoda omejuje njegovo biološko uporabnost. Konjugacijska reakcija je glavna metabolična transformacija. Sulfati RSV so dominantni konjugati v plazmi in urinu. Nastajajo v črevesju in v jetrih, prav tako kot konjugati z glukuronsko kislino (21). Skupno sulfatni konjugati predstavljajo 37 % metabolitov v urinu in glukuronidni konjugati 19 % (16). Konjugacija ene hidroksilne skupine vodi v nastajanje treh monokonjugatov; RSV-3-O-glukoronid, RSV-3-O-sulfat in RSV-4'-O-glukoronid (17). Sulfotransferaza 1A1 je odgovorna za pretvorbo RSV v 3-O-sulfate (20). Ostali večkrat konjugirani metaboliti so RSV-disulfat, RSV-trisulfat, RSV-diglukuronid, RSV-sulfat glukuronid. Konjugati so v vsaj 100-krat višjih koncentracijah v plazmi kot RSV (17). Poleg konjugatov sta metabolita tudi dihidro-RSV in piceatanol (monohidroksilirana oblika RSV), ki najverjetneje nastaneta z mikrobnimi fermentacijami v gastrointestinalnem traktu (17, 25). RSV se pretvori v piceatanol s pomočjo encima CYP1B1 (25).

1.4.1.3 Eliminacija

Tkivne koncentracije so relativno nizke in skoraj popolna eliminacija iz tkiv je dosežena 72 h po aplikaciji enega odmerka. Nespremenjenega se eliminira 20–30 %, eliminacija je skoraj enako razporejena med urinom in fecesom (17, 24). Medtem ko eliminacija sulfatiranih in glukuronidnih konjugatov predstavlja 22–44 % od celotnega odmerka (26).

1.4.1.4 Farmakokinetični model

Po enkratnem *per os* odmerku 25 mg RSV je dosežena maksimalna plazemska koncentracija nemetaboliziranega RSV 1–5 ng/mL, in sicer v času 30–90 min. Pojav drugega vrha po 6 h kaže na enterohepatični cikel. Sicer je razpolovni čas za primarno spojino kratek; 8–14 min,

vendar je za metabolite mnogo daljši, tj. 9,2 h, kar pomeni, da je izpostavitvev metabolitom veliko višja od nespremenjenega RSV. Tako sta C_{max} in AUC glukuronidov ter sulfatnih konjugatov višja od RSV; C_{max} za 3–8-krat ter AUC za 23-krat (16, 21). To delno pojasnjuje, zakaj je lahko dolgotrajna *per os* aplikacija RSV zadostna za doseg pozitivnih učinkov na zdravje kljub nizki biološki uporabnosti RSV. Metaboliti so namreč lahko potencialno aktivni. Nekateri avtorji poročajo, da glukuronidi sicer niso aktivni *in vitro*, vendar *in vivo* so, saj lahko humana β -glukuronidaza pretvori take metabolite nazaj v RSV (21). Drug razlog je akumulacija RSV v epitelih celicah vzdolž prebavnega trakta (18).

Biološka uporabnost RSV je pri vinu in grozdnem soku večja v primerjavi s prehranskimi dopolnili (15). Ker na biološko uporabnost RSV ne vpliva prehrana ali vsebnost maščob v hrani, se lahko v obliki prehranskega dopolnila aplicira ne glede na čas obroka (21). Vendar pa je potrebna previdnost pri sočasni uporabi z drugimi zdravili, ker RSV deluje na različne izoforme CYP (npr. CYP2C9) in uridin glukuroniltransferaze (19, 24).

1.4.2 TEHNOLOŠKE SPREMEMBE ZA IZBOLJŠANJE BIOLOŠKE UPORABNOSTI RSV

S tehnološkimi metodami so poskušali spremeniti biološko uporabnost RSV. Pri topnostnih študijah, kjer so uporabili formulacijo RSV z hidroksipropil- β -ciklodekstrinom oz. z naključno metiliranim- β -ciklodekstrinom, kljub izboljšanju vodotopnosti niso dosegli želenega učinka (20). Vendar so v nekaterih drugih študijah uspeli izboljšati biološko uporabnost. Prvi tak uspešen primer je uporaba mikronizirane formulacije RSV, saj so z zmanjšanjem velikosti delcev povečali absorbcijo in s tem 2–3,5-krat zvišali plazemsko koncentracijo. Druga pozitivna sprememba biološke uporabnosti RSV je bila uporaba nanodelcev. Z lipidno jedrno nanokapsulizacijo so izboljšali porazdelitev RSV in zmanjšali gastrointestinalne težave. Tehnologija uporabe nanodelcev se je izkazala kot ugodna rešitev tudi v drugih poskusih na podganah. Ti poskusi so bili: intraperitonealna aplikacija RSV v obliki nanodelcev, *per os* aplikacija v obliki nanodelcev z osnovo zeina in RSV v obliki nanodelcev Eudragit RL. Tretja sprememba, ki je tudi pokazala pozitivne rezultate, je aplikacija v obliki pastil. Kljub vseemu je potrebna previdnost, saj povečana biološka uporabnost lahko spremeni toksikološki profil (24).

1.4.3 FARMAKODINAMIKA RSV

Prehranske bioaktivne spojine imajo mnogo celičnih tarč in s tem mnogo bioloških učinkov. Molekularne tarče RSV so ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze, proteini Sir2,

transkripcijski faktorji, citokini, polimeraza DNK, adenil ciklaza, ribonukleotid reduktaza, aromataza in druge (15).

Kardiovaskularno delovanje: V nizkih koncentracijah (5–10 μM) deluje kot antioksidant. Deluje preko dveh mehanizmov: poveča aktivnost antioksidativnih encimov (glutation peroksidaza, glutathion-S-transferaza, glutathion reduktaza, Mn-superoksidna dismutaza) in odstranjuje radikale (hidroksilne, superoksidne itd.) ter tako zmanjša koncentracijo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (15). Dokazali so, da inhibira oksidacijo nizkogostotnih lipoproteinov (LDL) in odlaganje holesterola, s tem preprečuje aterosklerozo (20). Prav tako inhibira metabolizem arahidonske kisline v levkocitih in s tem prepreči agregacijo trombocitov (20). *In vivo* so pokazali, da poveča ekspresijo eNOS in inducibilne NOS (iNOS) ter poveča cGMP v intaktnem vaskularnem tkivu, kar povzroči vazodilatacijo. Poleg tega izboljša krvni pretok ishemičnih tkiv z indukcijo neovaskularizacije (27). V nekaterih sistemih deluje kot fitoestrogen, kar lahko vpliva na zaščitne učinke na srcu pri postmenopavzalnih ženskah. Sicer že v zelo nizkih odmerkih protektivno ščiti tudi pred poškodbo možganov, ki sledi cerebralni ishemiji (16).

Antitumorno delovanje: V nižjih koncentracijah (5-10 μM) deluje antiapoptotično in antioksidativno – zmanjša citotoksične učinke ROS na DNK in ostale makromolekule. V višjih odmerkih ima proapoptotične lastnosti. Sodeluje v vseh stopnjah onkogeneze: začetek, aktivacija in progresija (15). Zaustavi proliferacijo različnih tumorskih celic: mieloičnih, dojk, pljuč, jeter, pankreasa, prostate, kože, kolona, želodca (15). RSV kaže visoko selektivnost proti malignim celičnim linijam v primerjavi z normalnimi (18).

Začetek onkogeneze preprečuje na različne načine. Zaradi lipofilne narave inhibira encime faze 1 (CYP družina) in COX encime ter inducira encime faze 2 (UDP-glukuroniltransferaza, NAD(P)H kinon-oksido-reduktaza, hem oksigenaza-1 in kinon reduktaza-1) (15). Preprečuje neželene učinke različnih okoljskih toksinov (18). Inhibira encim ribonukleotidna reduktaza, ki je ključni encim pri *de-novo* sintezi DNK in ima večjo aktivnost v tumorskih celicah (20). V višjih koncentracijah RSV deluje kot prooksidant (10–40 μM), promovira fazo celičnega počitka in apoptozo. Fazo celičnega počitka promovira preko aktivacije p21 in zmanjšanja ekspresije faktorjev celične rasti (18). Apoptozo pa inducira preko različnih poti: receptorsko uravnana odvisna pot (kaspaza-8), mitohondrijska odvisna pot (kaspaza-9) in pot, delujoča na SIRT1 (tihi regulacijski informatorji). Poleg tega inhibira ekspresijo antiapoptotičnih proteinov (bcl-2, bcl-xL, ciklin D1 in TNFR-2) in inducira ekspresijo proapoptotičnih

proteinov (bax, p53 in p21waf) ter aktivira produkcijo ROS. Vpleta se v prenos signala preko: PI3K, MAPK in NF- κ B (14, 15, 18, 25).

Inhibitorno deluje tudi na invazijo in metastaziranje z zmanjšanjem ekspresije metalopeptidaze-9 in zmanjšanjem nivojev IGF-1, kar zmanjša tumorsko inducirano neovaskularizacijo in upočasni razvoj tumorja (15).

Kalorijska restrikcija in podaljšanje življenjske dobe: RSV (150 mg/dan) ima iste učinke kot kalorijska omejitev pri debelih; to so: izboljšana metabolična funkcija, zmanjšana poraba energije, izboljšana občutljivost na inzulin, zmanjšani vnetni markerji (24). Poveča signalizacijo glukagona in kateholamina ter zmanjša signalizacijo insulina/IGF-1. Direktno inhibira fosfodiesterazo in s tem poveča nivo cAMP (mediator pri regulaciji metabolizma) in aktivira sirtuin SIRT1 (15). Pri visokih odmerkih RSV v živalskih modelih (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* in *Drosophila melanogaster*) stimulira SIRT1 (16, 28). Sirtuini so del družine NAD⁺, vpleteni v gensko utišanje, povezano s staranjem, blokado apoptoze in promocijo celičnega preživetja (29). SIRT1 poveča oksidacijo maščobnih kislin, glukoneogenezo in mitohondrijsko respiracijo ter zmanjša sintezo trigliceridov, glikolizo, ROS produkcijo, vnetje in genomsko nestabilnost (15). Poveča se stabilnost DNK in omilijo neželeni učinki prehrane z visoko vsebnostjo maščob, kar lahko prepreči prezgodnjo smrt (28).

Sladkorna bolezen: Pri diabetikih tipa 2 se po jemanju 2-krat 5 mg zmanjša inzulinska rezistenca, vendar ni spremembe funkcije β -celic. Pri pacientih z diabetesom ali hiperholesterolemijo po aplikaciji ekstrakta grozdja (vsebnost 8 mg) 6 mesecev RSV občutno zmanjša apolipoprotein-B in nivo oksidiranih LDL (24). V živalskih modelih (podgane z induciranim diabetesom tipa 1 po prejetju streptozocina) RSV zmanjša plazemsko koncentracijo glukoze, insulina in lipidov, prav tako izboljša diabetične simptome (zmanjšana telesna masa, polifagija, polidipsija), občutljivost na inzulin in odloži začetek inzulinske rezistence. Stimulira prevzem glukoze v mišicah in jetrih ter poveča membransko aktivnost GLUT4 in fosforilacijo inzulinskega receptorja (30). Možno je, da zmanjša oksidativni stres v diabetičnih tkivih in tako izboljša funkcionalno stanje metabolizma celic (31).

Učinek na nevrodegenerativne bolezni: RSV deluje nevroprotektivno in izboljša kognitivne sposobnosti, kot sta delovni spomin in motorično gibanje (24, 32). Pri Alzheimerjevi demenci inhibira polimerizacijo β -amiloidnih peptidov, kar stimulira njihovo proteasomsko degradacijo. Preko aktivacije SIRT1 zmanjša signalizacijo NF- κ B in s tem vnetne procese v

glia in imunskih celicah. NF- κ B vpliva tudi na druga nevrodegenerativna obolenja. Inhibicija NF- κ B pri Parkinsonovi bolezni poveča dovzetnost dopaminergičnih nevronov za 6-hidroksidopamin. RSV zmanjša sproščanje arahidonske kisline, preveliko sproščanje v možganih namreč uničuje celice pri ishemiji, Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni. Delovanje RSV pri Huntingtonu in amiotrofični lateralni sklerozi je predvsem posledica aktivacije SIRT1 in ne antioksidativnega delovanja (15, 24).

Ostali učinki: RSV deluje antiastmatično; inhibira povišanje citokinov v plazmi ter učinkovito zmanjša pretiran odziv dihal, eozinofilijo in sekrecijo mukusa (33, 34). Lahko bi ga uporabili tudi pri zdravljenju osteoporoze, saj vpliva na ravnotežje kostne remodelacije, stimulira namreč osteogenezo ter osteogeno diferenciacijo (35). Zanimivo je, da v visokih odmerkih deluje antidepresivno; poveča količino biogenih aminov (noradrenalin, dopamin, serotonin) v hipokampusu in korteksu pri miših (36). V nekaterih primerih poveča imunski odziv in varuje pred infekcijami (*herpes simplex virus*) (16).

