

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA TOPORIŠ
MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA TOPORIŠ

IN SILICO VREDNOTENJE ENDOKRINIH UČINKOV IZBRANIH NARAVNIH
POLIFENOLOV

IN SILICO EVALUATION OF ENDOCRINE EFFECTS OF SELECTED NATURAL
POLYPHENOLS

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, izr. prof. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za vso strokovno pomoč, svetovanje in potrpežljivost pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem ter fantu in prijateljem za vso podporo.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Janja Toporiš

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos

Članica komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

KAZALO VSEBINE

1.	UVOD	1
1.1.	ENDOKRINI SISTEM.....	1
1.1.1.	RECEPTORJI.....	1
1.1.2.	HORMONI	4
1.2.	ENDOKRINI MOTILCI.....	8
1.2.1.	UČINKI NA ORGANIZME.....	8
1.2.2.	DOLOČANJE HORMONSKIH MOTILCEV	10
1.3.	POLIFENOLI.....	11
1.3.1.	ABSORPCIJA, PORAZDELITEV, METABOLIZEM IN IZLOČANJE	11
1.3.2.	BIOLOŠKA UPORABNOST POLIFENOLOV	12
1.4.	IN SILICO METODE	12
1.4.1	IN SILICO METODE NAPOVEDOVANJA ENDOKRINE IN REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI.....	13
2.	NAMEN DELA.....	14
3.	METODE IN MATERIALI	15
3.1.	IZBRANI POLIFENOLI.....	15
3.2.	POZITIVNA IN NEGATIVNA KONTROLA.....	21
3.3.	NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI.....	22
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	24
4.1.	NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI S PROGRAMOM ENDOCRINE DISRUPTOME	24
4.2.	RAZPRAVA	35
4.2.1.	VEZAVA POLIFENOLOV NA JEDRNE RECEPTORJE	35
4.2.2.	OCENA IZPOSTAVLJENOSTI.....	59
5.	SKLEP	63
6.	VIRI IN LITERATURA	65
7.	PRILOGE.....	73
7.1.	Priloga I.....	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Pregled jedrnih receptorjev in njihovih ligandov	2
Preglednica II: Strukture, SMILES kode ter logP izbranih polifenolov	15
Preglednica III: Mejne vrednosti proste energije vezave (kcal mol^{-1}) za specifične receptorje	23
Preglednica IV: Pozitivna in negativna kontrola	24
Preglednica V: Flavonoidi	25
Preglednica VI: Izoflavonoidi	27
Preglednica VII: Mikotoksini	29
Preglednica VIII: Stilbeni	30
Preglednica IX: Halkonoidi	31
Preglednica X: Arilbenzofurani, lignani, pterokarpani, fenoli, ostalo	31
Preglednica XI: In silico napovedane vezavne afinitete polifenolov na estrogenske receptorje in primerjava z eksperimentalno dobljenimi vrednostmi vezavne afinitete	39
Preglednica XII: IC_{50} vrednosti polifenolov na ER	39
Preglednica XIII: Relativne vezavne afinitete flavonoidov na ER	41
Preglednica XIV: Podatki vezave polifenolov na AR (RBA se nanaša na AR agonista, R1881 ([17 α -metil-3H]-metiltrienolon)) (57)	50
Preglednica XV: EC_{50} in relativni proliferacijski učinek polifenolov ter hormona T3 (RPrE% : relativni proliferacijski učinek (razmerje med maksimalno celično rastjo, ki jo povzroči testna spojina in T3- EC_{100} ; EC_{100} : koncentracija, pri kateri je učinek največji)	52
Preglednica XVI: : EC_{50} vrednosti polifenolov za PPAR α/γ (65)	54
Preglednica XVII: Vpliv fitoestrogenov na AhR transaktivacijo (LOEC: najnižja koncentracija, kjer je opazen učinek; MOEC: najnižja koncentracija, kjer je opazen maksimalni učinek)	56
Preglednica XVIII: IC_{50} vrednosti fitoestrogenov na človeške encime placente (ND: inhibicija ni zaznana) (48)	57
Preglednica XIX: Primerjava plazemskih koncentracija med Vzodno in Zahodno populacijo (72, 73, 74)	60
Preglednica XX: Plazemske koncentracije genisteina pri ženskah in dojenčkih (71)	60
Preglednica XXI: Izmerjene maksimalne plazemske koncentracije fitoestrogenov (26)	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Steroidni receptorji (povzeto po 5).....	2
Slika 2: Struktura jedrnih receptorjev (povzeto po 3)	3
Slika 3: Biosinteza androgenov (prirejeno po 8)	6
Slika 4: Biosinteza estrogenov (prirejeno po 8).....	6
Slika 5: Steroidogeneza (prirejeno po 10)	7
Slika 6: Bisfenol A	21
Slika 7: Evgenol.....	22
Slika 8: Primerjava struktur nekaterih polifenolov in estrogena (39)	35
Slika 9: Strukturna primerjava DES in genistena	36
Slika 10: Apigenin (42)	37
Slika 11: 17- β estradiol	37
Slika 12: Prunetin (RBA: 0,0018) (3)	37
Slika 13: Biokanin A (RBA: 0,0043) (40).....	37
Slika 14: Pretvorba daidzeina in genisteina (47)	40
Slika 15: Likviritigenin (40).....	42
Slika 16: Tangeretin	42
Slika 17: Kumestrol.....	43
Slika 18: Floretin (RBA: 0,069%) (42)	43
Slika 19: 4-hidroksihalkon (RBA: 0,0028%) (42)	43
Slika 20: Izomeri gliceolina (56).....	44
Slika 21: Ebenfuran I, II, III (40).....	45
Slika 22: Fenilalanin	45
Slika 23: Matairezinol (40)	45
Slika 24: Sekoizolaricirezinol (40)	45
Slika 25: α -zearalenol (40)	46
Slika 26: α -zearalanol (40)	46
Slika 27: Strukturna primerjava testosterona in genisteina	49
Slika 28: logP v primerjavi z logRBA na AR (57)	50
Slika 29: Struktura T3 (R=H) in T4 (R=I) (61) ter genisteina.....	53
Slika 30: Fenofibrat (64)	54
Slika 31: Daidzein (40)	54
Slika 32: TCDD- agonist	55
Slika 33: GNF351, AhR antagonist (65).....	55
Slika 34: Vloga P450scc pri sintezi glukokortikoidov (povzeto po 70).....	59
Slika 35: Sinteza tiroidnih hormonov (prirejeno po 12)	73

POVZETEK

Polifenoli so najbolj zastopani antioksidanti v naš prehrani, predvsem gre za spojine prisotne v sadju, zelenjavi, žitih, stročnicah, čokoladi ter različnih pijačah, kot so kava, čaj in vino. Kot antioksidanti varujejo celične komponente pred oksidativnim stresom ter tako zmanjšajo nevarnost tveganja za nastanek različnih degenerativnih bolezni. Eksperimentalne študije dokazujejo tudi kardioprotektivno in antikancerogeno delovanje polifenolov. Med drugim delujejo preventivno tudi pri osteoporozi, sladkorni bolezni ter nevrodegenerativnih boleznih. Po drugi strani pa lahko vplivajo na encime, ki sodelujejo pri biosintezi hormonov ali se vežejo na same hormonske receptorje ter tako delujejo kot potencialni endokrini motilci.

Kljub njihovi široki uporabi so zanimanje nutricionistov vzbudili šele v zadnjih nekaj letih. Glavni razlog njihovega poznega raziskovanja je prav kompleksnost njihove kemijske strukture. Polifenoli v prehrani se namreč nahajajo v kompleksnih oblikah, zato so podvrženi obsežnemu metabolizmu. Prav to je vzrok raznoliki biološki uporabnosti teh spojin. Pogosto je prav metabolit izhodnega polifenola tisti, ki je biološko aktiven.

Izbrane polifenole in njihove metabolite smo preučevali s programom Endocrine Disruptome ter napovedali in ovrednotili endokrine učinke izbranih polifenolov. Pri delu smo se osredotočili predvsem na izoflavonoida genistein in daidzein. Slednjima smo namreč izpostavljeni v največji meri preko hrane. Ker sta strukturno zelo podobna endogenemu estradiolu, lahko delujeta tako na estrogenske kot tudi na androgenske receptorje.

Pri preučevanju endokrine toksičnosti smo na podlagi objavljenih *in vitro* ter *in vivo* raziskav predpostavili, da se na estrogenski receptor z največjo afiniteto vežejo mikoestrogeni, sledijo kumestрани, nato flavonoidi in halkanoidi.

Poleg tega smo napovedali tudi selektivno vezavo genisteina na estrogenski receptor β , s čimer lahko utemeljimo različno manifestiranje delovanja izoflavonoidov. Pri vezavi genisteina in daidzeina na androgenski receptor pa smo napovedali največje verjetnosti vezave tako na agonistično kot tudi na antagonistično konformacijo jedrnega receptorja.

S pomočjo programa Endocrine Disruptome smo torej napovedali vezavno afiniteto polifenolov na jedrne receptorje. Dobljeni rezultati so bili precej podobni rezultatom *in vitro* študij. V manjši meri pa so se skladali z rezultati *in vivo* raziskav, saj pri tem nismo upoštevali biološke uporabnosti, zaradi katere se rezultati *in vitro/in silico* rezultatov razlikujejo od tistih *in vivo*. Z našimi rezultati smo potrdili, da obstaja potencialna nevarnost endokrinega delovanja polifenolov, in sicer je posredovana predvsem preko estrogenskih receptorjev.

Kljub izjemnemu doprinosu *in silico* metod pa je na tem področju potreben še nadaljnji razvoj in testiranja, s katerimi bomo lahko zagotavljali večjo zanesljivost podatkov.

ABSTRACT

Polyphenols are the most abundant antioxidative compounds in our diet that can be found in many types of fruit, vegetable, cereals, legumes, chocolate and in different beverages, such as coffee, tea and wine. The health effects of polyphenols depend on the amount consumed and on their bioavailability. Certain studies have subsequently confirmed health benefits of phytoestrogen intake, including a lowered risk of osteoporosis, heart disease and breast cancer. On the other hand, phytoestrogens are frequently considered as endocrine disruptors, indicating that they have the potential to cause adverse health effects as well. They are able to bind to estrogen receptors and, in turn, exert estrogenic or antiestrogenic effects.

In spite of their frequent use, they have only just recently received considerable attention due to their complex chemical structure. Namely, phytoestrogens are ingested predominantly as glycosides, which immediately undergo hydrolysis, further metabolism and/or absorption. Therefore, bioavailability differs considerably between the various polyphenols, and the most abundant polyphenols in our diet are not necessarily those that have the best bioavailability profile. Often phytoestrogens metabolites possess greater biological activity than that of their precursor molecule.

In the scope of this thesis Endocrine Disruptome software was employed to predict the binding affinities of selected polyphenols, as well as those of their metabolites to a number of nuclear receptors. The main focus was on isoflavonoids genistein and daidzein, to which we are predominantly exposed to through food consumption. Due to the structural similarity of isoflavones with estradiol they possess weak estrogenic or androgenic effects.

Based on thorough examination of previously published *in vitro* and *in vivo* studies we established that mycoestrogens have the highest affinity for estrogen receptors, followed by coumestrans, flavonoids and chalcones, that have the lowest binding affinity for nuclear receptor. In addition, there has been receptor selectivity for genistein predicted for estrogen receptor β , which might explain the differences in exerting effects of phytoestrogens.

We have also predicted the highest binding affinity for genistein and daidzein of all examined polyphenols for agonistic and antagonistic conformation of estrogen receptor.

Predictions for binding affinities of selected polyphenols and metabolites to nuclear receptors made by Endocrine Disruptome were quite similar to those, previously obtained in *in vitro* studies. Nevertheless, our results were not completely in agreement with those obtained in *in vivo* studies. This is due to poor bioavailability of phytoestrogens, which is reflected in differences between *in vivo* and *in vitro/in silico* results.

We can also confirm the existence of potential for endocrine toxicity, which is predominantly caused by estrogen and androgen receptors.

Despite a remarkable contribution of *in silico* methods as a practical tool for the prediction of the endocrine disrupting potential, further development of software is still needed to be able to produce reliable and accurate results.

SEZNAM OKRAJŠAV

Δ_4	4-androsten-3,17-dion
4OHPB	4-hidroksi-1-propenilbenzen
17 β -HSD	17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza
ACTH	adrenokortikotropni hormon
ADME	absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje, toksičnost
AF1,2	koaktivacijsko vezavno mesto
AhR	arilni ogljikovodikov receptor
AR	androgenski receptor
AUC	površina pod krivuljo
cAMP	ciklični adenozinmonofosfat
CAR	konstitutivni androstanski receptor
CYP450	citokrom P450
DES	dietilstilbestrol
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHEA-S	dehidroepiandrosteron sulfat
DHT	5- α -dihidrotestosteron
DIT	3,5-dijodotirozin
DNA	deoksirobonukleinska kislina
DoTS	Docking interface for Target Systems
E1	estron
E2	estradiol
EC ₅₀	koncentracija agonista, ki izzove polovico maksimalnega učinka
EDTA	Endocrine Disrupter Testing and Assessment
ER (α , β)	estrogenski receptor (α , β)
ERE	estrogenski odziven element
FXR	farnesoidni receptor
GL	luteinske celice granuloze
GR	glukokortikoidni receptor
GRIP1	koregulator
HM	hormonski motilci
HRE	hormonsko odzivni element
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja, pri kateri se učinek zmanjša za polovico

LBD	domena za vezavo liganda
LXR α , β	jetrni X receptor
MIT	3-monojodotirozin
MR	mineralokortikoidni receptorji
NOAEL	najvišji odmerek, pri katerem ni prišlo do opaznih neželenih učinkov
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj)
PPAR α , β , γ	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor (α , β , γ)
PR	progesteronski receptor
(Q)SAR	(Quantitative) structure–activity relationship ((kvantitativno) razmerje med strukturo in aktivnostjo)
RAR	receptor za retinojsko kislino
RBA	relativna vezavna afiniteta
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij)
ROC	Receiver Operating Characteristics
ROS	reaktivne kisikove spojine
RXR α	retinoidni X receptor α
SERM	modulatorji estrogenskega receptorja
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
SXR	steroidni X receptor
T _{0a}	tironamin
T _{1a}	jodotironamin
T ₃	trijodotironin
T ₄	L-tiroksin
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo- <i>p</i> -dioksin
Tg	tiroglobulin
TH	tiroidni hormon
TPO	tiroperoksidaza
TR α , β	tiroidni receptor α , β
TRE	tiroidni odzivni element
VDR	receptor za vitamin D

1. UVOD

1.1. ENDOKRINI SISTEM

Endokrini sistem sestavljajo žleze, katerih namen je izločanje hormonov v krvni obtok. Leti po vezavi na ustrezen receptor lahko delujejo na bližnja tkiva ali pa s kroženjem po krvožilnem sistemu vplivajo na delovanje oddaljenih tkiv in organov. Glavne žleze endokrinega sistema so hipofiza, hipotalamus, ščitnica, obščitnice, nadledvične žleze, Langerhansovi otočki trebušne slinavke, testisi ter ovariji. Z regulacijo telesnih funkcij ter funkcij organov so te žleze odgovorne za vzdrževanje homeostaze v telesu. Številni procesi v telesu so hormonsko nadzorovani, kot na primer celični metabolizem, reprodukcija, spolni razvoj, homeostaza sladkorja in mineralov ter prebava (1).

1.1.1. RECEPTORJI

Proteini, na katere se selektivno vežejo hormoni ali drugi topni fiziološki mediatorji, so lahko locirani na celični membrani ali pa znotraj celice, v citoplazmi ali v samem celičnem jedru. Po stiku z določenim mediatorjem pride do konformacijske spremembe, s čimer se poveča število intermolekularnih interakcij med receptorjem in prenašalcem ter posledično do specifičnega fiziološkega odgovora. Vezava hormona na receptor je reverzibilna (2).

Hormoni delujejo le na specifične tipe celic, v katerih so prisotni njihovi receptorji. V nekaterih primerih lahko en sam hormon vpliva na različne tipe receptorjev (2).

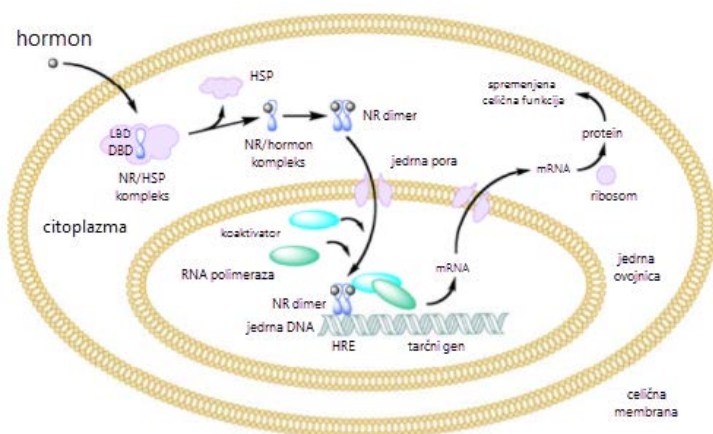
Ob dolgotrajni in pretirani izpostavljenosti pride do tako imenovane desenzibilizacije receptorjev, torej do upada števila receptorjev. Nasprotno, pa redka stimulacija receptorjev povzroči povečanje njihovega števila (3).

1.1.1.1. JEDRNI RECEPTORJI

Jedrni receptorji so z ligandi aktivirani transkripcijski dejavniki, ki sodelujejo pri uravnavanju izražanja genov (Preglednica I). Nekateri od njih se nahajajo v citosolu celice in se šele po vezavi liganda translocirajo v celično jedro (npr. steroidni receptorji (Slika 1)). Med jedrne receptorje prištevamo steroidne receptorje (to so estrogenski in 3-ketosteroidni receptorji), receptorje za tiroidne hormone, receptorje za vitamin D in vitamin A (retinojska kislina) (3).

Preglednica 1: Pregled jedrnih receptorjev in njihovih ligandov (4)

IME RECEPTORJA	LIGAND
tiroidni receptor	trijodotironin
receptor retinojske kisline	retinojska kislina
s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor α	polinenasičene maščobne kisline (PUFA), eikozanoidi, levkotrien B4 (LTB ₄), oleiletanolamid
s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor β/δ	nenasičene maščobne kisline, karbaprostaciklini, komponente VLDL
s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor γ	prostaglandin J2 (PGJ ₂), PUFA, lizofosfatidna kislina
z RAR povezan receptor sirota	holesterol
jetrni X receptor	oksisteroli
farnezoidni X receptor	žolčne kisline, lanosterol
receptor vitamina D	1,25-dihidroksihoлекаlciferol
pregnanski X receptor	pregnani, litoholna kislina
steroidni X receptor	kortikosteron
konstitutivni androstanski receptor	androgenol, androstenal
hepatocitni jedrni faktor 4α	maščobne kisline
retinoidni X receptor	9- <i>cis</i> -retinojska kislina, dokozaheksaenojska kislina
estrogenski receptor α	estradiol
estrogenski receptor β	estradiol, fitoestrogeni, 5 α -androstan-3 β ,17 β diol
androgenski receptor	dihidrotestosteron (DHT), testosteron
glukokortikoidni receptor	kortizol
mineralokortikoidni receptor	aldosteron, kortizol
progesteronski receptor	progesteron



Slika 1: Steroidni receptorji (povzeto po 5)

1.1.1.2. STRUKTURA JEDRNIH RECEPTORJEV

Jedrni receptorji so monomerni proteini, sestavljenih iz štirih domen, od katerih je najbolj heterogena N-terminalna domena. Slednja vsebuje koaktivacijsko vezavno mesto AF1 (activation function 1), ki se veže na ostale transkripcijske dejavnike ter tako modificira aktivnost receptorja. Domena, ki omogoča prepoznavanje in vezavo na DNA, se imenuje jedrna domena (Slika 2). Sestavljata jo dva cinkova prsta; par cistein na enem koncu ter par histidin na drugem koncu enote se vežeta na isti Zn^{2+} ion, zato se vmesna veriga aminokislin posledično izviha in tvori zanko. Glavna funkcija jedrne domene je njena vezava na hormonsko odzivne elemente (HRE; angl. hormone response elements), in sicer gre za nukleotidno zaporedje v promotorski regiji gena. Vezava jedrnih receptorjev (jedrne domene) na HRE je odločilnega pomena za regulacijo transkripcije genov. Poleg tega sodeluje jedrna domena tudi pri dimerizaciji jedrnega receptorja. Domena, odgovorna za dimerizacijo receptorja z ostalimi jedrnimi receptorji, ter vezavo DNA v različnih konfiguracijah, pa je sklepna regija (angl. hinge region). Znotraj zadnje, C-terminalne domene, pa se nahajata specifično vezavno mesto za ligand in dobro ohranjeno koaktivacijsko vezavno mesto AF2 (activation function 2) (2).



Slika 2: Struktura jedrnih receptorjev (povzeto po 3)

1.1.1.3. KLASIFIKACIJA JEDRNIH RECEPTORJEV

Jedrne receptorje lahko v grobem razdelimo na tri razrede, in sicer dva glavna razreda (I in II) ter hibridni razred, ki predstavlja podvrsto receptorjev razreda II.

- Predstavniki jedrnih receptorjev razreda I so steroidni receptorji (glukokortikoidni (GR) in mineralokortikoidni (MR) receptorji), estrogenski receptorji (ER), progesteronski receptorji (PR) ter androgenski receptorji (AR). Ti receptorji se ob odsotnosti liganda nahajajo v citosolu, in sicer so vezani na proteine (npr. na proteine toplotnega šoka) ali na elemente citoskeleta. Po vezavi liganda na te receptorje se tvorijo homodimeri, ki se translocirajo v jedro, kjer nato pride bodisi do aktivacije ali represije tarčnih genov (2).

- Nekoliko drugače pa delujejo jedrni receptorji razreda II, njihovi ligandi so namreč v celicah prisotni lipidi. K tem receptorjem prištevamo receptor PPAR (s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor), receptor LXR (jetrni X receptor), receptor za žolčne kisline FXR (farnesoidni receptor), receptor za ksenobiotike SXR ter konstitutivni androstanski receptor CAR. Ti se nahajajo v heterodimerni obliki, pri čemer enega od monomerov vedno predstavlja retinoidni receptor (RXR). Pri tvorbi heterodimerne strukture lahko nastane nepermisivni heterodimer, katerega lahko aktivira le ligand RXR ali permisivni heterodimer, katerega aktivacijo omogočata bodisi ligand RXR ali ligand partnerskega monomera (2).
- Pomembno vlogo pri endokrini signalizaciji imajo tudi predstavniki hibridnega razreda, med katere uvrščamo receptorje za tiroidne hormone (TR), receptor za vitamin D (VDR) ter receptor za retinojsko kislino (RAR). Gre za podvrsto receptorjev razreda II, saj tvorijo heterodimere z receptorjem RXR. Kljub temu pa jih uvrščamo v svojo skupino, saj so pri endokrini signalizaciji izrednega pomena (2).

1.1.2. HORMONI

Hormoni so molekule endokrinega izvora, ki se s krvjo ali zunajcelično tekočino prenašajo do tarčnih tkiv in organov, kjer sprožijo določen fiziološki učinek. Učinkoviti so lahko le v primeru pravilne vezave na specifične receptorje. Vplivajo na enega ali več različnih tipov celic, kjer lahko delujejo agonistično, antagonistično, kot delni agonisti ter kot mešani agonisti in antagonisti (1).

V primeru motenj endokrinega sistema, kot je na primer premajhno ali preveliko izločanje hormonov, lahko pride do pojava bolezni ali celo do življenjsko nevarne situacije. Prav zaradi tega mora biti koncentracija hormonov v krvi ves čas ustrezno uravnana. Odvisna je namreč od hitrosti nastajanja hormonov, njihove hitrosti porazdeljevanja v tarčne celice ter hitrosti razgradnje. Sistem je v telesu dobro reguliran, in sicer preko negativnih in pozitivnih povratnih zank ter tudi nekaterih drugih mehanizmov. Biološka razpolovna doba hormonov je zelo kratka. Ko se sprostijo iz celice, postanejo le-ti manj aktivni ali celo neaktivni ter se nato preko urina ali blata izločijo (6).