1.4.3.1 Estrogensko delovanje

RSV je strukturno podoben DES, zato so kasneje ugotovili, da je fitoestrogen v pogojih *in vitro* in kaže različno stopnjo estrogenskega agonizma v različnih testnih organizmih. Fitoestrogeni so prisotni v različnih rastlinah, ki jih uporabljamo v prehrani. Sposobni so nadomeščati estrogene ter se lahko uporabljajo pri zdravljenju osteoporoze, srčnih obolenj, raka dojke in lažšanju menopavzalnih simptomov. Povzročajo estrogenske in antiestrogenske učinke, zato so nekateri HM z neželenim učinkom na zdravje (35, 37). Obe izoobliki ER (α in β) vežeta E2 s primerljivo afiniteto, a nekateri fitoestrogeni (npr. genistein, kumesterol) kažejo večjo afiniteto do ER β (22). RSV se veže na ER α in ER β s primerljivo afiniteto. Nekateri študije so odkrile manjšo preferenco do ene izmed izooblik, vendar si niso enotne (23, 30, 38). V nasprotju z *in vitro* študijami večina *in vivo* študij ni mogla dokazati estrogenskega učinka RSV (27). RSV lahko modulira ER na različne načine, lahko je agonist ali antagonist, odvisno od koncentracije, reporterskih genov in prisotnosti E2. Deluje kot ER agonist ali antagonist, če ni prisoten E2, v primeru, da je, deluje kot antagonist. Izredno visoke koncentracije (100 μ M) RSV v celičnem okolju kažejo antiestrogenske lastnosti (antikarcenogeni učinki), nižje koncentracije (10–25 μ M) pojačajo endogeno estrogensko delovanje (38, 39). Koncentracije RSV, ki aktivirajo negenomsko/membransko ER signalizacijo, so en koncentracijski razred nižje od tistih, ki so potrebne za ER genomsko aktivnost (40).

V *in vitro* testu je pri nizkih koncentracijah, in sicer 3–10 μM v MCF-7 (humane celice raka dojk), inhibiral vezavo označenega E2 (^{125}I -E2) na ER in aktiviral ekspresijo progesteronskega receptorja (PR) in pS2 gen (18). Pokazal je celo superagonistično delovanje, saj je povzročil večji maksimalni transkripcijski odziv kot E2. Možno je, da je superagonizem RSV posledica aktivacije dodatnih signalnih poti. Stopnja inhibicije vezave E2 je bila odvisna od koncentracije RSV in označenega liganda (37). Prav tako tekmuje s ^3H -E2 za vezavo ER v maternici podgan (22). Šibko agonistično delovanje RSV v primerjavi z DES ali E2 so dokazali v transkripcijskem testu hER α v kvasovkah in prehodnih transfekcijah z ER α v celicah COS-1 (17, 22). Prav tako se veže z nižjo afiniteto ($\text{IC}_{50}(\text{RSV}) = 58,5\text{--}130 \mu\text{M}$), kot jo ima E2 na ER α in ER β v predhodno transfeciranih celicah CHO-K1 pri različnih reporterskih konstrukcijah ERE (22).

RSV v višjih koncentracijah (100 μM) inhibira rast celic raka dojk. Večinoma gre za celice, ki so pozitivne na humani estrogenski receptor (hER) (MCF-7, T47D). Modulacija ekspresije nekaterih avtokrinih rastnih modulatorjev (TGF α) in/ali njihovih receptorjev je izrazitejša pri *trans* kot pri *cis* izomeru (39, 41). Prav tako RSV deluje citostatično v celicah raka dojk preko mehanizma, neodvisnega od ER (38). RSV z vezavo na ER ni pomemben le kot antitumorna spojina, ampak lahko tudi pripomore k zdravljenju sladkorne bolezni in žilnih obolenj. Preko ER α aktivacije poveča prevzem glukoze v mišicah po inzulinsko odvisni in neodvisni poti (30). Za žilna obolenja je pomemben, saj stimulira signalizacijo MAPK in eNOS preko hitre negenomske aktivacije ER v vaskularnih endotelijskih celicah. V nanomolarnih koncentracijah v humanih umbilikalnih venskih endotelih celicah in v aortnih endotelijskih celicah goveda so dokazali, da pride do povečanja NO in vazodilatatornih učinkov (40, 42).

In vivo študije na podganah so pokazale sledeče ugotovitve. V 6-dnevni študiji na samičkah RSV v koncentracijah 1, 4, 10, 40 in 100 $\mu\text{g}/\text{dan}$ ni imel učinka na telesno maso, mokro maso maternice, višino materničnih epitelih celic, histomorfometrijo kortikalne kosti ali serumski holesterol. Ista študija je pokazala, da RSV antagonizira učinek E2 na serumski holesterol, vendar samo v zelo visokih koncentracijah. Na podlagi *in vivo* podatkov so ugotovili, da ima malo oz. nič EA na reproduktivna in neproduktivna estrogenska tarčna tkiva (35, 43). Subkutano (18, 58 in 575 mg/kg) je bila pri samičkah v uterotrofičnem testu estrogenska aktivnost (EA) negativna (19). Nasprotno pa pokaže estrogenske lastnosti v hipertenzivnih podganah, nagnjenih h kapi; odmerek 5 mg/kg telesne mase/dan RSV poviša sistolični krvni tlak (19, 27).

1.4.3.2 Androgeno delovanje

RSV deluje na androgen odzivne (LNCaP) in neodzivne humane prostatične karcinomne celice (PC-3, DU-145, JCA-1) (41, 44). Zmanjša rast celic, povzroči apoptozo, deluje na mitogenezo in delno moti G1/S prehod (44). Apoptozo inducira na negenomski in genomski način. Negenomski način je inhibicija androgene receptorsko (AR)- in ER α - odvisne PI3K poti. Privede do inhibicije preživetja. Genomsko pa deluje preko uravnavanja transkripcije AR (41, 45, 46). Podobno kot pri estrogenskem delovanju tudi pri androgenem delovanju RSV v nižjih koncentracijah poveča aktivnost AR, medtem ko pri višjih koncentracijah (> 50 μ M/L) zavira aktivnost AR (47). Na AR učinkuje direktno (transkripcijsko uravnava prostatični specifični antigen (PSA), humani glandularni kalikrein-2, AR-specifični koaktivator ARA70) ali indirektno, spremeni razmerje koaktivator/korepresor (18, 46, 48).

1.4.3.3 Toksikološki profil

RSV ima nizko *per os* toksičnost. Dovoljen dnevni vnos (ADI) za 60 kg osebo je 450 mg/dan, kar je visoko nad vnosom s hrano. V 13-tedenski toksikološki študiji na podganah je bil na podlagi NOAEL (750 mg/kg telesne mase/dan) in standardnega varnostnega faktorja 100, določen ADI. V visokih odmerkih (2000–3000 mg/kg telesne mase/dan) sta ledvice (hidronefroza) in mehur (epitelna hiperplazija) tarčna organa. Šestmesečne študije na podganah in zajcih niso pokazale bistvenega povečanja toksičnosti v primerjavi s štiritedensko študijo. Niso dokazali niti akumulacije v plazmi skozi čas niti patoloških sprememb (17, 19).

Študije občutljivosti: Vpliv RSV na draženje kože in oči so raziskovali na zajcih in ugotovili, da je RSV neiritirajoč. Prav tako ni bilo neželenega učinka na lokalne bezgavke pri samičkah miši (17).

Genotoksične študije/karcinogenost: V mikronukleusnem testu celic kostnega mozga pri podganah pri 2000 mg/kg telesne mase/dan ni bilo neželenih učinkov. V Amesovem testu (bakterijski reverzni mutacijski test) pri 10–500 μ g/ploščo je RSV nemutagen. V *in vitro* testu, kjer so uporabili mišje celice limfoma pri odmerkih 10–60 μ M, je možno, da moti mitozo. V *in vitro* testu kromosomske aberacije v humanih limfocitih pri odmerku do 50 μ g/mL ima klastrogeno aktivnost (17, 19). Šestmesečni mišji model karcinogenosti (miši imajo izbit tumorski supresorski gen p53) ni pokazal povišanja pojavnosti benignih ali malignih tumorjev pri odmerku 1000 mg/kg telesne mase/dan (17, 19).

Subkronične študije: V 28 dnevni študiji 0–500 mg/kg telesne mase/dan pri podganah niso opazili stranskih učinkov. Prav tako niso opazili stranskih učinkov pri miših, ki so prejemale 25 mg/kg telesne mase/dan 7 tednov (17). Pri podganah, ki so prejemale 20 mg/kg telesne mase 28 dni, ni bilo sprememb v telesni masi in v hematoloških in biokemijskih parametrih, opazili so le 30 % povišanje aspartat aminotransferaze (AST), kar je še vedno v mejah normale. Povišala pa se je masa možganov in testisov, kljub temu da ni bilo histopatoloških sprememb v teh organih (49). Pri podganah, ki so prejemale gavažo 0, 300, 1000 in 3000 mg/kg telesne mase/dan štiri tedne, so opazili spremembo telesne mase, povišanje levkocitov, spremembo mase ledvic in povečano pojavnost lezij v ledvicah (23). Nadaljnje kratkotrajne študije kažejo na nizko *per os* toksičnost pri miših in psih; pri miših ni bilo sprememb na organih do odmerka 2500 mg/kg telesne mase/dan, pri psih pa je bila najvišja doza 1000 mg/kg telesne mase/dan dobro tolerirana. Funkcionalne meritve srca so bile opravljene pri psih po odmerku 1000 mg/kg telesne mase, učinka na srčno funkcijo pa niso opazili (17).

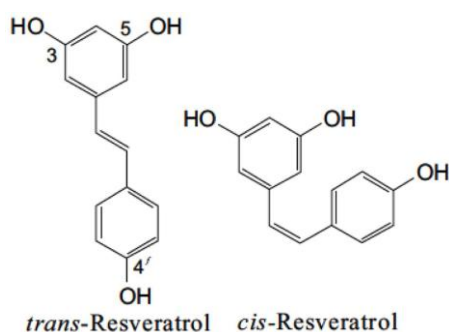
Reproduktivna toksičnost: Pri podganah, ki so prejemale gavažo 20 mg/kg 90 dni, so opazili povečanje plazemskih nivojev LH (luteinizirajoči hormon), FSH (folikle stimulirajoči hormon) in testosterona. Prav tako v 90-dnevni študiji pri podganah, ki so prejemale odmerke do 750 mg/kg/dan, ni bilo učinkov na estrogenski ciklus ali kakršnihkoli histopatoloških učinkov na reproduktivne organe. V isti študiji, in sicer pri aplikaciji pri brejih podganah, niso opazili abnormalnosti plodu ali sprememb mase plodu ter učinka na preživetje zarodka (17). Publikacije kažejo na fitoestrogenost RSV v *in vitro*, vendar *in vivo* podatki kažejo nasprotno. Pri nosečnicah ima relativno majhne učinke na njihove potomce. Zelo majhne spremembe so opazili pri rasti različnih organov ploda; kazale so se tudi kot zakasnjeno vaginalno odprtje, prehodne spremembe na reproduktivni trakt, mlečne žleze in podaljšan estrogenski cikel (16). Vendar se doječim in nosečim materam kljub temu ne predlaga uporabe RSV (35).

Varnost pri ljudeh: Prehranska dopolnila vsebujejo 50 do 500 mg *trans*-RSV (17). Izvedena je bila klinična študija pri odmerkih od 0,5 do 5 g. Višja odmerka, tj. 2,5 in 5,0 g, sta povzročila blage do zmerne gastrointestinalne simptome, kot so slabost, napihnjenost, bolečine v trebuhu in diareja. Zmanjšanja telesne teže ni bilo, resnih neželenih učinkov prav tako ne (50). Dvojno slepa študija na zdravih prostovoljcih, ki so prejemali *trans*-RSV v odmerkih 25, 50, 100 ali 150 mg, 6-krat na dan do največ 13 odmerkov, je pokazala le blage neželene učinke. Najbolj pogost neželeni učinek, najverjetneje povezan z izpostavitvijo RSV, je bil frontalni glavobol. Ostali so se pojavili le po enkrat: glavobol, mialgija nižjih

ekstremitet, somnolenca, epidermis, okcipitalna nevralgija (21). Podatki kažejo, da *trans*-RSV ljudje dobro prenašajo tudi pri ponovljivi aplikaciji (17).

1.4.4 SINTEZA ANALOGOV RESVERATROLA

Z namenom izboljšanja lastnosti RSV so sintetizirali njegove analoge. Biološka aktivnost RSV in njegovih analogov je odvisna od (slika 2): števila in pozicije hidroksilnih skupin, prisotne intramolekularne vodikove vezi, ustrezne stereoizomerije in prisotnosti dvojne vezi (25).



Slika 2: Strukturna formula *trans*- in *cis*-RSV (51)

Priprava novih analogov je namenjena predvsem izboljšanju supresije tumorske proliferacije in antioksidativnih učinkov. *Trans*-stilbenske komponente, ki imajo 4'-hidroksilno skupino, dvojno vez in položaj orto-difenoksil ali para-difenoksil, kažejo višjo kemoprotektivno aktivnost kot *trans*-RSV (22, 25, 51). 4'-hidroksilna skupina ni edina v *trans*-konformaciji, ki je odgovorna za antioksidativne lastnosti, je pa absolutno zahtevana pri antiproliferativni aktivnosti, da lahko pride do interakcije s polimerazo DNK (25). Analogi z orto-hidroksilno skupino imajo večjo citotoksičnost v primerjavi s hidroksistilbeni s para- ali meta-substitucijo. Orto-hidroksi stilbeni namreč tvorijo orto-semikinone, ki sodelujejo pri nastanku citotoksičnih kisikovih radikalov (15, 20, 25). Povečano število hidroksilnih skupin na fenolnem obroču je pokazalo boljšo citotoksično sposobnost in odstranjevanje prostih radikalov. Primer večkrat hidroksilirane analoge je piceatanol, ki je metabolit RSV in ima kemoprotektivno delovanje in je prav tako prisoten v vinu (15, 20, 25). Presenetljive *in vivo* učinke so opazili pri heksahidroksistilbenu, najučinkovitejšem sintetičnem analogu RSV. RSV je tudi neselektivni COX inhibitor. Hidroksilirani in nemetoksilirani resveratrolni derivati so pokazali močne inhibitorne COX učinke – takšna primera sta piceatanol in heksahidroksistilben. Metoksilirani resveratrolni analogi niso pokazali nobene COX inhibitorne lastnosti (20, 25, 51).