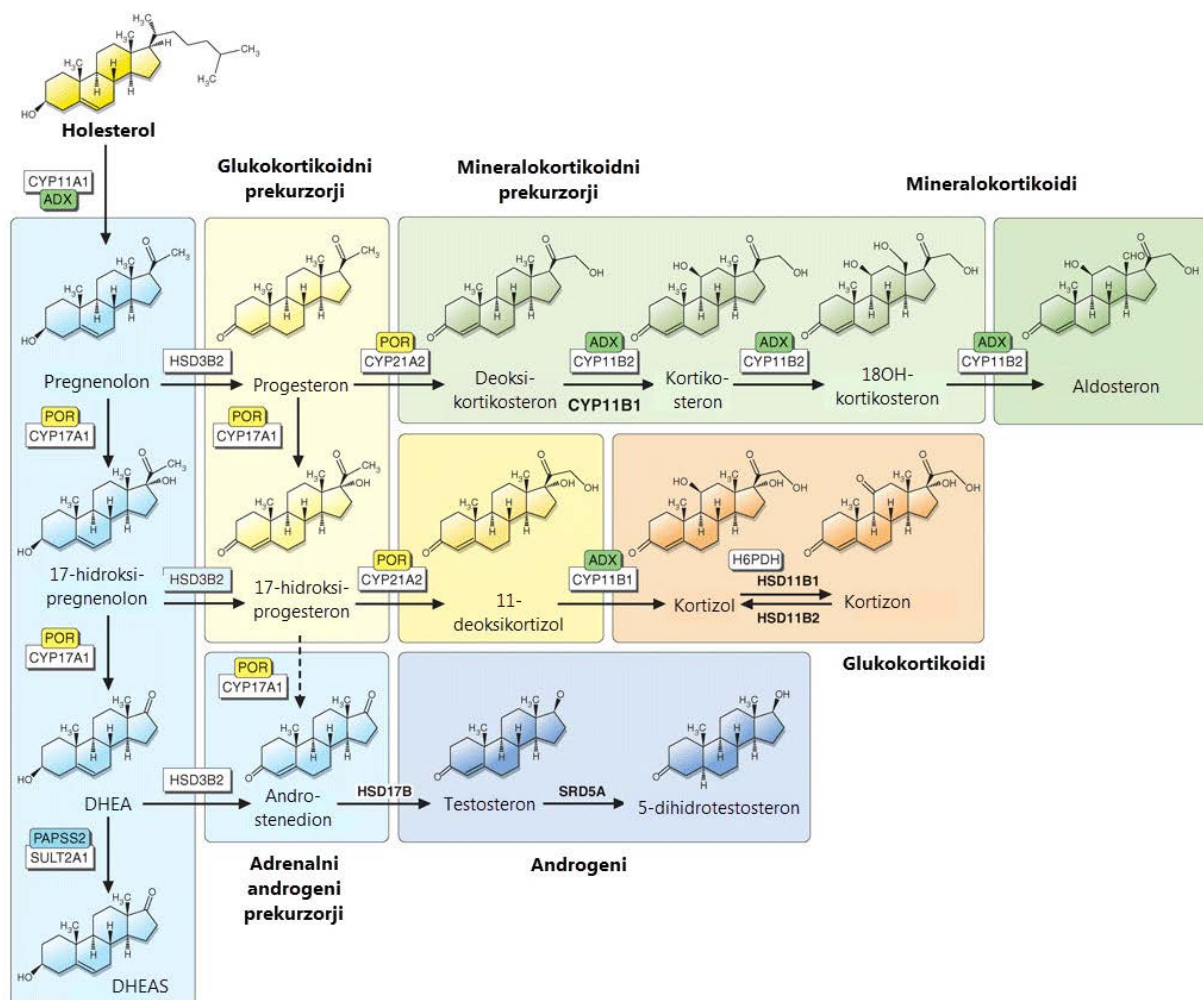
Hormone iz strukturnega vidika delimo na več razredov, in sicer na derivate s steroidnim ogrodjem (estrogen, aldosteron, kortizol, testosteron), aminokislinske derivate (adrenalin, noradrenalin, tiroksin, trijodotironin) ter polipeptide in proteine (antidiuretični hormon, glukagon, folikle stimulirajoči hormon, luteinizirajoči hormon, rastni hormon, inzulin, oksitocin, prolaktin, tiroidni hormon, tiotropin ter tiroliberin). Biološki učinki hormonov pa se izrazijo že pri zelo nizkih koncentracijah, in sicer od 10 pM do 10^{-1} μ M) (7).

1.1.2.1. BIOSINTEZA ANDROGENOV IN ESTROGENOV V STEROIDOGENIH TKIVIH

Biosinteza androgenov poteka pri moških v testisih, natančneje v Leydigovih celicah ali v retikularni coni nadledvične žleze. Pri ženskah je sinteza teh hormonov mnogo manj intenzivna, kljub temu pa poteka njihova biosinteza v nadledvični žlezi, v jajčnikih ter v času nosečnosti tudi v placenti. Encime, potrebne za njihovo biosintezo, aktivira luteinizirajoči hormon. Sinteza androgenov z največjo afiniteto do AR, kot sta testosteron in 5- α -dihidrotestosteron (DHT), poteka preko pregnenolona (Slika 3) (8).

Biosintezo estrogenov pa aktivirata tako luteinizirajoči kot tudi folikle stimulirajoči hormon. Androstendion namreč prehaja bazalne membrane celic jajčnikovih foliklov in se s pomočjo encima 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza (17 β -HSD) pretvori v testosteron (8). S pomočjo aromataze nastaneta iz prekursorskih androgenov estron ter aktivna oblika hormona – estradiol, in sicer po oksidativni odstranitvi C19-metilne skupine ter po aromatizaciji obroča A (Slika 4). Slednja poteka v celicah granuloze jajčnikov, delno pa tudi v skorji nadledvične žleze ter v Sertolijevih celicah mod (8). Zaradi lipofilnega značaja se steroidni hormoni prenašajo po krvi v sulfatirani obliki (dehidroepiandrosteron (DHEA), estron), ali pa so vezani na globuline, namenjene vezavi spolnih hormonov (testosteron, estradiol), oziroma na albumin. Ko dosežejo tarčno tkivo oz. organ, se s pomočjo steroid-sulfataze odstrani sulfatni del celotnega kompleksa (8).

proteinov v jedru (transaktivacija) ter zavre izražanje vnetnih proteinov v citosolu, in sicer s preprečeno translokacijo ostalih transkripcijskih faktorjev iz citosola v jedro (transekspresija). Glukokortikoidi, katerih najpomembnejši predstavnik je kortizol (Slika 5), regulirajo številne kardiovaskularne, metabolične, imunogene ter homeostazne funkcije (9).



Slika 5: Steroidogeneza (prirejeno po 10)

1.1.2.3. SINTEZA TIROIDNIH HORMONOV

Tiroidna hormona trijodotironin (T3) in njegov prohormon L-tiroksin (T4), katerih sinteza poteka v ščitnici, sta primarno odgovorna za regulacijo metabolizma. Prav tako vplivata na sintezo proteinov ter sodelujeta pri regulaciji rasti dolgih kosti, vplivata na razvoj živčnega sistema ter povečujeta občutljivost telesa na kateholamine (adrenalin) (11).

Jod je nepogrešljiva komponenta tiroidnih hormonov, predstavlja namreč kar 65% mase T4 in 58% mase T3. Po vnosu se jod absorbira skozi tanko črevo, čemur sledi transport v

plazmo, nato pa vse do ščitnice. Tam se koncentrira in oksidira, pri čemer sodeluje encim tiroperoksidaza (TPO). Nato se vključi v tiroglobulin (Tg), nastaneta pa tudi 3-monojodotirozin (MIT) in 3,5-dijodotirozin (DIT) ter navsezadnje tudi T4 in T3 (Slika 36 v Prilogi I). Po določenem času kopičenja v foliklih ščitnice je Tg podvržen proteolizi, nastali hormoni pa se sprostijo v krvni obtok, kjer s pomočjo specifičnih vezavnih proteinov dosežejo tarčno tkivo (11).

Glavna oblika hormona v krvnem obtoku je tiroksin T4, ki ima daljši razpolovni čas kot T3. Pri človeku je razmerje med T4 in T3 14:1. T4 se v celici s pomočjo encima dejodinaze pretvori do aktivne oblike T3. Sledita še koraka dekarboksilacije ter dejodinacije s čimer pridobimo jodotironamin (T_{1a}) in tironamin (T_{0a}) (11).

1.2. ENDOKRINI MOTILCI

Živimo v času, ko so kemikalije del našega vsakdana, nekatere od teh pa lahko vplivajo na delovanje našega endokrinega sistema ter posledično motijo normalen razvoj organizma. Tako imenovani hormonski motilci (HM) so zadnja leta predmet številnih raziskav, saj ti preko hrane in vode vplivajo na zdravje ljudi (7). Njihov obstoj v okolju so potrdili že v zgodnjih osemdesetih letih dvajsetega stoletja, število raziskav potencialnih hormonskih motilcev pa se je v preteklih letih drastično povečalo. Mednje prištevamo hormone (estradiol, testosteron), spojine rastlinskega izvora (fitoestrogeni), pesticide (metoksiklor, diklorodifeniltrikloroetan, diklorodifenildikloroetilen), kemikalije, uporabljene v industriji plastike (ftalati, alkilfenoli, bisfenoli, poliklorirani in polibromirani bifenili), detergente (alkilfenoli) ter navsezadnje tudi farmacevtske izdelke (17 α -etinilestradiol, dietilstilbestrol (DES)) (12).

1.2.1. UČINKI NA ORGANIZME

Z eksperimentalnimi študijami na živalih so dokazali, da številne sintezne kemikalije povzročajo reprodukcijske in nevrološke motnje, motnje v delovanju imunskega sistema ter povečujejo pojavnost rakavih obolenj.

- Hormonski motilci namreč lahko vplivajo tako na moški, kot tudi na ženski reproduktivni sistem. Pride lahko do pojava zmanjšanja teže testisov in obmodka ter zmanjšane kakovosti semenčic, prav tako tudi povečanja teže prostate, kar je posledica motenega razvoja moških spolnih organov v fetalnem in neonatalnem obdobju (6, 13, 14). Izpostavljenost HM pri ženskah poveča tveganje za nastanek

endometrioze ter sindroma policističnih jajčnikov. Prav tako so lahko HM vzrok hitremu pojavu pubertete ter skrajšanemu obdobju dojenja (15). Obstaja tudi možnost, da dolgotrajni in komaj zaznavni učinki HM, vplivajo na trend spreminjanja razmerja spolov, in sicer v korist ženskega spola. Prav tako naj bi bili delno odgovorni za večje število spontanih splavov, vendar bo za potrditev teh teorij potrebno izvesti še veliko dodatnih raziskav (6).

- Izpostavljenost HM lahko vodi tudi do motenj motorike ter izgube spomina ali celo do vedenjskih sprememb (16). Organizem je na škodljive učinke hormonskih motilcev še posebej občutljiv prav v obdobju razvoja, ko prihaja do fizioloških sprememb v telesu. Učinki izpostavljenosti HM so v tem primeru trajni in v veliki meri ireverzibilni (12). Pri novorojenčkih lahko pride do težav s kognitivnim, nevrološkim in psihomotoričnim razvojem. Slednje naj bi bile posledica vpliva HM na androgenski, estrogenski in tiroidni sistem, ki imajo pomebno vlogo pri razvoju možganov ter celotnega organizma (6).
- Določeni HM lahko preko vpliva na produkcijo citokinov delujejo neposredno na imunski sistem ali pa posredno tako, da vplivajo na delovanje imunomodulatornih hormonov (izločanje kortizola). Posledica izpostavljenosti HM je tako oslavljen imunski sistem ali poslabšan potek avtoimunskih bolezni (17, 18).
- HM so tudi potencialni vzrok za povečano pojavnost določenih vrst raka. Hormoni v telesu namreč vplivajo na hormonsko občutljiva tkiva (prostata, maternica, dojke, ščitnica) (6, 19).
- Delovanje HM naj bi bilo povezano tudi z razširjenim pojavom debelosti ter posledično s pojavom sladkorne bolezni, hiperlipidemije ter povišanega krvnega pritiska. Obstaja tudi možnost, da HM preko sprememb v metilaciji DNA, modifikaciji histonov in izražanju ne-kodirajoče RNA izkazujejo tudi dolgotrajne učinke na potomce (20).

Učinek hormonskih motilcev ni linearno odvisen od koncentracije. Endokrine učinke izkazujejo le v območju nizkih in visokih koncentracij. Njihova vezavna afiniteta na receptorje je v primerjavi s hormoni znatno nižja (7).

Hormonski motilci se v okolju ne pojavljajo posamično, ampak tudi v različnih kombinacijah. Tako je lahko mehanizem delovanja kemikalij v mešanici podoben, drugačen ali pa med njimi prevladujejo interakcije. Pri slednjem lahko pride do

antagonizma, kjer je odziv v primerjavi z aditivnim učinkom šibkejši ter sinergizma, kjer je odziv močnejši od odziva posameznih komponent. V primeru sinergističnega delovanja kemikalij je za doseganje enakega učinka kot pri učinku posamezne komponente potreben nižji odmerek posamezne komponente v mešanici (7).

Pomemben farmakološki koncept je tudi t.i. hormeza, pri kateri gre za stimulacijo učinka pri nizkih koncentracijah ter njegovo inhibicijo pri visokih koncentracijah. Lahko gre za direktno stimulacijo učinka ali za posledico motenj homeostaze. Maksimalni hormetični učinek se po navadi pojavi že pri 4–5-krat nižjih koncentracijah od koncentracije NOAEL (najvišji odmerek, pri katerem ni prišlo do opaznih neželenih učinkov) (21).

1.2.2. DOLOČANJE HORMONSKIH MOTILCEV

Kvalifikacija spojin kot hormonskih motilcev je zaradi njihove kompleksnosti ter raznolikosti zelo zahtevna. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) je prav v ta namen ustanovila EDTA (Endocrine Disrupter Testing and Assessment), katere namen je poenotenje testiranj in ocenjevanj med državami (22).