2 NAMEN DELA

V zadnjih dveh desetletjih so naravovarstveni predpisi postali strožji glede spojin, ki motijo funkcijo endokrinega sistema in jih poznamo pod imenom HM. Z naprednejšo tehnologijo in znanjem se vse bolj zavedamo njihovega pomena, saj že v zelo nizkih koncentracijah lahko povzročajo neželene učinke na naše zdravje. Ksenoestrogeni iz industrijskih odpadkov ne predstavljajo takega problema, večji problem so bioflavonoidi v hrani. Poleg tega da je naravni RSV poznan že iz tradicionalne kitajske medicine, je z odkritjem "francoskega paradoksa" postal še bolj priljubljen kot prehransko dopolnilo in vreden zanimanja. V Franciji je uživanje rdečega vina pripomoglo k znižanju pojavnosti kardiovaskularnih zapletov kljub dieti z visoko vsebnostjo maščob. Sledile so še druge raziskave, ki so pokazale široko terapevtsko območje RSV in njegove številne molekularne tarče. Nekaj študij, predvsem *in vitro*, se je dotaknilo njegovega hormonskega delovanja, saj je strukturno podoben DES. Na žalost ima RSV tudi slabe lastnosti, predvsem je to hiter in obsežen metabolizem, ki je tudi vzrok za sintezo stabilnejših analogov. Na katedri za Farmaceutsko kemijo na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani so sintetizirali 1,2,4-oksadiazolne analoge RSV (spojine ZMP). Njihove (anti)glukokortikoidne in (anti)androgene lastnosti so ugotavljali s presejalnim luciferaznim *in vitro* testom. Pri tem so kot modelni sistem uporabljali celično linijo MDA-kb2, ki vsebuje človeške epiteljske celice raka dojke s funkcionalnimi AR in glukokortikoidnimi receptorji (GR). Spojine ZMP so pokazale agonistično delovanje na AR in GR, saj so povečale aktivnost luciferaze. Izjema je bila spojina ZMP-23. Nobena spojina ni pokazala antiandrogenega ali antiglukokortikoidnega delovanja. Želeli smo ovrednotiti tudi vpliv RSV in analogov ZMP na ER, za kar smo izbrali test določanja estrogenske aktivnosti s kvasovkami (test YES, angl. Yeast Estrogen Screen), pri katerem so modelni sistem kvasovke, ki imajo vstavljen gen za hER. Pripravili smo najvišje možne količine vzorcev, ki smo jih dobili za testiranje. Predhodno smo tudi z določanjem zaviranja rasti kvasovk določili koncentracije, pri katerih spojine še ne delujejo citotoksično. V raziskavi smo si postavili naslednje hipoteze:

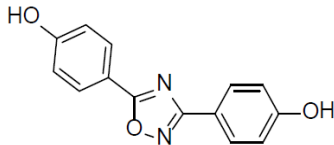
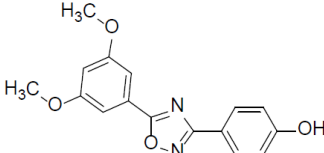
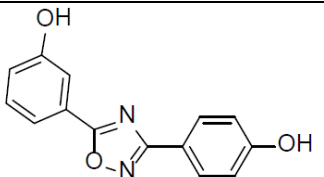
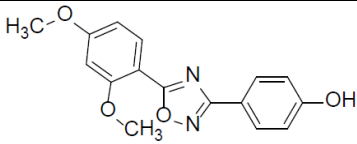
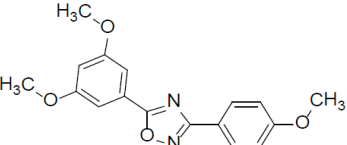
1. RSV in analogi ZMP imajo nizko citotoksičnost na kvasovkah.
2. RSV in analogi ZMP se vežejo z ER zaradi strukturne podobnosti z DES.
3. Analogi ZMP z metoksi skupino na fenilnih obročih imajo nižjo EA v primerjavi z analogi z nesubstituirano hidroksilno skupino.
4. Učinki na ER se razlikujejo med analogi ZMP zaradi strukturnih modifikacij.

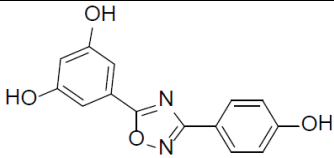
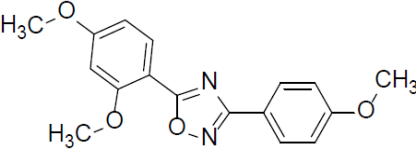
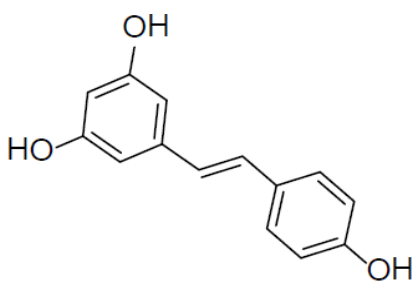
3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

RSV ima poleg številnih terapevtskih ugodnosti tudi farmakokinetične pomanjkljivosti. V upanju, da bi v prihodnosti lahko bolje izkoristili njegove pozitivne učinke, so na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani sintetizirali 1,2,4-oksadiazolne analoge (skupina spojin ZMP, preglednica 1) in poleg njihovih antioksidativnih lastnosti raziskali tudi učinke na GR ter AR (52, 53). Namesto etilenske skupine, ki povezuje aromatska obročja, vsebujejo analogi oksadiazolni obroč in s tem izkazujejo večjo rigidnost. Druge strukturne razlike so še pozicija hidroksilne skupine/hidroksilnih skupin na obeh obročih ter njihova metiliranost. Uporabljen RSV pa je bil industrijsko pridobljen (CAS številka: 501-36-0, Sigma-Aldrich, Nemčija).

Preglednica I: Preiskovane spojine

Spojina	Molska masa (g/mol)	Masa (mg)	Vsebnost (%)	Kemijska struktura
ZMP-15	254,24	1,55	95	
ZMP-17	298,29	2,93	95	
ZMP-20	254,24	3,15	95	
ZMP-21	298,29	2,96	95	
ZMP-23	312,32	1,62	95	

ZMP-24	270,24	1,41	95	
ZMP-25	312,32	1,42	95	
RSV	228,25	10,00	≥ 99	

3.1.1 IZBIRA KONCENTRACIJE IN PRIPRAVA VZORCEV

Na splošno so v raziskavah spojin uporabljene realne koncentracije, ki smo jim lahko izpostavljeni v okolju in bi lahko imele posledice na naše zdravje. Pri RSV je to koncentracijsko območje mikromolarno (50 μM). S tega vidika in na podlagi določitve citotoksičnosti (test MTS) ter obarjanja so izvedli preizkuse na GR in AR z analogi ZMP ter RSV v koncentracijah 10 μM oziroma 25 μM (52, 53). Sami smo za testiranje izbrali najvišje še možne koncentracije, saj je bila celična kultura drugače občutljiva ter mehanizem raziskave nam je omogočil večji razpon preiskovanih koncentracij. Prav tako smo upoštevali dejstvo, da imamo na voljo majhne količine preiskovanih spojin. Za topilo smo izbrali dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost $\geq 99,9\%$), ki omogoča dobro topnost spojin in lažjo primerjavo s prejšnjimi raziskavami (pri ugotavljanju androgenega in glukokortikoidnega učinka so bili vzorci prav tako raztopljeni v DMSO). Z obarjanjem v našem primeru nismo imeli težav, saj smo pred dodatkom medija vzorcem počakali, da je topilo izparelo. Spojine smo raztopili v 500 μL DMSO v epicah in s tem prišli do sledečih koncentracij: ZMP-15 12,2 mM, ZMP-17 19,6 mM, ZMP-20 24,8 mM, ZMP-21 19,8 mM, ZMP-23 10,4 mM, ZMP-24 10,4 mM, ZMP-25 9,1 mM. Izjema je bil RSV, saj za razliko od ostalih ni bil sintetiziran na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani in smo ga imeli na razpolago več. Ugotovili smo, da je 87,6 mM koncentracija citotoksična za kvasovke (zaviranje rasti $> 50\%$). Zato smo s testom YES testirali 4-krat nižjo koncentracijo RSV: 21,9 mM. Vzorce smo v času raziskave hranili v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.2 MODELNI SISTEM/TESTNI ORGANIZEM

Za izvedbo testa YES smo uporabili gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, razvite v skupini prof. dr. Sumpsterja (Brunel University, Velika Britanija) v Glaxu (Velika Britanija).

Kvasovke imajo mnogo prednosti pred ostalimi sistemi; rokovanje s celicami kvasovk je manj zahtevno in cenejše za kultivacijo kot s sesalskimi celicami. Poleg tega so kvasovke v primerjavi s sesalskimi celicami manj dovzetne za citotoksične učinke okoljskih kontaminantov, kot so težke kovine in bakterijski endotoksini (54–56). Nimajo endogenih steroidnih receptorjev in posledično tudi ne kompleksnih interakcij med ER in ostalimi receptorji. Ker so ER transfecirani v celico, ni skrbi za učinke mutiranih in variantnih receptorjev kot pri MCF-7 celicah. In nazadnje, celice kvasovk rastejo v mediju brez steroidnih hormonov in zato zagotavljajo nizke nivoje ozadja. Kljub številnim ugodnostim imajo kvasovke tudi slabosti: prisotnost celične stene kvasovk in mehanizmi aktivnega transporta, ki se razlikujejo pri sesalskih celicah, lahko vplivajo na aktivnost testiranih spojin (54).

3.1.3 ASEPTIČNO LABORATORIJSKO DELO

Mikroorganizmi so povsod – v zraku, zemlji, človeškem telesu in na neživih površinah, kot sta laboratorijski pult in računalniška tipkovnica. Razširjenost mikrobov ustvarja vir potencialnih kontaminantov v laboratoriju, zato so pri eksperimentih z rastočimi celicami bistvene aseptične tehnike. Za zagotovitev eksperimentalnega dosežka se mora število kontaminantov na opremi in delovni površini minimizirati. To naredimo s pripravo sterilnega delovnega okolja, precizno postavitvijo in korektnim odčitavanjem inštrumentov pri aseptičnem prenosu tekočin ter z ustreznim ravnanjem z inštrumenti, gojiščem in steklovino. Pred izvedbo postopka in po njej si je treba umiti roke z antiseptičnim milom in s toplo vodo. Delovno površino očistimo z dezinfekcijskim sredstvom, kot je alkohol (izopropanol ali 70% etanol ali fenolno spojino (o-fenilfenol)). Med delom uporabljamo Bunsenov gorilnik ali komoro z laminarnim pretokom zraka (LAF komora – slika 3), kar nam omogoča sterilno okolico. LAF komora vsebuje visoko učinkovit zračni filter (HEPA filter), ki odstrani v zraku prisotne kontaminante. Delamo počasi in previdno. Tekočine steriliziramo v avtoklavu na 121 °C vsaj 15 minut, večji volumni (> 1 L) medijev potrebujejo daljši čas avtoklaviranja. Laboratorijska oprema mora biti suho sterilizirana na 121 °C vsaj 30 minut. Sterilne raztopine se lahko hranijo na 4 °C do 5 mesecev, z izjemo nestabilnih raztopin. Infekcijske nevarne

odpadke je treba avtoklavirati ali dezinficirati. Preden jih zavržemo, sledimo laboratorijskim navodilom o varnosti (57).



Slika 3: LAF komora

3.1.4 LABORATORIJSKA OPREMA

Za izvedbo testov smo potrebovali laboratorijsko opremo, ki je predstavljena v preglednici 2:

Preglednica II: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

analitska tehtnica	Mettler Toledo, model XP 105 DR, Švica
magnetno mešalo	Ika, model C-MAG HS 7 IKAMAG®, Nemčija
avtoklav	Sutjeska Beograd, Jugoslavija
filter	2r = 0,22 μm, PES membrana, Švica
hladilnik in zmrzovalnik	Gorenje, Slovenija
nepropustni film	Parafilm®M
inkubator	WTW, model TS606/2-i, Nemčija
stresalnik + inkubator	Stresalnik Promax 1020 in Inkubator 1000, Heidolph, Nemčija
spektrofotometer	Perkin-Elmer, Lambda 20, ZDA
komora z laminarnim pretokom zraka (LAF)	Thermo electron corporation, Holten

komora)	laminair, ZDA
prozorne mikrotitrne plošče z ravnim dnom in 96 vdolbinicami	Nunclon™ Δ Surface, Nunc A/S, Danska
mikročitalec	EPOCH, Biotek Instruments, Združene države Amerike

3.1.5 GOJIŠČE

Kvasovke uspevajo na tekočem (minimalno + rastno gojišče) in trdnem gojišču (minimalno + rastno gojišče + agar).

3.1.5.1 *Minimalno gojišče*

Minimalno gojišče smo pripravili tako, da smo natehtali:

- 13,61 g KH_2PO_4 (Merck, Nemčija),
- 1,98 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Kemična tovarna Podnart, Slovenija),
- 4,2 g KOH (Merck, Nemčija),
- 0,41 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemčija),
- 50 mg levcina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 50 mg histidina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 50 mg adenina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 20 mg arginina-HCl (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 20 mg metionina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 30 mg tirozina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 30 mg izolevcina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 30 mg lizina-HCl (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 25 mg fenilalanina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 100 mg glutaminske kisline (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 150 mg valina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 375 mg serina (Sigma-Aldrich, Nemčija).

V 1 L bučo smo poleg zgoraj omenjenih spojin dodali še 1 mL raztopine železovega sulfata, ki smo jo pripravili tako, da smo 40 mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Nemčija) raztopili v 50 mL ultra čiste vode. Bučo smo dopolnili do oznake z ultra čisto vodo in jo mešali približno 6 ur na magnetnem mešalu pri 55 °C, da se je vse raztopilo. Raztopino smo prelili po 45 mL v 200 mL erlenmajerice. Te smo pokrili z vato in aluminijasto folijo ter jih avtoklavirali (121

°C; 1,1 bara; 20 min). Po ohlادitvi erlenmajeric na sobno temperaturo smo jih še vedno pokrite z vato in aluminijasto folijo odnesli v hladilnico.

Čistota reagentov minimalnega medija je znašala $\geq 98\%$, z izjemo čistote KOH, ki je bila $\geq 90\%$.

3.1.5.2 Rastno gojišče

Za pripravo ravnega gojišča smo natehtali in raztopili:

- glukozo (20 g/100 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- aspartatno kislino (200 mg/50 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- treonin (1200 mg/50 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- bakrov (II) sulfat (249,7 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /50 mL ultra čiste vode) (Carlo Erba, Italija),
- vitaminsko raztopino:
 - 8 mg tiamina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
 - 8 mg piridoksina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
 - 8 mg pantotenske kisline (Sigma-Aldrich, Nemčija),
 - 40 mg inozitola (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija).

Vitamine smo raztopili v 180 mL ultra čisti vodi in dodali še 20 mL biotinske raztopine (2 mg/100 mL ultra čiste vode) (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija).

Čistota omenjenih reagentov je bila $\geq 98\%$.

Raztopino glukoze, aspartatne kisline in treonina smo avtoklavirali (121 °C; 1,1 bara; 20 min). Raztopini bakrovega (II) sulfata in vitaminov smo ob ognju sterilno filtrirali skozi filter ($2r = 0,22 \mu\text{m}$, PES membrana). Reagente smo shranili na sobni temperaturi. Le raztopini treonina in vitaminov smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

V erlenmajerice z minimalnim medijem smo v aseptičnih pogojih dodali:

- 5 mL glukoze raztopine,
- 1,25 mL aspartatne kisline,
- 0,5 mL vitaminske raztopine,
- 0,4 mL treoninske raztopine,
- 125 μL raztopine CuSO_4

ter tako pripravili tekoče gojišče.

3.1.5.3 Trdno gojišče

V 90 mL minimalnega gojišča smo dali 1,5 g agarja (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija) ter vse skupaj avtoklavirali (121 °C; 1,1bar; 20 min). Še v toplo erlenmajerico smo sterilno in ob ognju dodali že pripravljene raztopine:

- 10 mL glukozne raztopine,
- 2,5 mL aspartatne raztopine,
- 1 mL vitaminske raztopine,
- 0,8 mL treoninske raztopine,
- 0,25 mL raztopine CuSO₄.

Tekočino smo prelili v petrijevke in jih pustili odprte pri ognju, dokler se ni vse skupaj strdilo. Da bi preprečili izgubo vlage, smo jih ovili s parafilmom. Nato smo jih dali v hladilnik na 4 °C.

3.1.5.4 Ohranjanje kulture kvasovk

Po enem mesecu gojenja kvasovk na trdnem gojišču smo jih sterilno precepili na novo trdno gojišče. Precepili smo jih s pomočjo sterilne kovinske zanke, tako da smo vzeli ločeno kolonijo in jo prenesli na novo gojišče. V inkubatorju na 28 °C smo petrijevke pustili 5 dni. V tem času so kvasovke zrastle, zato smo petrijevke zaščitili s parafilmom in jih prenesli v hladilnik (4 °C).

3.1.5.5 Namnožitev kvasovk v tekočem gojišču

Sterilno smo v erlenmajerico z rastnim gojiščem precepili kvasovke iz trdnega gojišča s pomočjo sterilne kovinske zanke. Erlenmajerico, pokrito z vato, smo dali stresat na 100 rpm in jo segrevali pri 28 °C (stresalnik + inkubator). Po približno 24 urah so kvasovke dosegle optično gostoto (OD) 0,75–1,2, ki smo jo izmerili na spektrofotometru pri valovni dolžini 620 nm.

3.2 METODE

3.2.1 TEST CITOTOKSIČNOSTI

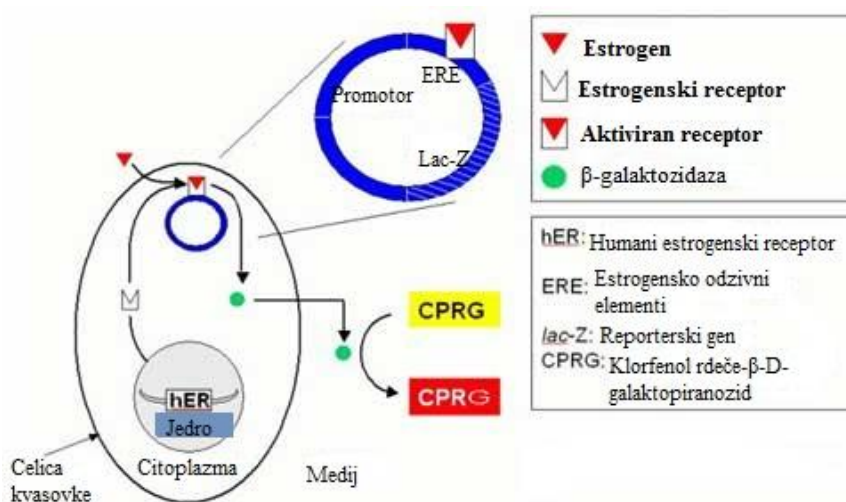
Pomemben napredek v zgodnji medicini predstavlja Paracelsusovo odkritje, da imajo vse spojine zmožnost povzročiti zastrupitev, odvisno od odmerka. Zato je v industrijski praksi za identifikacijo in določitev varnostnega praga novih potencialnih kemoterapevtikov testiranje toksičnosti nujno in kritično. Spojina je citotoksična, če prepreči celično adhezijo, povzroči dramatične morfološke spremembe, neželjeno učinkuje na stopnjo replikacije ali vodi v

zmanjšanje celotne živosti (viabilnosti). Manifestacija učinkov je odvisna od dolžine izpostavljenosti spojini in mehanizma citotoksičnosti (58).

Poznamo več testov za merjenje citotoksičnosti. To so testi viabilnosti, testi preživetja, metabolni testi, testi transformacije in testi preobčutljivosti. V predhodnih preizkusih vezave testiranih spojin na AR in GR so uporabili test MTS, ki spada med metabolne teste. Pri nas izvedba dodatnih testov ni bila potrebna, saj smo poleg EA s testom YES določili tudi citotoksičnost. Z merjenjem optične gostote kvasovk smo preverili, ali vzorci vplivajo na spremembo rasti. Naš način določitve citotoksičnosti uvrščamo med teste rasti in razmnoževanja, saj so se razlike pokazale šele čez določen čas (59).

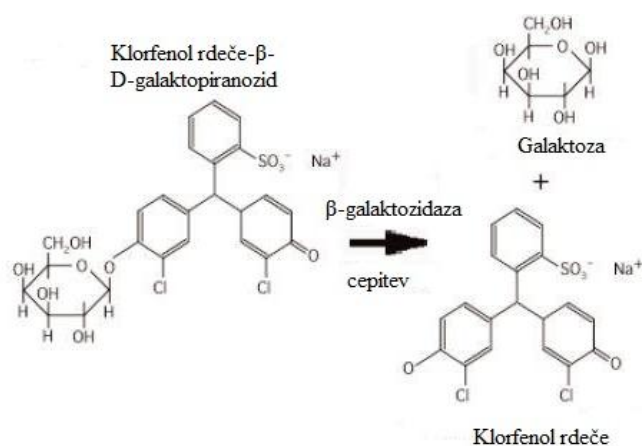
3.2.2 ESTROGENSKI TEST S KVASOVKAMI (TEST YES)

Med biološkimi tehnikami so *in vivo* testi v primerjavi z *in vitro* testi dražji in dolgotrajnejši ter potrebujejo eksperimentalne živali. Najenostavnejši testi za reševanje in spremljanje EA so reporterski testi; imenovani tudi *in vitro* testi genske ekspresije. Zanje uporabljamo genetsko zasnovane sesalske celice ali seve kvasovk (54, 55). Med te teste spada naš izbrani test, test YES, ki je bil skupaj z rekombinantnim sevom kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) razvit na oddelku genetike v Glaxu s pomočjo J. Sumpterja (Brunel University, Uxbridge, Velika Britanija). Leta 1996 sta Sumpter in Routledge objavila metodo. Namen je identifikacija spojin, ki interagirajo s hER. V kromosom kvasovk so stabilno integrirali sekvenco DNK za hER in plazmid z ERE (slika 4). ERE kontrolirajo ekspresijo reporterskega gena lac-Z (zapis za encim: β -galaktozidazo).



Slika 4: Shema poteka testa YES (prirejeno po 60)

V primeru, da pride do interakcije med hER in aktivnim ligandom, se sproži genska transkripcija. Reporterski gen lac-Z se izrazi in sintetizirana β -galaktozidaza metabolizira rumeni kromogeni substrat: klorfenol rdeče β -D-galaktopiranozid (CPRG) v rdeče-vijolični produkt (slika 5). Produkt lahko izmerimo preko absorpcijskega maksimuma pri 540 nm (61, 62). Če izmerimo absorbanco razpadlega CPRG pri 575 nm, dobimo 75 % višji odziv kot pri 540 nm. Medtem ko sta Routledge in Sumpter prikazala EA kot absorbanco razpadlega produkta, izmerjeno pri 540 nm, smo mi predstavili EA kot aktivnost β -galaktozidaze (63).



Slika 5: Razpad CPRG (prirejeno po 64)

Test YES odlikujejo mnoge dobre lastnosti: je hiter, občutljiv, robusten, enostaven za izvedbo, ne potrebuje drage opreme ter velike količine vzorca. Rezultate lahko pridobimo hitro. Prav tako imajo kvasovke številne ugodnosti. Preprostost testa YES je, da se produkt reporterskega gena izloči v medij in ni potrebna liza celic. Le malo je spojin, katerih EA ne more biti določena, to so lahko visoko kontaminirane odpadne vode industrijskega izvora, namreč na odziv kvasovk lahko vpliva sama matrica vzorca. Možne so analize naravnih vodnih vzorcev, koncentriranih okoljskih vzorcev in kemikalij oziroma mešanic v topilih etanol ali DMSO. Test YES se uporablja tudi v kombinaciji s kemijskimi analizami (54–56).

Občutljivost med *in vitro* testi se razlikuje; pri testu YES velja meja detekcije 1–3 ng/L za E2. Sesalsko zasnovani testi večinoma zaznajo estrogene v nižjih koncentracijah, npr. ER-luciferazni test ima mejo zaznave za E2 0,1 ng/L (54–56).

Kot že omenjeno, je ena od slabosti testa YES ta, da lahko na odziv celic kvasovk vpliva matrica vzorca, še posebno pri odpadnih vodah industrijskega izvora. Poleg tega test YES ne zazna vedno antagonistične aktivnosti, na kar je treba paziti pri kompleksnejših okoljskih vzorcih (54, 55).

3.2.2.1 *INDIKATOR ZA TEST YES*

Pri testu YES je naš indikator CPRG (Sigma-Aldrich, Nemčija). V epico smo ga natehtali 10 mg ter sterilno ob ognju raztopili v 1 mL sterilne destilirane vode. Raztopino smo razdelili v 5 epic po 200 μ L, jih povili z aluminijasto folijo in jih shranili v hladilniku pri 4 °C.

Čistota CPRG je bila ≥ 90 %.

3.2.2.2 *IZVEDBA TESTA YES*

LAF komoro smo razkužili s 70% etanolom (Klercide 70/30®, Ecolab, Velika Britanija) in dezinfekcijskim sredstvom (Asepsol®, Pliva, Hrvaška). Zaprto komoro smo 15 min izpostavili UV-svetlobi, po tem času smo za 15 min vključili laminarni pretok zraka. Nato smo lahko pričeli z delom. Uporabili smo prozorne mikrotitrsko plošče z ravnim dnom in 96 vdolbinami. Sterilne nastavke pipet smo pri vsakem nanosu zamenjali. Na prvo mikrotitrsko ploščo smo nanесли enkrat po 100 μ L:

- E2 (Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost ≥ 98 %): pozitivni standard, veže se na ER;
- progesteron (Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost ≥ 99 %): negativni standard, se ne veže na ER;
- vzorce preiskovanih spojin: RSV, ZMP-15, ZMP-17, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-23, ZMP-24, ZMP-25.

E2 in progesteron smo pripravili tako, da smo 5 mg (natehtano na analitski tehtnici) vsakega raztopili v epici v 1 mL DMSO (Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost $\geq 99,9$ %). Redčili smo: E2 do koncentracije 27,2 μ g/L in progesteron do koncentracije 31,4 μ g/L. To sta bili naši izhodni raztopini E2 in progesterona, ki smo ju hranili pri -20 °C v zamrzovalniku.

Priprava vzorcev je opisana pod točko 3.1.1.

Na prvi mikrotitrski plošči smo nanese raztopine redčili za faktor 2 z DMSO, tako da smo dobili 12 redčitev za vsako raztopino posebej. Iz prve vdolbinice smo prenesli v drugo vdolbinico 50 μ L raztopine in dodali 50 μ L DMSO. Nato smo iz druge vdolbinice prenesli 50 μ L v tretjo vdolbinico in zopet dodali 50 μ L DMSO. To smo ponavljali do zadnje, dvanajste vdolbinice.

Na drugo mikrotitrsko ploščo smo iz vsake vdolbinice iz prve plošče prenesli po 4 μ L v dveh paralelkah. Počakali smo, da je DMSO izhlapel in medtem v LAF komori pripravili:

- kvasovke in rastni medij – kontrola rasti kvasovk;

- kvasovke, rastni medij in CPRG – kontrola, ali je prišlo do okužbe kvasovk in ali ER deluje pravilno; to je bil tudi naš slepi vzorec, ki ga rabimo pri izračunu EA;
- rastni medij in CPRG – kontrola ali rastni medij vpliva na razpad CPRG.