Predlagane testne sheme so, glede na nevarnost substance in potencialnega delovanja kot HM, razčlenili na pet stopenj:

- v prvi stopnji so zajeti postopki vrednotenja spojin, in sicer na podlagi že obstoječih podatkov. Gre za fizikalno-kemijske lastnosti spojin, toksikološke podatke (ne)standardiziranih testov, kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem (QSAR; Quantitative Structure-Activity Relationship) in podatke o toksičnosti in ADME, pridobljeni z *in silico* metodami (22);
- drugo stopnjo predstavljajo *in vitro* testi za ugotavljanje vezavne afinitete na receptorje (ER in AR), transkripcijsko aktivacijo receptorjev (ER, AR TR), vpliv na proliferacijo celične linije raka dojke MCF-7 in drugo (22);
- tretja stopnja zajema *in vivo* testiranja, s katerimi pridobimo podatke o učinku *in vivo*, ki nastopi kot posledica vezave spojine na izbrani receptor (uterotrofni test in Hershbergerjev test). Živali so testnim pogojem izpostavljene le za krajše obdobje njihovega življenjskega cikla (22);
- pri četrti stopnji gre za *in vivo* teste dokazovanja endokrinih učinkov (ponavljajoče 28- in 90-dnevne študije, študije toksičnosti in kancerogenosti, razvojne

nevrotoksičnosti), s katerimi pridobimo tudi podatke o neželenih učinkih endokrinih motilcev (22);

- peta stopnja *in vivo* testiranje pa nam omogoča pridobivanje bolj izčrpnih podatkov glede neželenih učinkov na endokrini sistem. K tem prištevamo podaljšane eno-generacijske reproduktivne toksikološke študije ter dvo-generacijske poskuse (22).

Potencialne HM določijo z uporabo kratkotrajnih testov iz prve, druge in tretje stopnje. Izbrane hormonske motilce pa nato vključijo še v nadaljnja testiranja četrte in pete stopnje, ki predstavljajo osnovo za določitev ocene tveganja (22).

1.3. POLIFENOLI

Polifenoli predstavljajo eno izmed najširše zastopanih skupin sekundarnih rastlinskih metabolitov. Zanje je značilna kemijska struktura, sestavljena iz hidroksilnih skupin, ki so vezane na aromatski obroč (fenolne skupine). V splošnem jih lahko razdelimo v več različnih strukturnih razredov, in sicer na preproste fenolne spojine, stilbene, lignane ter flavonoide, ki jih lahko dalje delimo na flavanole, flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocianine in proantocianine (23). V naši prehrani so najbolj zastopani prav flavonoidi in fenolne kisline, ki predstavljajo kar eno do dve tretjini celotnega vnosa polifenolov (24).

1.3.1. ABSORPCIJA, PORAZDELITEV, METABOLIZEM IN IZLOČANJE

Glave determinante intestinalne absorpcije polifenolov so njihove fizikalno-kemijske lastnosti, kot so molekulska masa ter oblika polifenolov. Zaestreni in glikozilirani polifenoli se v tankem črevesu absorbirajo v manjši meri (npr.: pozitivno nabiti antocianini). Vzrok je v večji hidrofilnosti glikoziliranih molekul, kar onemogoča samo absorpcijo. Prav zato so podvrženi predsistemskemu metabolizmu v prebavnem traktu ali jetrih (24).

Absorbirani polifenoli so v jetrih podvrženi 1. in 2. fazi systemskega metabolizma. Prva faza metabolizma poteka s pomočjo encimskega sistema citokrom P450 (CYP450), ki z modifikacijo obstoječih funkcionalnih skupin, naredi molekulo bolj polarno, kar posledično olajša nadaljnje reakcije konjugacije v 2. fazi metabolizma (24).

Prvi in drugi fazi metabolizma sledi ponovni prehod šibko konjugiranih polifenolov v krvni obtok. Metaboliti se nato v krvi v odvisnosti od svoje strukture z različnimi afinitetami vežejo na transportne proteine, kot je albumin (24).

Fitoestrogeni in njihovi metaboliti se nato porazdelijo v telesne tekočine (urin, plazma, slina, semenska tekočina) ter v nekatera tkiva. V krvni plazmi in urinu izmed izoflavonoidov v največji meri najdemo prav genistein, daidzein in ekvol. Manj podatkov je znanih glede porazdelitve polifenolov v tkiva (25).

Glede na naravo spojine se medsebojno razlikujejo tudi eliminacijski profili posameznih polifenolov. Po zaužitju se torej večina polifenolnih metabolitov hitro izloči preko urina ali blata, odvisno od stopnje konjugacije (24).

1.3.2. BIOLOŠKA UPORABNOST POLIFENOLOV

Biološka uporabnost se nanaša na količino fenolnih spojin, ki po zaužitju preidejo v krvni obtok (24). Majhne molekule, kot so na primer galna kislina, katehini in kvercetin, se skozi tanko črevo absorbirajo v večji meri, za razliko od proantocianidinov in antocianinov, katerih absorpcija je zaradi njihove relativno velike molekulske mase otežena. Njihovo biološko uporabnost so ocenili na približno $\leq 10\%$ zaužite količine (26). Biološka uporabnost se med posameznimi polifenoli zelo razlikuje, poleg tega pa ni nujno, da polifenoli, ki so v prehrani najbolj zastopani dosegajo tudi najvišje koncentracije biološko aktivnih oblik polifenolov v plazmi. Z biološko uporabnostjo flavonoidov so povezani koristni in potencialni toksični učinki. Poleg omenjenega, ne smemo pozabiti na vpliv črevesne mikroflore in encimov, ki lahko znatno spremenijo biološko uporabnost polifenolov (27). Preden se te spojine absorbirajo, se morajo hidrolizirati s pomočjo intestinalnih encimov ali črevesne flore. Med procesom absorpcije se spojine modificirajo. V intestinalnih celicah namreč pride do konjugacije, čemur kasneje sledi še metilacija, sulfatacija ali glukuronidacija v jetrih (26).

1.4. IN SILICO METODE

Izraz *in silico* pomeni način dela, ki poteka preko računalnika oz. računalniške simulacije. Ta način dela je v razmahu predvsem zadnjih par desetletij. Pojavil se je sočasno z razvojem kombinatorne kemije in rešetanja, ko so v čim krajšem času potrebovali čimbolj učinkovite metode, za določanje lastnosti spojin. Kljub velikemu doprinosu informacij pa imajo te metode omejeno uporabo. Z nadaljnjim razvojem in uporabo *in silico* metod bi

preprečili nepotrebno testiranje spojin na živalih, prav tako bi olajšali tudi izdelavo mnenj, ki jih za številne kemikalije na evropskem trgu zahteva zakonodaja. Prav zato spodbujajo razvoj teh metod tudi regulatorne ustanove Evropske unije v okviru Uredbe (ES) št.1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) (28).

1.4.1 IN SILICO METODE NAPOVEDOVANJA ENDOKRINE IN REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI

In silico metode zajemajo delovanje na različnih računalniških programih ter modelih s kvantitativnim razmerjem med strukturo in aktivnostjo (Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR)). S pomočjo teh modelov določimo tudi fizikalno-kemijske lastnosti spojin, in sicer na osnovi njihove kemijske strukture (29).

Večina *in silico* metod je zaradi omejene količine podatkov osredotočena na ugotavljanje endokrine toksičnosti, ki je posredovana predvsem preko estrogenskih ter androgenskih receptorjev. Pri tem uporabljajo različne tehnike, kot so (Q)SAR, 3D-QSAR, sidranje molekul na receptorje, računalniško modeliranje, simulacija molekularne dinamike, virtualno reševanje. Za napovedovanje endokrinih učinkov se uporabljajo naslednje baze podatkov: EDCs DataBank, EDKB, NureXbase, The Comparative Toxicogenomics Database (30, 31, 32, 33).

Trenutno je takšnih *in silico* metod, ki bi lahko parametre reproduktivne toksičnosti napovedale z veliko zanesljivostjo, zelo malo. Vzrok temu je sama kompleksnost bioloških sistemov, nepopolno razumevanje mehanizmov delovanja ter pomanjkanje enotnih podatkov za razvoj modelov. Podatki o reproduktivni toksičnosti spojin so zbrani v naslednjih podatkovnih bazah: OECD (Q)SAR Toolbox, TOXNET DART, ToxicityReference Database (ToxRefDB), The Comparative Toxicogenomics Database (32, 34, 35, 36).

2. NAMEN DELA

Ljudje smo vsakodnevno izpostavljeni različnim polifenolom. Pri ocenah varnosti teh derivatov se mnenja strokovnjakov razlikujejo, saj so eksperimentalni podatki o njihovi toksičnosti pomanjkljivi, še posebej glede potencialnih endokrinih učinkov.

V magistrskem delu bomo z različnimi *in silico* metodami napovedali endokrine učinke izbranih strukturno različnih polifenolov.

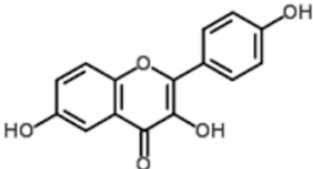
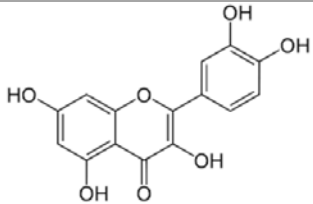
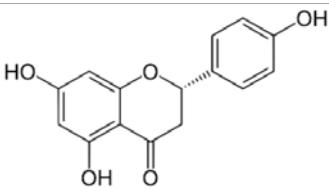
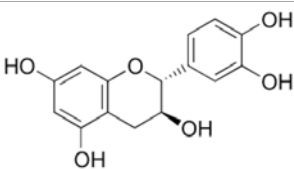
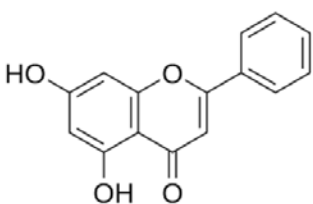
- S pomočjo programa **Endocrine Disruptome** bomo napovedali in ovrednotili endokrine učinke izbranih polifenolov.
- Eksperimentalne rezultate bomo primerjali z literaturnimi podatki objavljenih *in vitro* in *in vivo* študij.
- Na podlagi literaturnega pregleda bomo ovrednotili izpostavljenost ljudi polifenolom ter podali oceno tveganja izpostavljenosti.

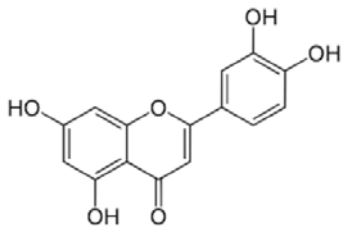
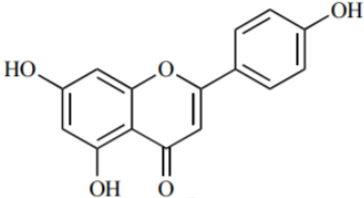
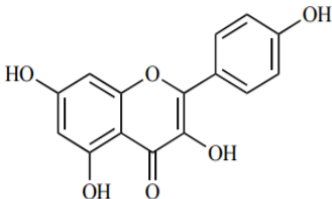
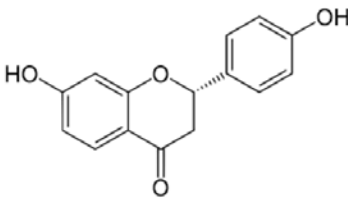
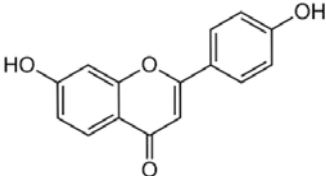
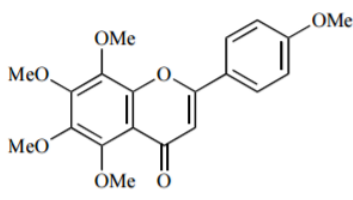
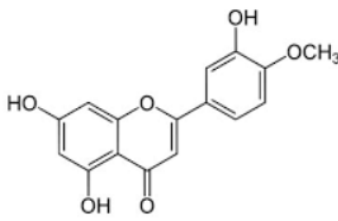
3. METODE IN MATERIALI

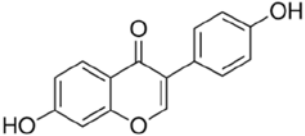
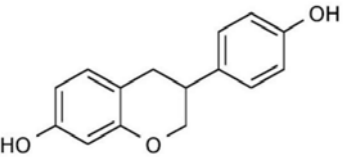
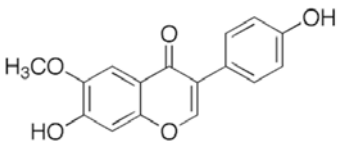
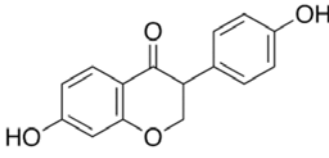
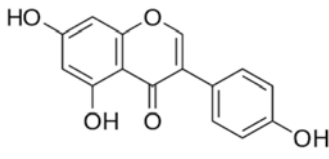
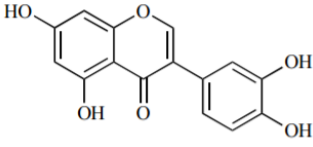
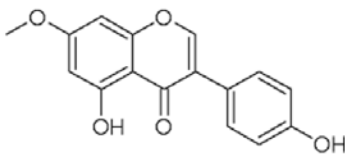
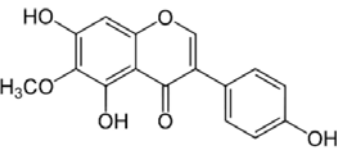
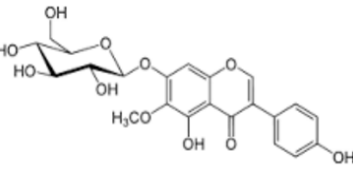
3.1. IZBRANI POLIFENOLI