Koliko kvasovk je bilo treba dodati v 45 mL na novo pripravljenega rastnega medija, smo izračunali po enačbi 1.

$$\frac{2}{OD} = mL \text{ kvasovk} \quad \text{Enačba 1}$$

Predvidena OD je bila približno 1. Nato smo dodali CPRG. Dodatek CPRG je bil vedno 200 μ L v 45 mL rastnega medija.

V posušene vdolbinice druge mikrotitrsko plošče smo nanесли po 200 μ L slepega vzorca. Prazne vdolbinice smo napolnili s po 200 μ L z zgoraj naštetimi kontrolami.

Končne koncentracije raztopin oz. koncentracije na drugi mikrotitrski plošči v prvih vdolbinicah: E2 2,0E-03 μ M, progesteron 2,0E-03 μ M, ZMP-15 243,9 μ M, ZMP-17 392,9 μ M, ZMP-20 495,6 μ M, ZMP-21 396,9 μ M, ZMP-23 207,5 μ M, ZMP-24 208,7 μ M, ZMP-25 181,9 μ M, RSV 438,1 μ M.

Drugo mikrotitrsko ploščo smo po končanem delu pokrili s pokrovom, jo nežno pretresli in odnesli v inkubator na 34 °C za 48–72 ur.

3.2.3 IZRAČUNI

V času inkubacije je prišlo do namnožitve kvasovk in do razgradnje CPRG. Na mikročitalcu smo s programsko opremo Gen5 2.07 izmerili absorbanco pri 575 nm in 620 nm. Pri valovni dolžini 575 nm smo določili intenzivnost obarvanja rdečega produkta, medtem ko smo pri 620 nm določili rast kvasovk.

3.2.3.1 EA ali aktivnost β -galaktozidaze

Definicija lastnosti EA so kemikalije, ki posnemajo ali antagonizirajo učinke naravno prisotnih estrogenov. EA je najbolj pogosta oblika endokrine motnje (65). V našem primeru je EA enaka aktivnosti β -galaktozidaze.

$$EA = A_{575nm} (\text{vzorec}) - (A_{620nm} (\text{vzorec}) - A_{620nm} (\text{stepla})) \quad \text{Enačba 2}$$

(A = absorbanca, izmerjena pri 575 nm ali 620 nm)

3.2.3.2 Relativna estrogenska aktivnost (REA)

Za lažjo predstavo o estrogenosti uporabljamo REA, ki nam pove, kakšen je EA spojine v primerjavi z EA E2.

$$REA [\%] = \frac{(EA_{vzorec} - EA_{slepa})}{(EA_{max\ E2} - EA_{min\ E2})} \times 100 \quad \text{Enačba 3}$$

3.2.3.3 Zaviranje rasti kvasovk

Preverili smo, ali analogi ZMP in RSV toksično vplivajo na kvasovke. V primeru, da so bili citotoksični, se je to pokazalo na zmanjšani rasti. V primeru, da smo kvasovkam izmerili več kot 50% zaviranje rasti, teh koncentracij nismo upoštevali pri izračunu EA in REA.

$$zaviranje\ rasti\ kvasovk [\%] = \left(1 - \frac{A_{620nm}(vzorec)}{\bar{A}_{620nm}(P)}\right) \times 100 \quad \text{Enačba 4}$$

(P = progesteron)

Vse izračune smo naredili s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel 2007, pri vrednotenju rezultatov smo upoštevali relativno standardno deviacijo (RSD), ki je bila manjša od 20 %. Izvedli smo dve neodvisni oz. biološki ponovitvi testa YES; torej ponovitve so bile izvedene vedno na drugi pasaži kvasovk.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 DOLOČITEV CITOTOKSIČNOSTI

V preizkusu preverjanja estrogenosti RSV in analogov ZMP smo uporabili kot testni sistem kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*). Za relevantnost naših rezultatov so morale kvasovke doseči določeno konfluentnost; optična gostota se je morala gibati v območju 0,75–1,2. Pri eksperimentalnemu delu smo upoštevali sterilne pogoje, da ni prišlo do okužbe gojišča, neželenih sprememb na kvasovkah in posledično tudi neveljavnosti izvedenega testa. Kljub pazljivosti na prisotnost sterilne okolice in laboratorijske opreme kvasovke ne morejo zrasti, če RSV in analogi ZMP na njih delujejo citotoksično. Koncentracije, pri katerih smo ugotovili zaviranje rasti nad 50 %, nismo upoštevali pri izračunu EA, saj ne bi dobili pravih rezultatov (63).

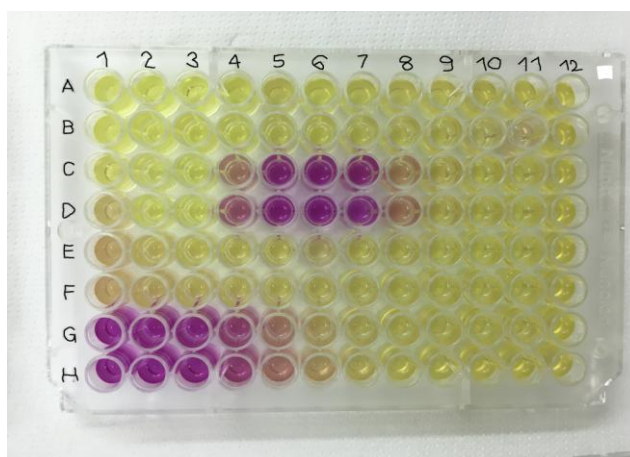
Vzorci smo pripravili v DMSO, ki sicer izboljša topnost, vendar lahko vpliva na viabilnost celic. DMSO se je poleg etanola v testu YES že uporabljal kot topilo za preiskovane spojine in pri tem ni prišel v stik s testnim organizmom, saj smo pred dodatkom kvasovk in gojišča v vdolbinice na mikrotitrski plošči počakali, da je topilo izparelo. S tem smo zagotovili, da ni prišlo do stika med kvasovkami in DMSO. Sami smo to preverili tako, da smo po 48–72 urah inkubacije izmerili absorbanco slepega vzorca (kvasovke, rastni medij in CPRG) z dodatkom DMSO in brez njega pri 620 nm. Do razlike ni prišlo (obe absorbanci sta bili 0,91) in tako lahko potrdimo, da DMSO ne vpliva na število živih celic.

Po končani izvedbi in izmerjenih absorbancah vzorcev ter negativne kontrole (progesteron, kvasovke, rastni medij in CPRG) pri 620 nm smo z enačbo (enačba 4), omenjeno v poglavju Materiali in metode, izračunali zaviranje rasti kvasovk. Absorbanca pri 620 nm je premosorazmerna z gostoto celic. Upoštevali smo RSD, ki je bila manjša od 20 %. RSV smo na začetku pripravili v epici, 10 mg v 500 μ L DMSO. Izmerjena koncentracija 1752,5 μ M je imela 54,3% zaviranje rasti, zato smo pripravili 4-krat nižjo koncentracijo (438,1 μ M). Ta in nadaljnje redčene koncentracije niso pokazale zaviranja rasti, odstotek preživetja za 438,1 μ M RSV je bil 95,2 %.

Vzorci ZMP-21, ZMP-23, ZMP-24, ZMP-25 niso pokazali zaviranja rasti na kvasovkah v testiranem koncentracijskem območju. Najvišje koncentracije, ki smo jih testirali, so bile: ZMP-21 396,9 μ M, ZMP-23 207,5 μ M, ZMP-24 208,7 μ M, ZMP-25 181,9 μ M. V višje koncentracije nismo mogli iti, saj smo imeli omejeno maso posamezne spojine. Ker smo

predvsem želeli ugotoviti, kakšni so učinki teh spojin pri istih terapevtskih koncentracijah kot pri RSV, so te koncentracije zadostovale.

Vzorci ZMP-15, ZMP-17 in ZMP-20 so pokazali zaviranje rasti, višje od 50 %, in sicer v koncentracijah, višjih od ZMP-15 61,0 μM , ZMP-17 98,2 μM , ZMP-20 62,0 μM . Odstotki zaviranja rasti za navedene koncentracije spojin so: ZMP-15 52,1 %, ZMP-17 65,9 %, ZMP-20 64,9 %. V višjih koncentracijah je zaviranje rasti kvasovk višje. Citotoksičnost lahko na grafu opazimo kot upad krivulje EA (slika 9 in 10), na mikrotitrski plošči pa kot rumeno obarvane vdolbinice (slika 6, vrstici C in D).



Slika 6: Mikrotitrski plošča po inkubaciji s preiskovanimi spojinami in kontrolnimi vzorci. Vrstici A in B vsebujeta negativno kontrolo (progesteron) – reakcija ne poteče (rumena barva). Vrstici C in D vsebujeta ZMP-20; višje koncentracije oz. začetne vdolbinice so toksične (rumena barva), nadaljne srednje koncentracije pa kažejo EA (vijolična barva). Vrstici E in F vsebujeta ZMP-21, ki se le v najvišji koncentraciji veže z ER (umazana rumena barva). Vrstici G in H vsebujeta pozitivno kontrolo (E2) in tukaj intenzivnost vijolične barve pada skupaj s koncentracijo. Za vsako preiskovano spojino smo naredili dve seriji poskusov.

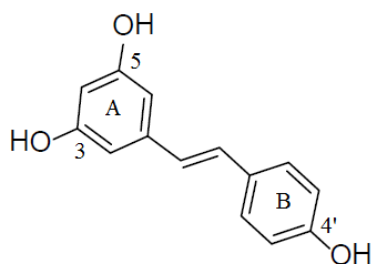
Pri vrednotenju zaviranja rasti kvasovk s preiskovanimi spojinami in kontrolami v primerjavi s sesalskimi celicami je treba upoštevati, da je membrana kvasovk manj permeabilna za substance, ki prehajajo membrano s pasivno difuzijo ali s pomočjo selektivnega privzema (65). Toksičnost RSV je bila raziskana že na mnogih *in vitro* celičnih linijah, a za njegove analoge še ni dosti informacij.

Pri testu MTS, ki so ga na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani že izvedli na celični liniji MDA-kb2, so bile citotoksične spojine ZMP-15 pri 50 μM , ZMP-17 pri 25 μM in RSV prav tako pri 50 μM (52, 53). Spojina ZMP-15 ni toksična le za celice MDA-kb2, temveč tudi za kvasovke, vendar v višjih koncentracijah. Spojini ZMP-17 in RSV sta pokazali citotoksične učinke le za celice MDA-kb2, ne pa tudi za celice kvasovk. V primerjavi z

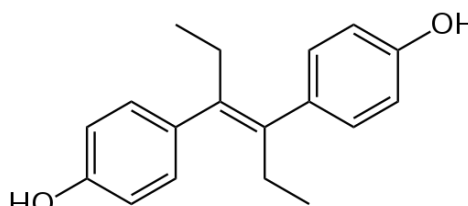
dobljenimi rezultati na kvasovkah lahko zaključimo, da je celična linija MDA-kb2 občutljivejša na RSV in analoge, kot so kvasovke, saj so koncentracije, ki že povzročajo citotoksičnost, nižje. Kot že omenjeno, sta spojini ZMP-15 in ZMP-20 najbolj citotoksični za kvasovke, sledi ZMP-17. Ostali analogi, vključno z RSV, niso citotoksični v preiskovanih koncentracijah.

4.2 DOLOČITEV ESTROGENSKE AKTIVNOSTI SPOJIN ZMP IN RSV

Z opažanjem, da je RSV (slika 7) strukturno podoben DES (slika 8), so predpostavili, da deluje kot fitoestrogen. Oba v kemijski strukturi vsebujeta stilbenski skelet in fenolni obroč A (37). Mnogo študij je preučevalo vpliv RSV na estrogenost, poročali so tako o superagonizmu, agonizmu kot tudi antagonizmu (16, 22, 37, 43). Na rezultate zelo vpliva koncentracija izpostavitve, v višjih koncentracijah (100 μM) kaže antiestrogene lastnosti (antikarcenogeni učinki na rakave celice), medtem ko so pri nižjih koncentracijah (10–25 μM) opazili zvišano endogeno EA. Drugi vplivi so še: občutljivost testnega organizma, testna koncentracija, reporterski geni (ERE sekvenca), prisotnost E2 ali prisotnost antagonistov, delovanje dodatnih signalnih poti ter na katerem ER je ekspresiran (α ali β). (38, 39).



Slika 7: Strukturna formula RSV

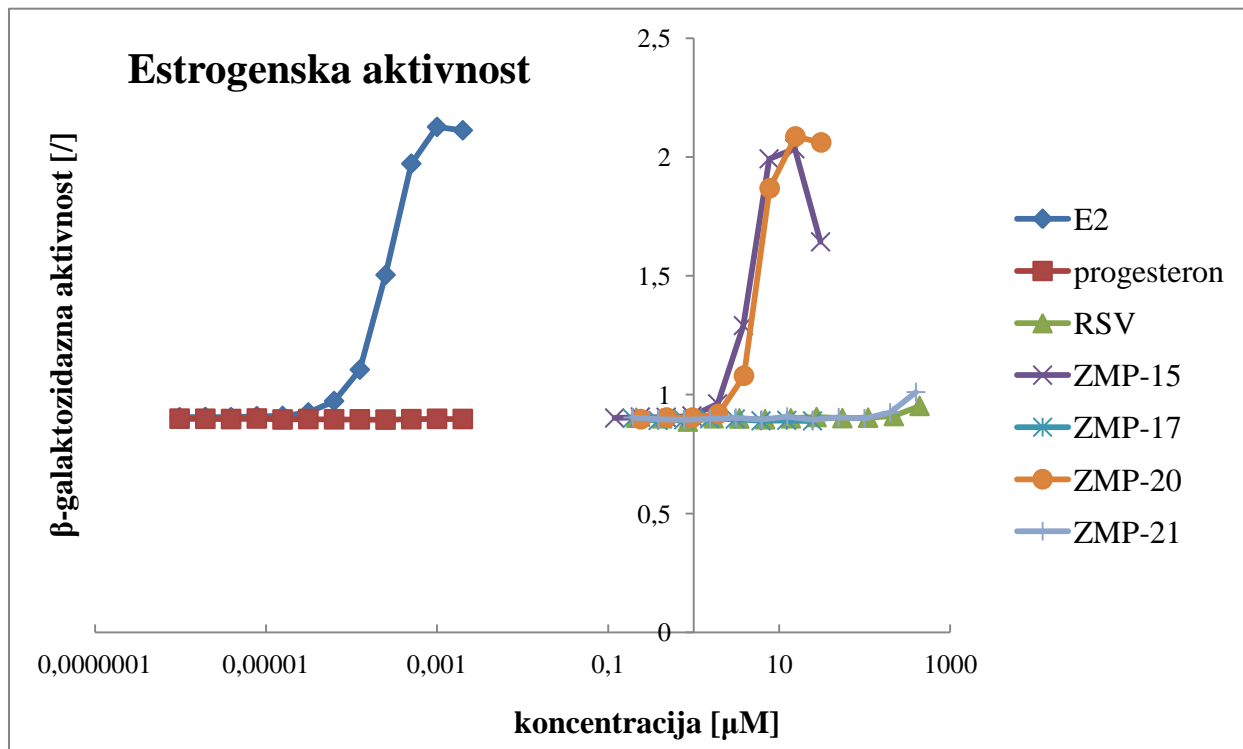


Slika 8: Strukturna formula DES (64)

Za ugotavljanje estrogenosti RSV in njegovih analogov smo izbrali test YES zaradi številnih prednosti same izvedbe in enostavnega rokovanja s kvasovkami, ki služijo kot modelni organizem. Kot pozitivno kontrolo smo izbrali E2, ki je naravni ligand za ER in katerega strukturne karakteristike za vezavo z ER so definirane. Za negativno kontrolo smo vzeli progesteron, ki tudi nastaja v telesu, a je znan estrogenski antagonist in ne tvori interakcij z ER. V primeru, da se preiskovana spojina veže z ER, pride do reakcije in spremembe barve iz rumene v rdečo/vijolično. V nasprotnem primeru, če se ne veže, barva ostane nespremenjena (rumena).

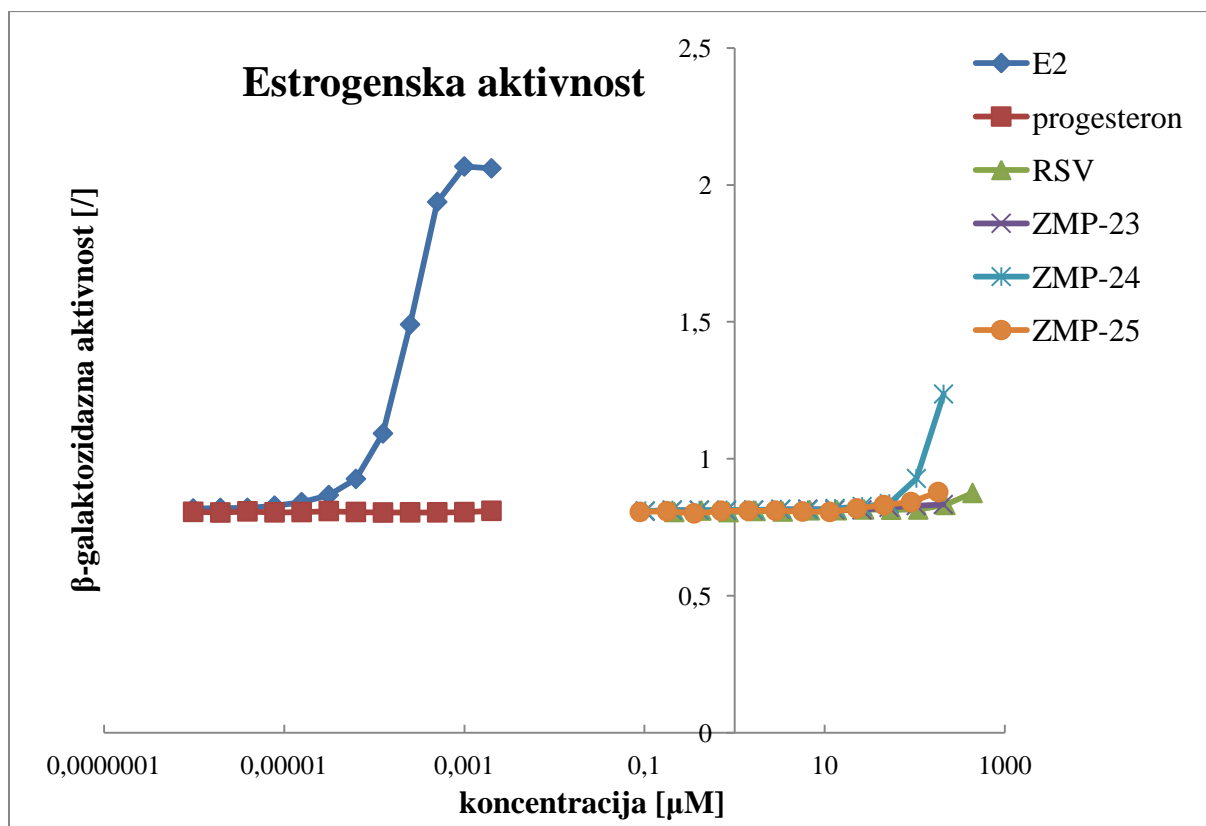
Za potrditev ustreznosti testa smo izbrali tri kontrole: da smo preverili, ali hER v kvasovkah deluje (kvasovke, rastni medij in CPRG), ali kvasovke rastejo v mediju (kvasovke in rastni medij) in ali bi medij lahko vplival na potek reakcije oz. razpad CPRG (CPRG in rastni

medij). Po ugotovitvi, da so receptorji pravilno izraženi, da kvasovke rastejo in da ni nepričakovanih zapletov, smo lahko potrdili naše rezultate. Z izmerjenimi absorbancami pri 575 nm in 620 nm smo izračunali aktivnost β -galaktozidaze (enačba 2) za vse preiskovane spojine. Izjema so bile spojine pri koncentracijah, ki so kazale več kot 50% zaviranje rasti. Za lažjo predstavbo smo vrednosti EA pretvorili v vrednosti REA s pomočjo zgornje enačbe (enačba 3). Tako kot pri izračunih citotoksičnosti smo tudi pri izračunih vrednosti REA upoštevali, da je bil RSD absorbanc manjši od 20 %. Vrednosti REA so primerjava glede na EA pozitivne kontrole (E2). Izračune smo predstavili na grafu (slika 9 in 10). Spojini ZMP-15 in ZMP-20 sta pokazali najvišji REA, in sicer ZMP-15 pri koncentraciji 15,2 μ M 92,8 % in ZMP-20 pri koncentraciji 31,0 μ M 95,0 %. Spojini v višjih koncentracijah delujeta citotoksično na kvasovke, zato je to naša zgornja določitevna meja. Po jakosti EA sledi spojina ZMP-24, ki je pri koncentraciji 208,7 μ M pokazala 34,5 % REA. Nekajodstotno REA so v mnogo višjih koncentracijah pokazale: ZMP-21 pri 396,9 μ M 8,9 %, ZMP-23 pri 207,5 μ M 2,2 % in ZMP-25 pri 181,9 μ M 5,8 %. RSV smo izračunali le 4,9 % REA pri 438,1 μ M. Najvišja merjena koncentracija RSV je bila večja od ostalih najvišjih koncentracij spojin, a kljub temu ni pokazala drastične razlike estrogenosti v primerjavi s temi. Spojina ZMP-17 ni pokazala nikakršne EA, v višjih koncentracijah je bila tudi zelo citotoksična.



Slika 9: EA testiranih spojin in kontrol. Na levi strani grafa sta prisotni kontroli, negativna kontrola (progesteron) ne kaže estrogenosti (vodoravna črta) v nasprotju s pozitivno kontrolo (E2), ki jo kaže sigmoidna krivulja. Na desni strani opazimo najbolj estrogensko aktivni

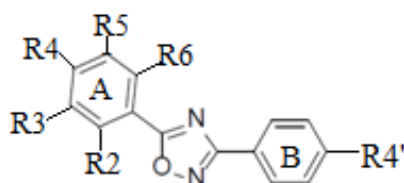
spojini ZMP-15 in ZMP-20, in sicer ZMP-15 pri koncentraciji 15,2 μM ter ZMP-20 pri 31,0 μM , ki dosežeta skoraj enako EA kot E2 pri 0,001 μM . Ostale spojine komaj opazno izkazujejo estrogenost.



Slika 10: EA testiranih spojin in pozitivne (E2) ter negativne kontrole (progesteron). Podobno kot pri grafu na sliki 8 tudi tukaj na desni strani opazimo EA vzorcev spojin in najbolj izstopajočo spojino ZMP-24, ki pa še zdaleč pri koncentraciji 208,7 μM ne doseže maksimalne EA E2, ki jo ta doseže pri 0,001 μM .

4.2.1 POVEZAVA MED STRUKTURO PREISKOVANIH SPOJIN IN EA

RSV v svoji kemijski strukturi vsebuje dva aromatska obroča, ki sta povezana med sabo z etilensko skupino, in tri hidroksilne skupine na mestih 3, 5 in 4' (slika 7). Preiskovani analogi RSV se razlikujejo v 1,2,4-oksadiazolnem obroču ter prisotnosti in pozicije hidroksilnih in metoksi skupin. Njihovo osnovno strukturno formulo predstavlja slika 11.



Slika 11: Osnovna struktura analogov RSV

Kot vidimo iz kemijskih struktur (preglednica 1), najbolj estrogensko aktivni spojini ZMP-15 in ZMP-20 vsebujeta dve hidroksilni skupini, obe na mestu 4' ter na mestu 4 (ZMP-15) oziroma 5 (ZMP-20). Primerjavo lahko naredimo tudi med spojinama ZMP-24 in RSV, saj sta si strukturno najbolj podobni; razlikujeta se le v distančniku med aromatskima obročema, ki ga pri RSV predstavlja etilenski most, pri ZMP-24 pa 1,2,4-oksadiazolni obroč. Kljub temu je bila jakost EA pri ZMP-24 višja kot pri RSV. Spojini ZMP-17 in ZMP-21 imata na mestu 4' hidroksilno skupino in dve metilirani hidroksilni skupini. Razlika v strukturi teh dveh spojin je v poziciji metoksi skupin; pri ZMP-17 sta na mestu 3 in 5, pri ZMP-21 pa na mestu 2 in 4. Spojina ZMP-17 je bila pri koncentracijah, višjih od 98,2 μM , citotoksična. V koncentracijah, nižjih od 98,2 μM , pa nismo izmerili nobenih učinkov EA. Zato vseeno ne moremo z zagotovostjo trditi, da v višjih koncentracijskih območjih ZMP-17 ne modulira aktivnosti ER. Zadnjo primerjavo lahko naredimo med analogoma ZMP-23 in ZMP-25, ki imata tri metoksi skupine: na mestu 4' ter na mestih 3 in 5 pri ZMP-23 oziroma na mestih 2 in 4 pri ZMP-25. Oba dajeta primerljiva rezultata za EA.

Glede na rezultate lahko sklepamo, da sta pri vezavi z ER pomembni dve hidroksilni skupini na določeni razdalji. Na prvem obroču (obroč A) je ugodno, da je na mestu 4' hidroksilna skupina, ki ne sme biti metilirana, na drugem obročnem sistemu (obroč B) je najustreznejša substitucija s skupino OH na mestu 4 ali 5. Dve hidroksilni skupini na obroču A močno znižata EA. Pri spojini ZMP-24 je bolj otežena rotacija hidroksilnih skupin v metapoložaju zaradi 1,2,4-oksadiazolnega distančnika v primerjavi z RSV, ki ima etilenski distančnik med obročema. Oksodiazolski obroč močno poveča rigidnost molekule, zato preseneča, da ima RSV manjšo EA kot ZMP-24. Uvedba metoksi skupin na obeh obročih A in B občutno zmanjša EA, saj je možna manjša fleksibilnost interakcij z vezavnim mestom na receptorju. Manjše zmanjšanje EA povzroči prisotnost dveh hidroksilnih skupin na obroču A. To lahko opazimo pri ZMP-21, ZMP-23 in ZMP-25.