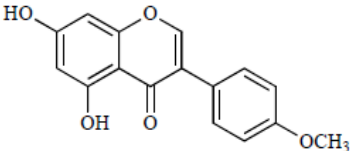
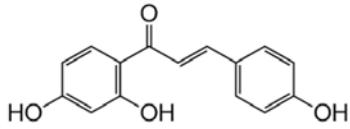
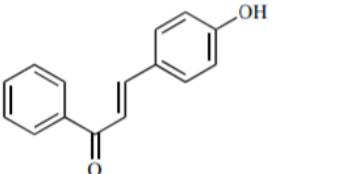
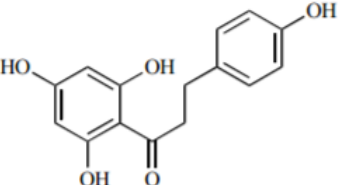
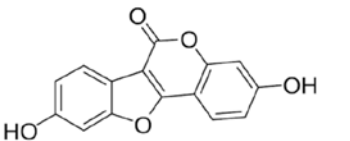
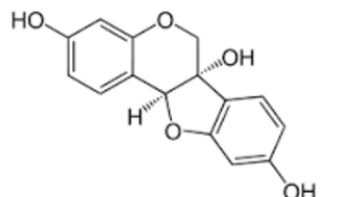
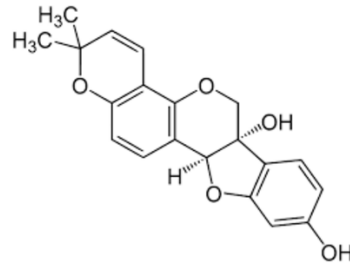
Za delo smo izbrali strukturno različne polifenole, ki se najpogosteje pojavljajo v vsakdanji prehrani in smo jim v večji meri lahko izpostavljeni. Njihove strukture in SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) kode ter vrednosti logP so prikazane v spodnji Preglednici II.

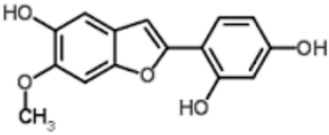
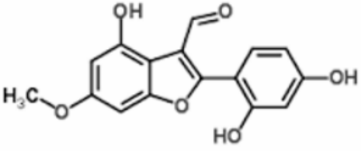
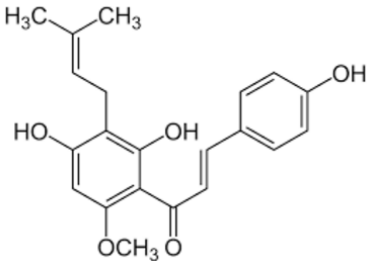
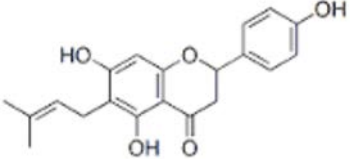
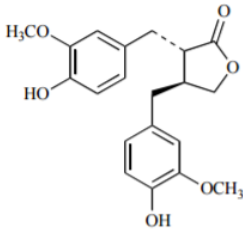
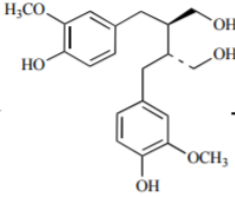
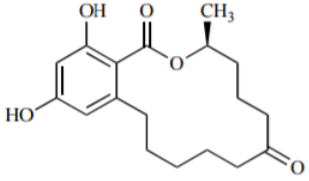
Preglednica II: Strukture, SMILES kode ter logP izbranih polifenolov

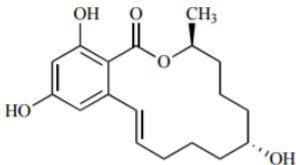
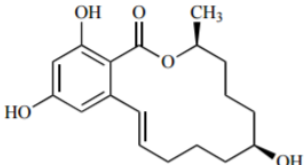
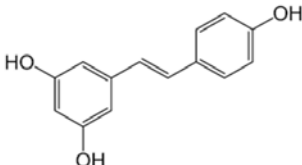
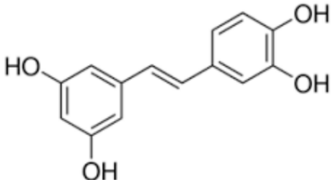
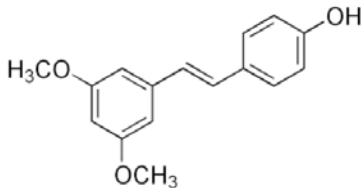
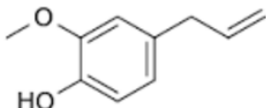
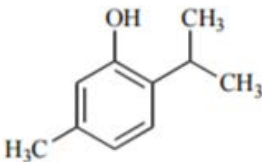
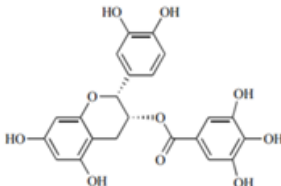
IME	STRUKTURA	SMILES koda	logP
FLAVONOIDI			
3,6,4'-trihidroksi-flavon		<chem>C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(O2)C=CC(=C3)O)O)O</chem>	2.58
kvercetin		<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O</chem>	1.99
naringenin		<chem>C1C(OC2=CC(=CC(=C2C1=O)O)O)C3=CC=C(C=C3)O</chem>	2.51
katehin		<chem>C1C(C(OC2=CC(=CC(=C2C1=O)O)O)C3=CC(=C(C=C3)O)O)O</chem>	1.55
krizin		<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>	2.87

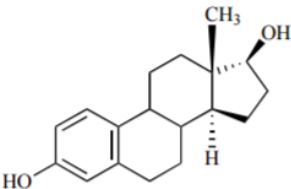
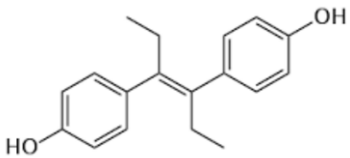
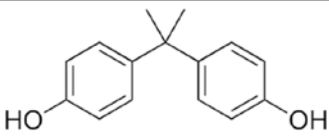
luteolin		<chem>O=C1C=CC(=C2C=CC(=C1)O2)O</chem> 2.28
apigenin		<chem>O=C1C=CC(=C2C=CC(=C1)O2)O</chem> 2.58
kamferol		<chem>O=C1C=CC(=C2C=CC(=C1)O2)O</chem> 2.28
likviritigenin		<chem>COc1ccc(cc1)C2=CC(=C(C=C2)O)C3=CC(=C(C=C3)O)O</chem> 2.80
7,4'-dihidroksiflavon		<chem>O=C1C=CC(=C2C=CC(=C1)O2)O</chem> 2.87
tangeretin		<chem>COc1ccc(cc1)C2=CC(=C(C=C2)OC)OC(=O)C3=CC(=C(C=C3)OC)OC</chem> 3.50
diosmetin		<chem>COc1ccc(cc1)C2=CC(=C(C=C2)O)C3=CC(=C(C=C3)O)O</chem> 2.59
IZOFLAVONOIDI		

daidzein		<chem>Oc1ccc(cc1)C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 2.89
ekvol		<chem>Oc1ccc(cc1)C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 2.82
glicitein		<chem>COc1cc(O)ccc1C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 2.88
dihidrodaidzein		<chem>Oc1ccc(cc1)C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 2.46
genistein		<chem>COc1cc(O)ccc1C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 2.58
3'-hidroksigenistein		<chem>COc1cc(O)ccc1C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 2.28
prunetin		<chem>COc1cc(O)ccc1C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 2.88
tektorigenin		<chem>COc1cc(O)ccc1C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 2.89
tektoridin		<chem>COc1cc(O)ccc1C(=O)c2cc(O)ccc2O</chem> 0.06

biokanin A		<chem>COC1=CC=C(C(=C1)C2=COC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O</chem> 2.88
HALKONOIDI		
izolikviritigenin		<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(=O)C2=C(C(=C(C=C2)O)O)O</chem> 2.70
4-hidroksihalkon		<chem>C1=CC=C(C(=C1)C(=O)C=CC2=CC=C(C(=C2)O</chem> 3.29
floretin		<chem>C1=CC(=CC=C1CCC(=O)C2=C(C(=C(C=C2O)O)O)O</chem> 2.32
KUMESTRANI		
kumestrol		<chem>C1=CC2=C(C(=C1O)OC3=C2C(=O)OC4=C3C=CC(=C4)O</chem> 2.77
PTEROKARPANI		
glicinol		<chem>C1C2(C(C3=C(O1)C=C(C=C3)O)OC4=C2C=CC(=C4)O)O</chem> 1.81
gliceolin I		<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC3=C2OCC4(C3OC5=C4C=CC(=C5)O)O)C</chem> 3.29
ARILBENZOFURANI		

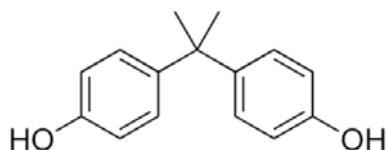
ebenfuran I		<chem>COC1=C(C=C2C=C(OC2=C1)C3=C(C=C(C=C3)O)O)O</chem> 3.23
ebenfuran II		<chem>COC1=CC(=C2C(=C1)OC(=C2C=O)C3=C(C=C(C=C3)O)O)O</chem> 3.04
PRENILIRANI FLAVONOIDI		
ksantohumol		<chem>CC(=CCC1=C(C=C(C(=C1O)C(=O)C=CC2=CC=C(C=C2)O)OC)O)C</chem> 4.22
6-prenilnaringenin		<chem>CC(=CCC1=C(C=C2C(=C1O)C(=O)CC(O2)C3=CC=C(C=C3)O)O)C</chem> 4.02
LIGNANI		
matairezol		<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C2COC(=O)C2CC3=CC(=C(C=C3)O)OC)O</chem> 2.69
sekoizolaricirezinol		<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C(C(CO)C(C(CO)CO)CO)O)C2=CC(=C(C=C2)O)OC)CO)O</chem> 2.12
MIKOESTROGENI		
zearalenon		<chem>CC1CCCC(=O)CCCC=C2=CC(=CC(=C2C(=O)O1)O)O</chem> 3.58

α-zearalenol		<chem>CC1CCCC(CCCC=CC2=CC(=CC(=C2C(=O)O1)O)O)O</chem> 3.37
β-zearalenol		<chem>CC1CCCC(CCCC=CC2=CC(=CC(=C2C(=O)O1)O)O)O</chem> 3.37
STILBENI		
resveratrol		<chem>CC1CCCC(CCCC=CC2=CC(=CC(=C2C(=O)O1)O)O)O</chem> 2.97
piceatanol		<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC2=CC(=CC(=C2)O)O)O)O</chem> 2.68
pterostilben		<chem>COC1=CC(=CC(=C1)C=CC2=CC=C(C(=C2)O)OC</chem> 3.58
POLIFENOLI		
evgenol		<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C=C)O</chem> 2.13
timol		<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O</chem> 2.82
epigalokatehin galat		<chem>C1C(C(OC2=CC(=CC(=C2)O)O)O)C3=CC(=C(C(=C3)O)O)OC(=O)C4=CC(=C(C(=C4)O)O)O</chem> 2.53

4-hidroksi-1-propenilbenzen		<chem>CC=CC1=CC=C(C=C1)O</chem>	2.43
OSTALO			
17β-estradiol		<chem>CC12CCC3C(C1CCC2O)CCC4=C3C=CC(=C4)O</chem>	3.61
DES		<chem>CCC(=C(CC)C1=CC=C(C=C1)O)C2=CC=C(C=C2)O</chem>	4.83
bisfenol A		<chem>CC(C)(C1=CC=C(C=C1)O)C2=CC=C(C=C2)O</chem>	3.42

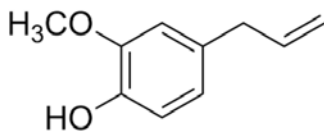
3.2. POZITIVNA IN NEGATIVNA KONTROLA

Kot pozitivno kontrolo smo izbrali bisfenol A (Slika 6). Gre za pogosto uporabljen plastifikator v proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksi smol. Z epidemiološkimi študijami so potrdili njegov negativen vpliv na razvoj živčevja, povečano pojavnost spontanih splavov, težave s prostato in podobno. Molekulo sestajata dva para-hidroksi substituirana benzenova obroča, povezana z ogljikovim atomom. Takšna struktura omogoča vezavo molekule na oba potipa estrogenskih receptorjev, in sicer s kar 10-krat večjo vezavno do β konformacije ER. Na endokrini sistem pa lahko deluje tudi preko vezave na druge receptorje, kot so na primer tiroidni, glukokortikoidni in arilni ogljikovodikovi receptorji (AhR) (7).



Slika 6: Bisfenol A

Za negativno kontrolo pa smo izbrali evgenol (Slika 7), saj je zaradi aromatskega obroča in nanj pripete hidroksilne skupine strukturno podoben polifenolom. Gre za naravni polifenol, ki ga najdemo v eteričnem olju nageljnovih žbic (klinčkov). Poleg tega, pa ne vpliva na delovanje endokrinega sistema.



Slika 7: Evgenol

3.3.NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI

PROGRAM: **Endocrine Disruptome**, Katra Kolšek, Samo Turk, Fakulteta za farmacijo in Kemijski inštitut, Slovenija.

RAZLIČICA: **21.01.2015**

DOSTOP: <http://endocrinedisruptome.ki.si/>

NASTAVITVE: ni nastavitev.

Program je namenjen ocenjevanju vezavne afinitete kemijskih spojin na LBD domeno receptorjev. Program poda afiniteto vezave za 14 agonističnih konformacij receptorjev, in sicer za estrogenski receptor α (ER α), estrogenski receptor β (ER β), androgenski receptor (AR), glukokortikoidni receptor (GR), jetrni X receptor α (LXR α), jetrni X receptor β (LXR β), s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor α (PPAR α), s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor β (PPAR β), s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor γ (PPAR γ), retinoidni X receptor α (RXR α), tiroidni receptor α (TR α) in tiroidni receptor β (TR β). Za štiri receptorje pa program napove tudi vezavo na antagonistično konformacijo receptorja, in sicer za AR, ER α , ER β , GR (37).

S pomočjo AutoDock Vina so določili, kakšna mora biti konformacija jedrnih receptorjev, da dosežemo optimalno vezavno ligandov. Za simulacijo molekulskega sidranja pa so uporabili program Docking interface for Target Systems (DoTS). Spojine so nato klasificirali glede na moč vezave, kot močne, srednje močne, šibke in tiste, ki se sploh ne vežejo na receptor. To so ocenili z metodo AUC (area under the curve) krivulje Receiver operating characteristic (ROC). Modeli z višjo AUC vrednostjo bi morali dati boljše rezultate (37).

Za ugotavljanje vezavnih afinitet ligandov vnesemo v program Endocrine Disruptome SMILES kodo iskane molekule ali pa njeno strukturo narišemo s pomočjo programa ChemDoodle Sketcher. Poleg strukture nam program poda tudi podatke o lastnostih same molekule (molekulska masa, logP, donorje in akceptorje vodikove vezi in opozorila o potencialno nevarnih strukturnih fragmentov molekule). Vse strukture ter protokoli so validirani (38).

Končni rezultati so podani glede na predvideno vezavno afiniteto ter so razdeljeni na štiri barvno kodirane skupine. **Rdeča** ($SE < 0,25$) predstavlja visoko vezavno kapaciteto ligandov; **oranžna** ($0,25 < SE < 0,5$); **rumena** ($0,5 < SE < 0,75$) in **zelena** ($SE > 0,75$), pri kateri je verjetnost vezave liganda najnižja (37).

Mejne vrednosti proste vezavne energije (kcal mol^{-1}) za specifične receptorje so prikazane v Preglednici III.

Preglednica III: Mejne vrednosti proste energije vezave (kcal mol^{-1}) za specifične receptorje

VERJETNOST VEZAVE	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
največja	> -8,6	> -8,4	> -9,3	> -10,7	> -9,2	> -9	> -10,7	> -9,8	> -11,9	> -12,1	> -10	> -10,5	> -10,3	> -12,1	> -10,2	> -10,5
velika	> -8,1	> -7,6	> -8,8	> -9,5	> -8,7	> -8,6	> -9,7	> -9,2	> -10,7	> -11,3	> -9,4	> -10,1	> -9,6	> -10,8	> -9,2	> -9,4
srednja	> -7,4	> -3,1	> -8,2	> -8,6	> -8	> -8,3	> -7,3	> -8,5	> -9,8	> -10,3	> -8,9	> -9,6	> -8,9	> -10	> -7,2	> -7,8
majhna	< -7,4	< -3,1	< -8,2	< -8,6	< -8	< -8,3	< -7,3	< -8,5	< -9,8	< -10,3	< -8,9	< -9,6	< -8,9	< -10	< -7,2	< -7,8

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI S PROGRAMOM ENDOCRINE DISRUPTOME

Za napovedovanje verjetnosti vezave izbranih polifenolov na različne jedrne receptorje smo uporabili program Endocrine Disruptome. Po vnosu ustreznega zapisa molekule je program podal rezultate, klasificirane po barvno kodiranih skupinah glede na verjetnost vezave. Rdeča barva pomeni, da je verjetnost vezave na receptor največja, oranžna pomeni veliko verjetnost vezave molekule, rumena, da je verjetnost vezave srednja ter zelena, ki napoveduje najmanjšo verjetnost vezave. Program smo validirali s pozitivno in negativno kontrolo (Preglednica IV), ki sta po strukturi sorodni polifenolom.

Preglednica IV: Pozitivna in negativna kontrola

POLIFENOLI																
	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
evgenol	-6,6	-6,6	-5,9	-5,7	-6,0	-5,8	-6,1	-5,7	-6,3	-6,4	-6,1	-6,1	-6,0	-6,9	-6,7	-6,2
bisfenol A	-8,5	-8,5	-8,3	-8,5	-8,4	-8,1	-7,6	-7,5	-8,5	-8,0	-7,8	-7,7	-7,6	-7,9	-8,6	-8,6

- Program je za **evgenol** (- kontrola) napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **bisfenol A (BPA)** (+ kontrola) napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR an
 - veliko verjetnost vezave na: AR
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α , ER β , GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na: ER α an, ER β an, GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ in RXR α .

Program je za izbrane flavonoide (Preglednica V), izoflavonoide (Preglednica VI), mikotoksine (Preglednica VII), stilbene (Preglednica VIII), halkonoide (Preglednica

IX), arilbenzofurane, lignane, pterokarpane ter fenole (Preglednica X) in njihove metabolite napovedal sledeče vezavne afinitete.

Preglednica V: Flavonoidi

FLAVONOIDI	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
3,6,4'-trihidroksil-flavon	-8,7	-9,1	-9,0	-9,1	-8,5	-8,6	-8,9	-7,4	-9,1	-9,7	-8,2	-8,7	-9,3	-9,0	-9,3	-9,4
kvercetin	-8,8	-8,4	-8,4	-8,7	-7,0	-8,0	-9,2	-8,2	-9,1	-9,0	-7,8	-8,7	-9,4	-9,0	-9,3	-9,3
naringenin	-9,0	-9,0	-8,6	-9,0	-8,2	-8,8	-8,6	-7,6	-8,9	-9,2	-9,2	-8,5	-9,1	-9,6	-9,2	-9,7
katehin	-7,0	-8,1	-8,5	-8,4	-8,0	-7,7	-7,8	-7,5	-8,4	-8,1	-8,5	-7,8	-7,1	-7,6	-5,7	-8,4
krizin	-8,8	-8,7	-8,3	-8,8	-7,9	-9,0	-8,6	-8,0	-9,1	-9,6	-9,2	-8,6	-9,6	-9,3	-10,4	-9,9
luteolin	-9,0	-9,0	-8,7	-9,2	-7,7	-8,5	-9,0	-7,9	-8,9	-9,5	-8,8	-8,4	-9,3	-9,7	-9,6	-9,5
apigenin	-8,9	-9,2	-8,8	-9,1	-8,2	-8,9	-8,8	-7,8	-8,8	-9,5	-9,3	-8,2	-9,3	-9,7	-9,6	-9,4
kamferol	-8,8	-8,6	-8,4	-8,5	-7,9	-8,4	-8,9	-7,9	-9,0	-9,1	-7,7	-8,6	-9,4	-9,2	-9,2	-9,1
likviritigenin	-8,5	-8,6	-9,2	-8,9	-9,2	-8,8	-8,7	-7,7	-9,0	-9,4	-8,9	-8,9	-8,7	-9,6	-9,0	-9,5
7,4'-dihidroksiflavon	-8,4	-8,7	-9,2	-9,0	-9,2	-8,8	-8,7	-7,8	-8,9	-9,5	-9,0	-9,0	-8,9	-9,7	-9,3	-9,2
tangeretin	-1,6	-1,7	-5,7	-6,5	-1,1	-5,6	-8,0	-7,2	-8,1	-7,9	-6,0	-7,3	-7,5	-8,5	-4,7	-6,5
diosmetin	-7,8	-6,6	-6,9	-7,3	-5,9	-7,7	-8,8	-7,6	-9,2	-9,5	-8,3	-8,6	-8,9	-9,3	-8,4	-9,3

- Program je za **3,6,4'-trihidroksiflavon** napovedal:
 - o največjo verjetnost vezave na: AR, AR an
 - o veliko verjetnost vezave na: TR α in ER α ,
 - o srednjo verjetnost vezave na: ER α an, ER β in ER β an, GR, PPAR γ in TR β
 - o majhno verjetnost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β ter RXR α .
- Program je za **kvercetin** napovedal:
 - o največjo verjetnost vezave na: AR
 - o veliko verjetnost vezave na: AR an in TR α
 - o srednjo verjetnost vezave na: ER α an, ER α , GR, PPAR γ in TR β
 - o majhno verjetnost vezave na: ER β , ER β an, GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β ter RXR α .
- Program je za **naringenin** napovedal:

- največjo verjetnost vezave na: AR, AR an
 - veliko verjetnost vezave na: ER β an in TR β
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, ER α , ER β , GR, PPAR α , PPAR γ in TR α
 - majhno verjetnost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR β ter RXR α .
- Program je za **katehin** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α , GR, TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale jedrne receptorje
- Program je za **krizin** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR, AR an in TR α
 - veliko verjetnost vezave na: ER β an in TR β
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, ER α , GR, PPAR α , PPAR γ
 - majhno verjetnost vezave na: ER β , GR an, LXR α , LXR β , PPAR β ter RXR α .
- Program je za **luteolin** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR, AR an
 - veliko verjetnost vezave na: TR α in TR β
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, ER α , ER β , GR, PPAR γ
 - majhno verjetnost vezave na: ER β , GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β ter RXR α .
- Program je za **apigenin** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR, AR an
 - veliko verjetnost vezave na: ER β an, TR α
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α , ER α an, ER β , GR, PPAR α , PPAR γ in TR β
 - majhno verjetnost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR β ter RXR α .
- Program je za **kamferol** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR, AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α , ER β an, GR, PPAR γ , TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje.

- Program je za **tangeretin** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: GR
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje.
- Program je za **likviritigenin** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR an
 - veliko verjetnost vezave na: AR, ER α , ER β , ER β an, TR β
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, GR, TR α
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje.
- Program je za **7,4'-dihidroksiflavon** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR an
 - veliko verjetnost vezave na: AR, ER α , ER β , ER β an, TR α
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, GR, PPAR α , TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje.
- Program je za **diosmetin** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR, AR an, GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale jedrne receptorje

Preglednica VI: Izoflavonoidi

IZOFLAVONOIDI																
	AR	AR an	ERα	ERα an	ERβ	ERβ an	GR	GR an	LXRα	LXRβ	PPARα	PPARβ	PPARγ	RXR α	TRα	TRβ
daidzein	-9,2	-8,9	-9,4	-9,8	-8,7	-8,9	-8,9	-7,4	-9,0	-9,9	-7,7	-7,9	-8,7	-9,4	-9,4	-9,4
ekvol	-8,1	-8,3	-8,8	-8,8	-8,3	-8,5	-7,8	-7,4	-9,0	-8,6	-8,1	-7,4	-7,4	-8,4	-7,5	-8,8
glicitein	-7,4	-7,7	-7,9	-7,7	-8,0	-7,2	-9,2	-7,7	-8,7	-9,6	-8,3	-8,3	-8,0	-8,9	-8,2	-8,8
dihidro-daidzein	-7,9	-8,0	-8,6	-8,8	-8,4	-8,1	-7,9	-8,0	-8,8	-8,6	-8,5	-7,8	-7,7	-8,3	-8,1	-8,7
genistein	-9,0	-9,1	-9,1	-9,2	-8,8	-8,9	-9,0	-7,6	-8,7	-9,6	-8,1	-8,6	-7,9	-9,0	-9,6	-9,5
3'-hidroksi-genistein	-9,2	-9,1	-9,3	-9,3	-8,8	-8,4	-9,4	-7,4	-8,8	-9,6	-8,1	-8,9	-8,1	-8,9	-9,8	-9,5
biokanin A	-8,5	-8,0	-6,6	-7,1	-6,9	-7,0	-9,0	-7,6	-9,0	-9,8	-7,5	-8,6	-8,0	-8,1	-9,7	-9,1
prunetin	-7,9	-7,6	-7,2	-7,5	-6,7	-6,6	-9,0	-7,5	-8,9	-9,9	-7,9	-8,5	-7,3	-8,2	-9,1	-9,3

tektorigenin	-8,0	-7,2	-8,3	-7,8	-8,1	-7,3	-9,0	-7,3	-8,6	-9,8	-7,3	-8,1	-7,8	-9,0	-8,2	-8,3
tektoridin	5,6	2,6	-4,3	-7,2	-2,9	-6,4	-9,6	-8,5	-9,4	-9,5	-7,3	-8,5	-7,8	-5,7	-5,2	-7,6