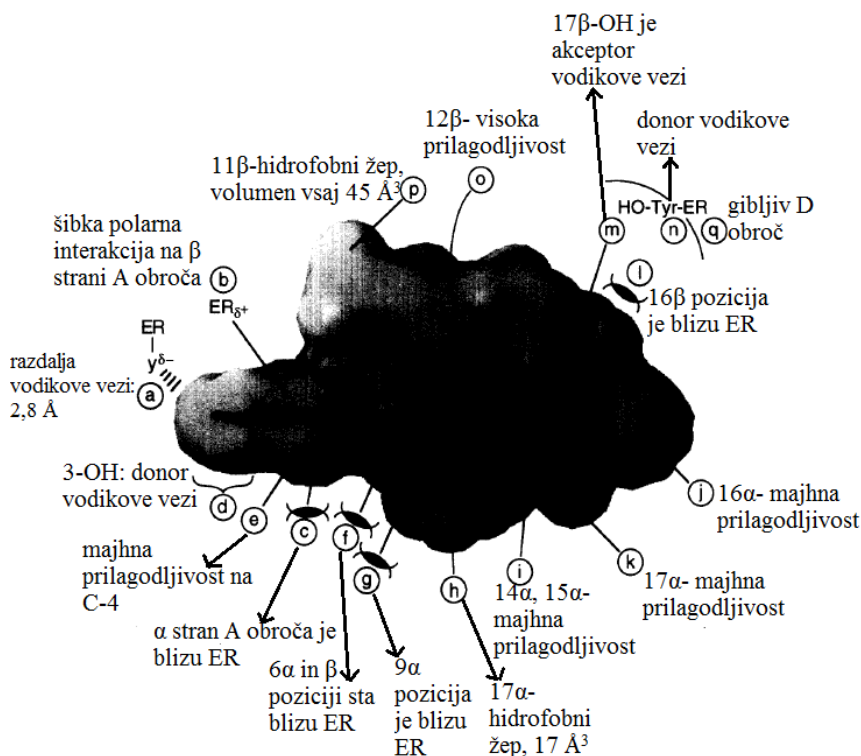
Naše sklepe o povezavi med strukturo in estrogenskim učinkom za RSV in ZMP analoge potrjuje študija podobnih RSV analogov s stilbensko strukturo na estrogensko občutljivih rakavih celic dojke (MCF-7), ki je pokazala, da že majhne spremembe v strukturi RSV derivatov rezultirajo v različnih vezavnih afinitetah z ER α . V študiji sicer niso imeli analogov ZMP, vendar so imeli analogi RSV stilbensko strukturo. Poleg tega so merili učinek v mnogo nižjih koncentracijah (od 1 nM do 1 μM). V naslednjem vrstnem redu je padala njihova vezavna afiniteta z ER α : 3,4'-dihidroksistilben (najvišja), 4,4'-dihidroksistilben, 4-hidroksistilben in RSV (najmanjša). Za razliko od ostalih 3,5-dihidroksistilben ni pokazal

vezavne aktivnosti (51, 66). Najvišjo estrogensko jakost med stilbeni ima spojina z eno hidroksilno skupino na obroču A (mesto 3 ali 4) in z drugo hidroksilno skupino na 4' mestu. Na podlagi teh podatkov lahko potrdimo domnevo, da dve hidroksilni skupini na obroču A močno zmanjšata vezavo z ER v primerjavi z vezano le eno hidroksilno skupino. Spojino ZMP-15, ki je pri nas pokazala poleg spojine ZMP-20 najmočnejšo EA, lahko primerjamo s 4,4'-dihidroksistilbenom. V naši raziskavi in v omenjeni literaturi sta obe omenjeni spojini močnejša estrogena kot RSV.

4.2.2 FARMAKOFOR E2

Za lažjo predstavo o odnosu med strukturo in vezavo estrogenskih spojin z ER smo poiskali do sedaj poznani farmakofor E2 (slika 12). Ligand-vezavna domena ER vsebuje približno 250 aminokislin in je zelo hidrofobna, z izjemo njenih končnih aminokislinskih preostankov. Zato ne preseneča, da je naravni ligand E2 nepolaren in hidrofoben. Za farmakofor veljata dve s hidrofobnim distančnikom ločeni hidroksilni skupini, ki sta sposobni tvorbe vodikovih vezi z dobro zastopanimi polarnimi aminokislinskimi ostanki v vezavnem žepu ER. Poleg tega so pomembne elektrostatske interakcije, ki jih tvorijo aromatski obroči (67). Fenolna hidroksilna skupina na obroču A E2 (3-OH) deluje kot donor vodikove vezi, spremeni konformacijo receptorja in posledično poveča interakcijo z akceptorjem vodikove vezi, ki je 17 β -OH skupina na obroču D E2 (68, 69). RSV in analogi so zmožni tvorbe vodikovih vezi preko hidroksilnih in metoksi skupin. Slednji delujejo le kot akceptorji vodikovih vezi. Hidrofobni distančnik (oddaljenost med dvema hidroksilnima skupinama) znaša 10,9 Å za E2 in 12,1 Å za DES, kar pomeni, da so dovoljena manjša odstopanja v razdalji. Zato predvidevamo, da zamenjava etilenskega mostu v RSV z 1,2,4-oksadiazolnim obročem ne bi smela bistveno vplivati na spremembo vezave z ER. Pri vezavi z ER so poleg vodikovih vezi pomembne tudi elektrostatske interakcije, in sicer bolj kot sama velikost vezavnega liganda (67). V našem primeru so elektrostatske vezi možne pri vseh analogih in RSV, saj vsebujejo dva aromatska obroča, ki tvorita π - π interakcije. Ugotovili so tudi, da dodatek steričnih in polarnih substituentov na E2 močno zmanjša vezavno afiniteto, vendar pa so možne hidrofobne substitucije na določenih mestih (68, 69). Najprej smo si pogledali možne substitucije E2 na obroču A. Substitucija na C-1 E2 na obroču A ni zaželena in močno zmanjša EA (69). Pri nas bi to mesto lahko primerjali s pozicijo 6, ki pri nobeni spojini ZMP ni substituirana. Majhne skupine so tolerirane na C-2 in C-4 E2, večje skupine in tiste, ki bi potrebovale 3-OH skupino za intramolekularno vodikovo vez, bistveno zmanjšajo afiniteto vezave (69). S tem lahko razložimo, zakaj dodatek še ene hidroksilne skupine na obroč A pri ZMP-24 in RSV drastično

zniža EA v primerjavi z ostalimi spojinami ZMP, ki imajo le eno hidroksilno skupino na obroču A. Nato smo se osredotočili še na možne substitucije na obroču D E2, saj smo predvidevali, da substitucije na obroču B in C E2 za nas niso relevantne (mesto etilenskega mostu ZMP spojin). V primeru, da se 17 β -OH skupina E2 metilira, se afiniteta zmanjša za 7 %, saj lahko eter spremeni prosto rotacijo kisika ter tako zmanjša dostopnost prostih elektronskih parov na kisiku za tvorbo vodikovih vezi v primerjavi s hidroksilno skupino. Pri nas je bil metilni eter na B obroču spojin ZMP-23 in ZMP-25 precej nezaželen, kar pokaže nizka EA. Poziciji 15 in 16 β sta precej netolerantni za substitucije. Na mesto 16 α E2 lahko uvedemo velike nepolarne skupine (npr. jod) in na 17 α majhne nepolarne skupine (npr. etinil) (69). Povečanje sterične ovire na mestu 17 α steroidnega obroča poveča verjetnost vezave na ER α v primerjavi z ER β , kar je ena od redkih vezavnih razlik med izooblikama ER (67). To v našem primeru sicer ni relevanten podatek, vsekakor pa pomeni, da dodatek metoksi skupine ZMP analogom na obroču B, neugodno vpliva na vezavo z ER.



Slika 12: Farmakofor E2 (prirejeno po 69)

4.2.3 MOŽNA IZPOSTAVITEV RSV IN DERIVATOV

Zanimalo nas je tudi, kakšne plazemske koncentracije RSV in njegovih derivatov so lahko dosežene po zaužitju grozdja in pitju rdečega vina ali pa pri uporabi prehranskih dopolnil. Hoteli smo namreč ovrednotiti relevantnost estrogenskih učinkov, ki smo jih pridobili z našo

raziskavo na celicah kvasovk. Sicer so že dokazali, da je RSV varen do odmerka 5 g/dan (14, 15, 17). Le pri višjih odmerkih, kot sta 2,5 in 5,0 g, so pri nekaterih zdravih prostovoljcih poročali o blagih do zmernih gastrointestinalnih simptomih. Zmanjšanja telesne teže ali resnih neželenih učinkov niso opazili (50). Določen ADI za osebo, težko 60 kg, je 450 mg/dan, kar je visoko nad naravnim vnosom RSV preko hrane (17, 19). Povprečne koncentracije v vinu so 10–30 μM (18, 37). V različnih sortah rdečega vina ga je več, medtem ko ga je v sortah belega vina zaradi samega postopka pridobivanja precej manj (15, 22). Prehranska dopolnila pa vsebujejo 50 do 500 mg *trans*-RSV (17). Po enem odmerku 25 mg/70 kg je plazemska koncentracija dosegla vrh pri 5 ng/mL oziroma 0,22 μM , in sicer 30 min po aplikaciji (15, 24). Potemtakem bi prehransko dopolnilo z 200 mg RSV na tableto (kot je na primer na slovenskem trgu prehransko dopolnilo Resveratrol-forte®) doseglo najvišjo serumsko koncentracijo pri 40 ng/L ali 1,76 μM . 20 μM koncentracija rdečega vina pa bi pri 250-mL kozarcu za 70 kg težkega človeka prav tako predstavljala 200 mg vnosa RSV. Vendar je biološka uporabnost večja pri vinu in grozdnem soku v primerjavi s prehranskimi dopolnili (15). Zato bodo serumske koncentracije nekoliko višje pri zaužitju 200 mg RSV v vinu kot 200 mg RSV v prehranskem dopolnilu. Zaključimo lahko, da so koncentracije po *per os* aplikaciji RSV v obliki prehranskega dopolnila ali po enem kozarcu rdečega vina še vedno pod koncentracijam, ki smo jim izmerili estrogenske učinke.

4.2.4 PRIMERJAVA RSV IN ZMP ANALOGOV NA DELOVANJE NA STEROIDNE RECEPTORJE

Test YES smo izvedli zaradi že dokazanih učinkov RSV in njegovih derivatov na GR in AR v *in vitro* presejalnem luciferaznem testu na celicah MDA-kb2. Sicer se testna sistema razlikujeta, v testu YES smo imeli celice kvasovk, v luciferaznem testu pa so uporabljali človeške epiteljske celice raka dojke. Oba testa vsebujeta funkcionalne endogene steroidne receptorje. Čeprav so se naše začetne koncentracije močno razlikovale v primerjavi z najvišjimi necitotoksičnimi za MDA-kb2, smo z redčitvijo vzorcev v testu YES prišli do enakega koncentracijskega območja kot pri luciferaznem testu, ki je 10–25 μM (52, 53). Rezultati o vezavi testiranih spojin z ER so pokazali drugačen vrstni red. Pri 25 μM sta spojini ZMP-24 in RSV pokazali najvišjo jakost na AR in GR, medtem ko sta ZMP-15 pri 15,2 μM in ZMP-20 pri 31,0 μM pokazali najvišjo jakost delovanja na ER. Ostale spojine ZMP in RSV niso dosegle estrogenih učinkov v koncentracijskem območju od 10 do 25 μM . Vendar so skoraj vse spojine (z izjemo ZMP-23) izkazale androgeno in glukokortikoidno delovanje že v koncentracijah 10–25 μM . Razlika v vezavi, ki se kaže, je, da se spojine z eno hidroksilno

skupino lažje vežejo z ER kot spojine z dvema hidroksilnima skupinama na obroču A, pri vezavi z AR in GR pa je ravno obratno. Meta razporeditev hidroksilnih spojin na obročih, ki jo imata ZMP-24 in RSV, je najustreznejša za vezavo z AR in GR. Podobnost v vezavi s steroidnimi receptorji opazimo pri metiliranju hidroksilnih skupin, ki tako pri vezavi z ER kot pri vezavi z GR in AR zmanjša vezavno afiniteto. Najnižje androgeno delovanje je imela spojina ZMP-25 s tremi metoksi skupinami. Le spojina ZMP-23, ki ima prav tako tri metoksi skupine, ni pokazala glukokortikoidnega delovanja, a je vseeno imela androgeno in estrogno delovanje. Za vse spojine ZMP in RSV velja, da nimajo antiglukokortikoidnega ali antiandrogenega delovanja. Antiestrogenosti nismo mogli določiti v testu YES, kar je tudi ena od pomanjkljivosti tega testa. Antiestrogeno aktivnost lahko test YES pokaže celo kot agonistično.

Povzamemo lahko, da je pri interpretaciji rezultatov potrebna previdnost zaradi naslednjih razlogov. Prvič, tako test YES kot tudi luciferazni test določata EA le z upoštevanjem vezave s steroidnimi receptorji. Vendar pa kot vemo, lahko okoljska kemikalija zmoti hormonski sistem tudi preko drugih mehanizmov (5, 22). RSV in ostali analogi bi potencialno lahko interferirali v sintezi hormonov, hormonskih receptorjev ali pa bi kako drugače motili endokrini sistem (6, 8). Drugič je nujno upoštevati, da test YES obravnava EA na kvasovkah in ne na človeških celičnih linijah, razliko v obeh sistemih smo opisali že v podpoglavju Modelni sistem/testni organizem. Zadnje dejstvo, ki ga moramo upoštevati, je, da so dosežene plazemske koncentracije z vnosom prehranskih dopolnil (1,76 μM) še vedno pod koncentracijami, ki izkazujejo učinke na hormonski sistem pri kvasovkah ($> 15 \mu\text{M}$). Zato bo za dokončno oceno o motnji hormonskega delovanja potrebna izvedba *in vivo* študij, ki upoštevajo še dodatne dejavnike, kot sta metabolizem RSV in analogov in njihova akumulacija v telesu (20, 21).

5 SKLEP

Pri RSV je že bila dokazana motnja hormonskega sistema, ugotovili so koncentracijsko odvisnost moduliranja ER. O analogih RSV, predvsem pa o njihovem delovanju na estrogenski sistem še ni znanih veliko informacij. Zanimalo nas je, kako se bodo RSV in njegovi 1,2,4-oksadiazolni analogi obnašali na hER v kvasovkah v koncentracijskemu območju 10–25 μM .