- Program je za **daidzein** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR, AR an in ER α
 - veliko verjetnost vezave na: ER α an, ER β an in TR α
 - srednjo verjetnost vezave na: ER β , GR, TR β
 - majhno verjetnost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , TR β ter RXR α .
- Program je za **ekvol** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: AR, ER α , ER α an, ER β , ER β an, GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ ter RXR α .
- Program je za **glicitein** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale jedrne receptorje
- Program je za **dihidrodaidzein** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: AR, ER α , ER α an, ER β , GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale jedrne receptorje
- Program je za **genistein** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR, AR an
 - veliko verjetnost vezave na: ER α , ER β , ER β an, TR α in TR β
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, GR
 - majhno verjetnost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ ter RXR α .
- Program je za **3'-hidroksigenistein** napovedal:

- največjo verjetnost vezave na: AR, AR an
 - veliko verjetnost vezave na: ER α , ER β , TR α in TR β
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, ER β an, GR
 - majhno vrednost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ ter RXR α .
- Program je za **biokanin A** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR, AR an ter TR α
 - srednjo verjetnost verjetnost vezave na: GR in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **prunetin** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR, AR an, GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na: vse ostale receptorje.
- Program je za **tektorigenin** napovedal:
 - srednjo verjetnost verjetnost vezave na: AR, AR an, ER β , GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na: vse ostale receptorje.
- Program je za **tektoridin** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR, AR an, ER β , GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje

Preglednica VII: Mikotoksini

MIKOTOKSINI	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
zearalenon	-3,8	-7,4	-9,8	-8,1	-10,5	-6,4	-8,4	-8,2	-7,6	-6,9	-6,6	-7,0	-8,5	-7,6	-2,2	-3,2
α -zearalenol	-4,6	-7,3	-9,2	-6,9	-10,0	-6,1	-8,6	-8,1	-6,6	-8,0	-7,3	-7,2	-8,2	-7,4	-2,2	-2,7
β -zearalenol	-4,5	-7,4	-9,8	-7,2	-10,3	-6,5	-8,7	-8,1	-6,8	-8,0	-6,8	-6,8	-8,4	-6,8	-1,2	-3,0

- Program je za **zearalenon** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: ER α , ER β
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an, GR
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje

- Program je za **α -zearalenol** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: ER β
 - veliko verjetnost vezave na: ER α
 - srednjo verjetnost vezave na: AR, GR
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **β -zearalenol** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: ER α , ER β
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an, GR
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje

Preglednica VIII: Stilbeni

STILBENI	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
resveratrol	-8,6	-8,1	-8,1	-8,1	-6,9	-8,2	-8,0	-6,9	-8,3	-8,4	-8,1	-7,8	-8,5	-9,1	-8,9	-9,2
piceatanol	-8,5	-8,2	-7,9	-8,3	-6,5	-7,8	-8,3	-7,0	-8,4	-8,6	-8,5	-7,8	-8,7	-9,1	-9,0	-9,3
pterostilben	-5,6	-6,2	-7,1	-7,0	-4,8	-6,8	-8,1	-6,8	-8,2	-8,5	-8,1	-8,1	-7,5	-8,8	-7,6	-8,1

- Program je za **resveratrol** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR, AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **piceatanol** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR, AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **pterostilben** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an, GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje

Preglednica IX: Halkonoidi

HALKONOIDI	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
izolikviritigenin	-8,6	-8,2	-8,6	-8,1	-7,8	-8,3	-8,2	-7,3	-8,7	-8,5	-8,2	-8,3	-7,6	-8,9	-8,2	-8,4
4-hidroksi-halkon	-8,6	-8,5	-8,4	-8,5	-8,4	-8,4	-8,1	-7,4	-8,7	-8,7	-8,4	-8,5	-8,5	-9,0	-9,0	-9,0
floretin	-8,3	-8,2	-8,5	-8,5	-8,2	-8,3	-8,0	-7,3	-8,6	-8,6	-7,6	-8,2	-7,9	-8,5	-8,0	-8,2

- Program je za **izolikviritigenin** napovedal:
 - o veliko verjetnost vezave na: AR, AR an
 - o srednjo verjetnost vezave na: ER α , GR, TR α in TR β
 - o majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **4-hidroksihalkon** napovedal:
 - o največjo verjetnost vezave na: AR an
 - o veliko verjetnost vezave na: AR
 - o srednjo verjetnost vezave na: ER α , ER β , ER β an, GR, TR α in TR β
 - o majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **floretin** napovedal:
 - o veliko verjetnost vezave na: AR in AR an
 - o srednjo verjetnost vezave na: ER α , ER β , GR, TR α in TR β
 - o majhno verjetnost vezave na: ER α an, ER β an, GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ in RXR α .

Preglednica X: Arilbenzofurani, lignani, pterokarpani, fenoli, ostalo

	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
ARILBENZOFURANI																
ebenfuran I	-8,7	-8,0	-8,2	-8,3	-7,5	-7,8	-8,3	-7,3	-8,7	-9,0	-7,8	-8,0	-7,6	-9,5	-8,2	-9,1
ebenfuran II	-7,0	-7,9	-8,2	-7,0	-6,8	-7,4	-8,4	-7,2	-8,9	-9,1	-7,7	-8,4	-7,4	-8,1	-7,3	-7,4
LIGNANI																

matairezinol	-5,6	-7,4	-8,1	-9,0	-7,5	-8,2	-8,0	-8,0	-9,5	-9,7	-8,3	-8,7	-7,7	-9,7	-8,4	-9,5
sekoizolaricirezinol	-5,6	-6,6	-7,0	-7,5	-7,3	-8,0	-7,0	-7,0	-8,5	-8,6	-7,6	-7,4	-7,4	-8,3	-8,4	-8,7
PTEROKARPANI																
glicinol	-9,5	-9,5	-9,2	-9,1	-9,6	-8,9	-8,7	-8,4	-9,1	-9,2	-8,1	-8,4	-7,5	-8,1	-7,7	-8,7
gliceolin I	-6,2	-7,2	-7,8	-7,4	-4,0	-8,3	-8,3	-8,9	-9,6	-10,1	-5,5	-9,1	-8,0	-7,8	-4,0	-7,2
FENOLI																
timol	-7,1	-6,8	-6,1	-5,8	-6,1	-6,0	-6,3	-5,9	-6,8	-7,0	-6,2	-6,3	-6,0	-6,3	-6,9	-6,7
OSTALO																
4-hidroksi-1-propenil-1-benzen	-6,6	-6,3	-6,1	-5,9	-6,2	-6,1	-6,2	-5,8	-6,4	-6,6	-6,0	-5,9	-6,3	-6,8	-6,9	-6,3
epigalokate-hin galate	-5,8	-8,1	-9,2	-8,7	-5,5	-8,7	-9,7	-9,0	-8,4	-9,0	-8,8	-8,2	-8,3	-8,8	-3,7	-6,5
DES	-8,7	-8,5	-8,6	-9,1	-7,3	-6,6	-9,2	-6,8	-8,5	-8,5	-6,9	-7,7	-6,8	-7,9	-8,9	-9,2
bisfenol A	-8,5	-8,5	-8,3	-8,5	-8,4	-8,1	-7,6	-7,5	-8,5	-8,0	-7,8	-7,7	-7,6	-7,9	-8,6	-8,6
kumestrol	-9,8	-8,9	-9,4	-9,2	-9,4	-9,5	-9,1	-8,0	-9,7	-9,6	-8,8	-8,8	-8,8	-9,3	-9,4	-9,6
17β-estradiol	-8,9	-9,2	-9,1	-9,6	-9,2	-8,0	-8,3	-8,5	-10,1	-9,5	-8,9	-6,6	-6,5	-8,4	-5,0	-8,1

- Program je za **ebenfuran I** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR
 - veliko verjetnost vezave na: AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vrednost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **ebenfuran II** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: GR in TR α
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **matairezinol** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: TR β
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an, ER α an, GR, TR α
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **sekoizolaricirezinol** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **glicinol** napovedal:

- največjo verjetnost vezave na: AR, AR an, ER β
 - veliko verjetnost vezave na: ER α , ER β an
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ ter RXR α .
- Program je za **gliceolin I** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an, GR, GR an
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **timol** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **4-hidroksi-1-propenilbenzen** napovedal:
 - srednjo verjetnost vezave na: AR an
 - majhno verjetnost vezave na vse ostale receptorje
- Program je za **epigalokatehin galat** napovedal:
 - veliko verjetnost vezave na: AR an, ER α , ER β an
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an, GR, GR an
 - majhno verjetnost vezave na: AR, GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ , RXR α , TR α in TR β
- Program je za **kumestrol** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR, AR an, ER α , ER β in ER β an
 - veliko verjetnost vezave na: TR α in TR β
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α an in GR
 - majhno verjetnost vezave na: GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ in RXR α .
- Program je za **DES** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR in AR an
 - srednjo verjetnost vezave na: ER α , ER α an, GR, TR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na: ER β , ER β an, GR an, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ in RXR α .

- Program je za **17 β -estradiol (E2)** napovedal:
 - največjo verjetnost vezave na: AR, AR an
 - veliko verjetnost vezave na: ER α , ER α an, ER β
 - srednjo verjetnost vezave na: GR, LXR α in TR β
 - majhno verjetnost vezave na: ER β an, GR an, LXR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ , RXR α ter TR α .

Pri večini polifenolov naravnega izvora je program napovedal največje verjetnosti vezave na androgenske in estrogenske receptorje.

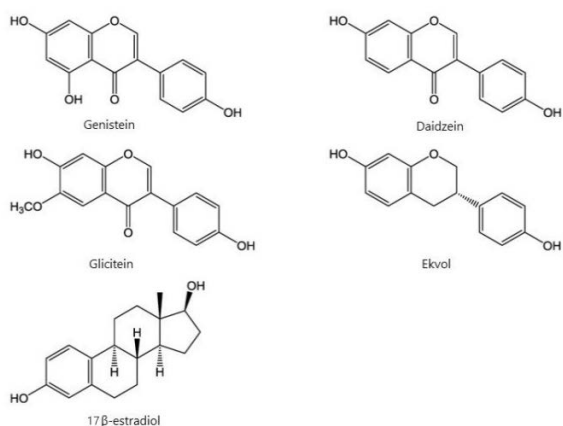
4.2. RAZPRAVA

4.2.1. VEZAVA POLIFENOLOV NA JEDRNE RECEPTORJE

Rezultati napovedane vezave polifenolov z Endocrine Disruptome so za večino testiranih polifenolov pokazali največjo verjetnost vezave na agonistično in antagonistično konformacijo AR, agonistično konformacijo ER α , ER β ter srednjo in majhno verjetnost vezave na antagonistični konformaciji ER α , ER β in agonistične konformacije GR ter TR α in TR β . Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko sklepamo o afiniteti ligandov do jedrnih receptorjev.

4.2.1.1. STRUKTURNE ZAHTEVE POLIFENOLOV ZA VEZAVO NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

Za vezavo na ER β imajo največjo afiniteto prav polifenoli s prisotno ketonsko, karboksilno ali hidroksilno skupino na aromatskem ali alicikličnem obroču. Ker so polifenoli strukturno zelo podobni endogenemu 17 β -estradiolu, smo zanje napovedali največjo verjetnost vezave (Slika 8). Pri vezavi na antagonistični konformaciji ER α in ER β ostaja verjetnost vezave pri polifenolih v območju srednje verjetnosti in pri nekaterih tudi majhne verjetnosti vezave.



Slika 8: Primerjava struktur nekaterih polifenolov in estrogena (39)

Fang in sodelavci so ovrednotili ključne lastnosti potencialnega mimetika estradiola, in sicer mora imeti:

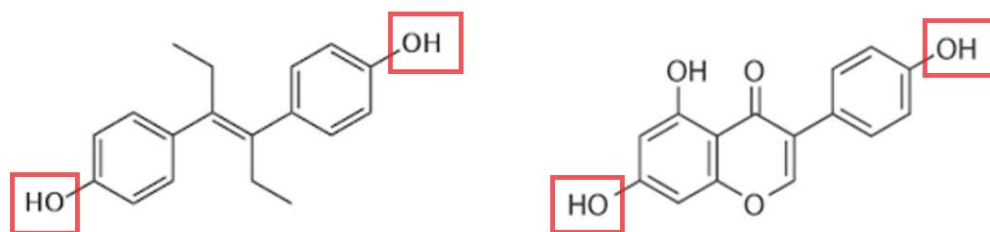
- sposobnost hidroksilne skupine fenolnega obroča za tvorbo H-vezi, mimetik 3-OH,

- donor H-vezi, ki je mimetik 17β -OH skupine in ustrezno O-O razdaljo (9,7-12,3 Å) med 3- in 17β -OH,
- sterične hidrofobne centre, ki oponašajo sterične 7α - in 11β -substituente
- hidrofobno naravo
- prisotno strukturo obroča (40).