Po izvedbi eksperimentov in preučitvi rezultatov smo prišlo do naslednjih ugotovitev:

- Spojine ZMP in RSV predstavljajo nizko citotoksičnost za kvasovke, saj šele v višjih koncentracijah delujejo na njih negativno. V koncentracijah, ki smo jih uporabili pri izvedbi testa YES (ZMP-15 243,9 μM , ZMP-17 392,9 μM , ZMP-20 495,6 μM , ZMP-21 396,9 μM , ZMP-23 207,5 μM , ZMP-24 208,7 μM , ZMP-25 181,9 μM , RSV 438,1 μM) so zaviranje rasti povzročile spojine ZMP-15 nad 61,0 μM , ZMP-17 nad 98,2 μM in ZMP-20 nad 62,0 μM . Koncentracij, kjer je bilo preživetje kvasovk manjše od 50 %, nismo vključili v nadaljnje vrednotenje estrogenosti. Zaključimo lahko, da so kvasovke primeren organizem za raziskovanje EA RSV in njegovih analogov.
- Najvišjo EA imata ZMP-15 in ZMP-20 v koncentracijskem območju, ki je enak, kot so ga proučevali za glukokortikoidno in androgeno aktivnost. Tako je spojina ZMP-15 pri 15,2 μM pokazala 92,8 % REA in ZMP-20 pri 31,0 μM 95,0 % REA. V mnogo višjih koncentracijah so aktivnost β -galaktozidaze pokazale tudi ostale spojine. ZMP-24 je pri 208,7 μM imela 34,5 % vrednost REA, ZMP-21, ZMP-23, ZMP-25 in RSV pa so le v najvišjih merjenih koncentracijah pokazale nekajodstotno vrednost REA. Izjema je bil analog ZMP-17, saj je deloval citotoksično v višjih koncentracijah, v nižjih koncentracijah pa ni izkazoval EA.
- Na vezavo z ER vplivajo vrsta, število in razporeditev funkcionalnih skupin ter distančnik med aromatskima obročema. Za idealno vezavo sta se izkazali dve hidroksilni skupini na določeni razdalji, ena na obroču A in druga na obroču B. Prisotnost dveh hidroksilnih skupin na obroču A občutno zmanjša EA. Še bolj negativno prispeva metiliranje hidroksilnih skupin na vseh pozicijah.

Na osnovi rezultatov, pridobljenih s testom YES, lahko ovrednotimo hipoteze, ki smo si jih zastavili na začetku raziskovalnega dela:

1. Potrdimo lahko hipotezo, da imajo RSV in analogi ZMP nizko citotoksičnost na kvasovkah.
2. Delno potrdimo hipotezo, da se RSV in analogi ZMP vežejo z ER zaradi strukturne podobnosti z DES.
3. Potrdimo hipotezo, da imajo analogi ZMP z metoksi skupino na fenilnih obročih nižjo EA v primerjavi z analogi z nesubstituirano hidroksilno skupino.
4. Potrdimo hipotezo, da se učinki na ER razlikujejo med analogi ZMP zaradi strukturnih modifikacij.

S presejalnim testom YES smo pridobili informacije o delovanju RSV in njegovih potencialnih analogov na hER. Koncentracije, ki kažejo estrogenost, v realnosti niso dosegljive z vnosom prehranskih dopolnil. Vendar zaradi tega še ne moremo zaključiti, da spojine ne spadajo med HM, kar pa bi nedvoumno potrdili še z uporabo testov *in vivo*.

6 LITERATURA

1. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman. 5th ed.
2. Miller WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine reviews* 9 (3):295–318
3. <https://www.britannica.com/science/steroid-hormone> [navedeno: 10.12.2016]
4. Bjornstrom L, Sjoberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (4):833–42
5. Hall JM, Couse JF, Korach KS. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 276 (40):36869–72
6. Amaral Mendes JJ. 2002. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 40 (6):781–88
7. Safe SH. 1995. Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environmental Health Perspectives* 103 (4):346–51
8. McLachlan JA. 2016. Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond. *Andrology* 4 (4):684–94
9. Patisaul HB, Jefferson W. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in neuroendocrinology* 31 (4):400–19
10. Griffiths K, Wilson D, Singh R, Meester FD. 2014. Effect of dietary phytoestrogens on human growth regulation: imprinting in health & disease. *The Indian Journal of Medical Research* 140 (Suppl 1):82–90
11. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. 2002. Postmenopausal Hormone Replacement Therapy. *JAMA* 288 (7):872–81
12. Brynhildsen J. 2014. Combined hormonal contraceptives: prescribing patterns, compliance, and benefits versus risks. *Therapeutic advances in drug safety* 5 (5):201–13
13. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, et al. 2006. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA* 295 (23):2727–41
14. Udenigwe CC, Ramprasath VR, Aluko RE, Jones PJH. 2008. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition reviews* 66 (8):445–54

15. Kursvietiene L, Staneviciene I, Mongirdiene A, Bernatoniene J. 2016. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 52 (3):148–55
16. Baur JA, Sinclair DA. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews. Drug discovery* 5 (6):493–506
17. Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J. 2009. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (9):2170–82
18. Gusman J, Malonne H, Atassi G. 2001. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* 22 (8):1111–17
19. Edwards JA, Beck M, Riegger C, Bausch J. 2011. Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida((R)). *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215:131–37
20. Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, Saiko P, Jager W. 2010. Resveratrol and resveratrol analogues--structure-activity relationship. *Pharmaceutical research* 27 (6):1042–48
21. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcao A, Soares E, Costa R, et al. 2009. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Molecular nutrition & food research* 53 Suppl 1:7–15
22. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. 2000. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141 (10):3657–67
23. Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. 2004. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 82 (2):614–19
24. Erdogan CS, Vang O. 2016. Challenges in Analyzing the Biological Effects of Resveratrol. *Nutrients* 8 (6):353–82
25. Ovesna Z, Horvathova-Kozics K. 2005. Structure-activity relationship of trans-resveratrol and its analogues. *Neoplasma* 52 (6):450–55
26. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, JR, Walle UK. 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32 (12):1377–82
27. Das DK, Maulik N. 2006. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Molecular interventions* 6 (1):36–47

28. Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, et al. 2008. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS one* 3 (6):2264–74
29. Bishayee A. 2009. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 2 (5):409–18
30. Deng J-Y, Hsieh P-S, Huang J-P, Lu L-S, Hung L-M. 2008. Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol-stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and -independent pathways. *Diabetes* 57 (7):1814–23
31. Su H-C, Hung L-M, Chen J-K. 2006. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 290 (6):1339–46
32. Robb EL, Stuart JA. 2011. Resveratrol interacts with estrogen receptor-beta to inhibit cell replicative growth and enhance stress resistance by upregulating mitochondrial superoxide dismutase. *Free radical biology & medicine* 50 (7):821–31
33. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RHF, et al. 2004. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 287 (4):774–83
34. Lee M, Kim S, Kwon O-K, Oh S-R, Lee H-K, Ahn K. 2009. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *International immunopharmacology* 9 (4):418–24
35. Mobasheri A, Shakibaei M. 2013. Osteogenic effects of resveratrol in vitro: potential for the prevention and treatment of osteoporosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1290:59–66
36. Hurley LL, Akinfiresoye L, Kalejaiye O, Tizabi Y. 2014. Antidepressant effects of resveratrol in an animal model of depression. *Behavioural brain research* 268:1–7
37. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25):14138–43
38. Levenson AS, Gehm BD, Pearce ST, Horiguchi J, Simons LA, et al. 2003. Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER alpha. *International journal of cancer* 104 (5):587–96
39. Pozo-Guisado E, Lorenzo-Benayas MJ, Fernandez-Salguero PM. 2004. Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-

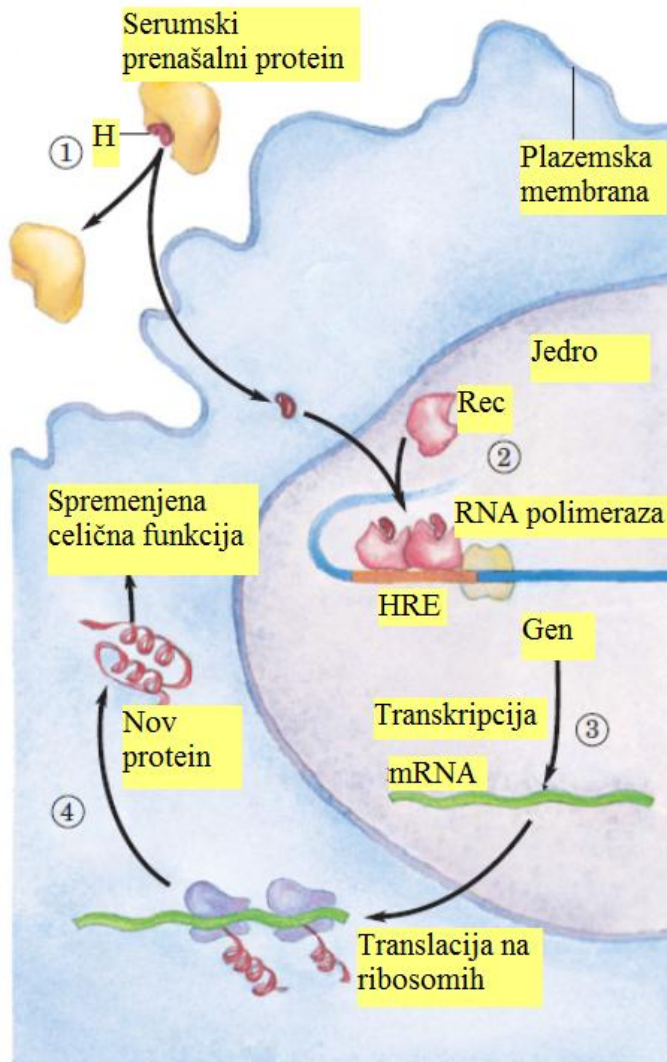
- dependent mechanism: relevance in cell proliferation. *International journal of cancer* 109 (2):167–73
40. Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Dougherty SM. 2008. Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor alpha-Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (7):2185–97
 41. Benitez DA, Pozo-Guisado E, Clementi M, Castellon E, Fernandez-Salguero PM. 2007. Non-genomic action of resveratrol on androgen and oestrogen receptors in prostate cancer: modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *British journal of cancer* 96 (10):1595–604
 42. Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL, et al. 2005. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 280 (9):7460–68
 43. Turner RT, Evans GL, Zhang M, Maran A, Sibonga JD. 1999. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology* 140 (1):50–54
 44. Hsieh TC, Wu JM. 1999. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Experimental cell research* 249 (1):109–15
 45. Dai Y, Ngo D, Forman LW, Qin DC, Jacob J, Faller DV. 2007. Sirtuin 1 is required for antagonist-induced transcriptional repression of androgen-responsive genes by the androgen receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (8):1807–21
 46. Shi W-f, Leong M, Cho E, Farrell J, Chen H-c, Tian J, Zhang D. 2009. Repressive effects of resveratrol on androgen receptor transcriptional activity. *PloS one* 4 (10):7398–408
 47. Harada N, Murata Y, Yamaji R, Miura T, Inui H, Nakano Y. 2007. Resveratrol down-regulates the androgen receptor at the post-translational level in prostate cancer cells. *Journal of nutritional science and vitaminology* 53 (6):556–60
 48. Mitchell SH, Zhu W, Young CY. 1999. Resveratrol inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer research* 59 (23):5892–95
 49. Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. 2002. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *The Journal of nutrition* 132 (2):257–60

50. Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, et al. 2010. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer research* 70 (22):9003–11
51. Fulda S. 2010. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug discovery today* 15 (17-18):757–65
52. Račnik Š. 2014. *Določanje vpliva resveratrola in njegovih analogov na glukokortikoidne receptorje*. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
53. Črešnjovec K. 2015. *Vpliv resveratrola in njegovih analogov na aktivnost androgenih receptorjev, izraženih na celicah MDA-kb2*. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
54. Kinnberg K. 2003. *Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment*. Working report, University of Southern Denmark
55. Le TAH. *The YES assay as a tool to analyse endocrine disruptors in different matrices in Vietnam*. Doktor der Agrarwissenschaften, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
56. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=752629943> [navedeno 20.11.2016]
57. Sanders ER. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Volume Transfers with Serological Pipettes and Micropipettors. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (63):2754–66
58. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. 2009. In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Current Chemical Genomics* 3:33–41
59. <http://www.biologydiscussion.com/cell/cytotoxicity/cell-viability-and-cytotoxicity-5-assays/10557> [navedeno: 6.1.2017]
60. <https://cdn.auckland.ac.nz/assets/engineering/about/our-research/images/iande/cl-iande-estrogen-receptor1.jpg> [navedeno: 29.1.2017]
61. Beck I-C, Bruhn R, Gandrass J. 2006. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere* 63 (11):1870–78
62. Routledge EJ, Sumpter JP. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 15 (3):241–48
63. Bistan M, Podgorelec M, Marinšek Logar R, Tišler T. Yeast estrogen screen assay as a tool for detecting estrogenic activity in water bodies. *Food Technol Biotechnol* 50(4):427–33

64. https://www.novusbio.com/products/beta-galactosidase-kit_nbp2-29547 [navedeno: 5.12.2016]
65. Legler J, Dennekamp M, Vethaak AD, Brouwer A, Koeman JH, van der Burg B, Murk AJ. 2002. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *The Science of the total environment* 293 (1-3):69–83
66. Lappano R, Rosano C, Madeo A, Albanito L, Plastina P, et al. 2009. Structure-activity relationships of resveratrol and derivatives in breast cancer cells. *Molecular nutrition & food research* 53 (7):845–58
67. Tong W, Perkins R, Xing L, Welsh WJ, Sheehan DM. 1997. QSAR models for binding of estrogenic compounds to estrogen receptor alpha and beta subtypes. *Endocrinology* 138 (9):4022–25
68. Gao H, Katzenellenbogen JA, Garg R, Hansch C. 1999. Comparative QSAR Analysis of Estrogen Receptor Ligands. *Chem. Rev.* 99 (3):723–44
69. Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. 1997. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 62 (3):268–303

7 PRILOGE

7.1 Genska ekspresija steroidnih hormonov



① Hormon (H) difuzno prehaja plazemsko membrano in se veže na specifični receptor (Rec) v jedru.

② Vezava hormona spremeni konformacijo Rec; tvori homo/heteromere in se veže na hormonsko odzivne elemente (HRE) v DNA.

③ Rec s pomočjo koaktivatorja ali korepresorja regulira transkripcijo bližnjega gena, kar poveča ali zmanjša hitrost nastajanja mRNA.

④ Sprememba hormonsko uravnanega genskega produkta povzroči celični odziv na hormon.

Slika 13: Splošni mehanizem regulacije genske ekspresije preko steroidnih hormonov (prirejeno po 1)