Za vezavo na ta receptor je pomembna tudi hidrofobnost, ki jo definira vrednost logP. Tako imajo ligandi, ki se na vezavno mesto vežejo močneje, tudi večje vrednosti logP, kar pa seveda ne velja vedno. Linearne korelacije za fitoestrogene med vrednostmi logP in RBA načeloma ne moremo vzpostaviti. To je možno le v primeru polifenolov, saj je v tem primeru parameter logP pri vezavi na receptor izrednega pomena, vendar morajo biti vsi ključni farmakofori na ustreznem mestu. Molekulam, katerih razdalje med kisikovima atomoma niso optimalne za vezavo na receptor, omogoča večjo afiniteto do le-tega prav hidrofobnost (41). Pomembna lastnost dobrega liganda je tudi prisotnost vsaj enega aromatskega obroča. Slednji daje celotni molekuli rigidnost, zato se na ER preferenčno vežejo planarne aromatske strukture (40).

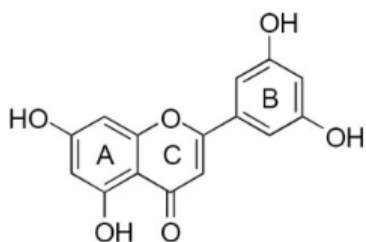
VEZAVA IZOFLAVONOIDOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

Izoflavoni izkazujejo v primerjavi s flavonoidi večjo afiniteto do estrogenskih receptorjev. Večina ima namreč OH skupine na mestih 4,4', s čimer je vezava molekule podobna vezavi dietilstilbestrola (DES). Možno je tudi, da imajo 7- in 4'-OH skupine izoflavonoidov podobno vlogo pri vezavi, kot jo imajo 4- in 4'-OH skupine DES (Slika 9). Rezultati *in vitro* testiranj sicer niso popolnoma skladni z našimi, pridobljenimi s programom Endocrine Disruptome, saj smo za izoflavonoide v splošnem napovedali manjše verjetnosti vezave na ER α in ER β .

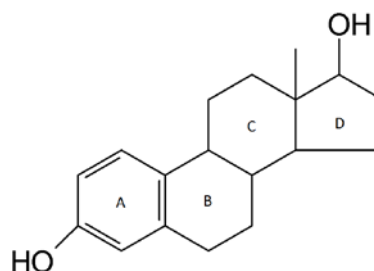


Slika 9: Strukturna primerjava DES in genistena

Kot že prej omenjeno sta obroča A in C flavonoidov ter izoflavonoidov mimetika obroča A endogenega estradiola (Slika 10, 11).

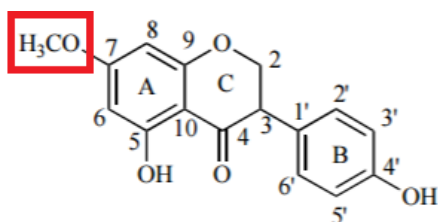


Slika 10: Apigenin (42)

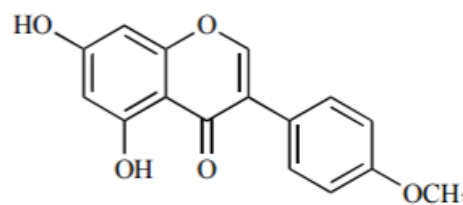


Slika 11: 17-β estradiol

Ker metilacija OH skupin zniža vezavno afiniteto, imata **biokanin A** in **prunetin** 100-krat nižjo RBA (relativno vezavno afiniteto) kot **genistein** (Slika 9, 12, 13) (40).



Slika 12: Prunetin (RBA: 0,0018) (3)



Slika 13: Biokanin A (RBA: 0,0043) (40)

Njihova vezava na receptorje je selektivna, saj v primerjavi z ERα **genistein** izraža do ERβ kar 7–30-krat večjo vezavno afiniteto, medtem ko se endogeni estradiol veže na oba podtipa receptorjev z enako afiniteto. Z našim programom smo napovedali ravno obratno, in sicer višjo afiniteto genisteina do ERα. Kljub temu sta razliki v afinitetah do obeh izoform receptorjev majhni. Selektivna vezava genisteina na ERβ kaže na sposobnost izoflavonov, da imajo lahko različne biološke učinke. Za potrditev te testne hipoteze so primerjali učinke izoflavonov in estradiola na transaktivacijsko represijo in aktivacijo v prisotnosti ERα ali ERβ. Gre za testno metodo namenjeno določanju agonističnega oz. antagonističnega delovanja spojin na ER. Uvrščamo ga med teste z reporterskim genom, ki se izvaja na transficiranih celicah MDA-MB-453 (ERE-tkLuc). Ob vezavi spojine na ER se tvori kompleks med ligandom in receptorjem, ki se po prehodu v celično jedro veže na estrogen odziven element (ERE) na DNA ter posledično sproži transkripcijo reporterskega gena (ERE-tkLuc). To se odrazi v produkciji encima luciferaze, katerega aktivnost lahko

izmerimo po dodatku usreznega luciferaznega substrata (luciferina). Luminescenco, ki je posledica aktivnosti encima, pa detektiramo z luminometrom in programsko opremo.

Za *in vitro* preizkušanje delovanja genisteina so uporabili celični liniji MDA-MB-453 in MCF-7. Genistein je na obeh izkazal svoje šibko agonistično delovanje na ER α . Kljub temu pa je močan agonist ER β , saj transkripcijsko aktivacijo in represijo sproži le preko ER β . Agonistično delovanje genisteina na ER je potrdila tudi naša *in silico* raziskava. Potencialna razlaga za ER β selektivno aktivnost izoflavonoidov je njihova sposobnost induciranja funkcionalne AF-2 (activation function-2) površine pri ER β . Ta ima namreč v nasprotju z ER α višjo afiniteto vezave do koregulatorjev, kot je GRIP1 (z glukokortikoidom interagirajoči receptorski protein 1). Genistein je pri višjih koncentracijah (10 μ M) izkazal represivno delovanje na ER α le v 33%, medtem ko je pri 10 nM koncentraciji dosegel 72% represijo na ER β . S tem lahko potrdimo domnevo, da genistein ustvari AF-2 površino na ER β , katero odlikuje večja afiniteta do GRIP1, kot pa pri ER α (43).

Na samo afiniteto izoflavonoidov do receptorjev ter njihov transaktivacijski potencial pa vplivajo tudi metabolne transformacije.

Nasprotno pa encimska redukcija dvojne vezi v piran-4-onskem obroču nekaterih izoflavonoidov (biokanin A, formononetin, daidzein in genistein) ni vplivala na moč vezave (Slika 13, 14) (40).

- RBA (relativna vezavna afiniteta) **biokanina A** (Slika 13) za oba podtipa ER je več kot 10.000-krat nižja od RBA estradiola, kljub temu pa ima relativno močno agonistično delovanje. Biokanin A je namreč 4'-metilni eter genisteina in dokazano je bilo, da lahko celice raka dojke MCF-7 pretvorijo biokanin A v genistein (44).
- RBA **genisteina** (Slika 9) je za ER α 25-krat manjša od RBA estradiola, medtem ko sta RBA za ER β obeh spojin med seboj primerljivi. Nasprotno pa so dokazali tudi, da je transkripcijski učinek 1000 nM genisteina na ER α in ER β 2-krat večji kot pri podobnih koncentracijah estradiola (Preglednica XI). Fiziološki pomen teh razlik v z ER posredovanem transaktivacijskem učinku na ERE še ni povsem razjasnjen (45).

- Relativna vezavna afiniteta (RBA) **daidzeina** (Slika 30) na ER α in ER β je 200-krat nižja kot za estradiol. Je pa transaktivacijski učinek daidzeina (pri 1000 nM) na ERE skoraj identičen kot v primeru iste koncentracije estradiola.

Preglednica XI: In silico napovedane vezavne afinitete polifenolov na estrogenske receptorje in primerjava z eksperimentalno dobljenimi vrednostmi vezavne afinitete

	ER α	ER α an	ER β	ER β an	Literaturne vrednosti RBA ER α (%)	Literaturne vrednosti RBA ER β (%)
kumestrol	-9,4	-9,2	-9,4	-9,5	20	140
kvercetin	-8,4	-8,7	-7,0	-8,0	0,01	0,04
naringenin	-8,6	-9,0	-8,2	-8,8	0,01	0,11
krizin	-8,3	-8,8	-7,9	-9,0	<0,01	<0,01
daidzein	-9,4	-9,8	-8,7	-8,9	0,1	0,5
ekvol	-8,8	-8,8	-8,3	-8,5	nd	nd
genistein	-9,1	-9,2	-8,8	-8,9	4	87
zearalenon	-9,8	-8,1	-10,5	-6,4	7	5
α-zearalenol	-9,2	-6,9	-10,0	-6,1	48	nd
β-zearalenol	-9,8	-7,2	-10,3	-6,5	16	14
17β-estradiol	-9,1	-9,6	-9,2	-8,0	100	100
biokanin A	-6,6	-7,1	-6,9	-7,0	<0,01	<0,01
apigenin	-8,8	-9,1	-8,2	-8,9	0,3	6
kamferol	-8,4	-8,5	-7,9	-8,4	0,1	3

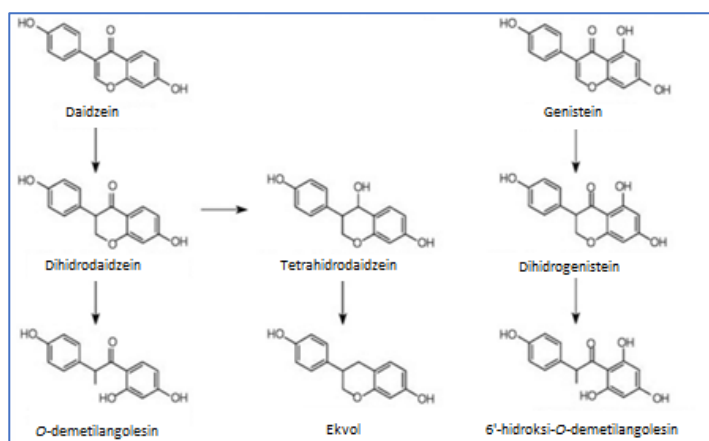
Preglednica XII: IC₅₀ vrednosti polifenolov na ER

	ER α EC ₅₀ (μ M)	ER β EC ₅₀ (μ M)
17β-estradiol	5*10 ⁻⁴ -1*10 ⁻³	6*10 ⁻⁵ -2,5*10 ⁻⁴
zearalenon	0,13	0,02
α-zearalenol	0,011	0,003
β-zearalenol	0,23	0,02
kumestrol	0,14	0,003
genistein	2	0,008
daidzein	/	0,08
naringenin	70	2,10

- Na transaktivacijsko moč je imela večji učinek biotransformacija daidzeina.

Pri metabolizmu daidzeina pride sprva do redukcije daidzeina v dihidrodaidzein, čemur sledita dve dodatni stopnji redukcije (odstranitev ketonske skupine) ter nastanek ekvola (Slika 14). Njegova aktivnost je kar 30-krat višja od dihidrodaidzeina. Slednji je 100-krat manj aktiven od svojega prekursorja (daidzeina).

S programom Endocrine Disruptome smo ocenili, da je verjetnost vezave **ekvola** na ER srednje velika, podobno velja tudi za **dihidrodaidzein**, kar se sklada tudi z literaturnimi podatki. Ekvol naj bi se vezal le na ER β ne pa tudi na ER α , česar pa z našim programom nismo potrdili. Z *in vitro* študijami so ugotovili, da predstavlja afiniteta ekvola na ER β 1/200 afinitete estradiola (46).



Slika 14: Pretvorba daidzeina in genisteina (47)

- Morito je preučil vezavno afiniteto **tektoridina** (glikozid) in **tektorigenina** ter genisteina na ER α in ER β . Izmed teh je prav genistein izkazoval največjo moč vezave na jedrni receptor. Sledil je tektorigenin s srednje močno vezavo na obe obliki receptorja ter tektoridin z najmanjšo vezavno afiniteto. Kljub majhni vezavni afiniteti pa imata omenjeni spojini močno estrogeno delovanje (40). Z našimi *in silico* napovedmi smo te rezultate tudi potrdili.

VEZAVA FLAVONOIDOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

Vezavno afiniteto flavonoidov določa pozicija OH skupin, pripetih na A in C. Tako imajo 3,6,4'-trihidroksifavon (RBA: 0,45%) in 6,4'-dihidroksiflavon (RBA: 0,15%), veliko večje

vezavne afinitete v primerjavi z apigeninom, kamferolom in finestinom, ki imajo OH locirano na 7 in 4' mestu (40).

Apigenin sicer izkazuje do obeh estrogenskih receptorjev zmerno afiniteto, vendar pa se v primeru dodatnih OH skupin (**kamferol**, **kvercetin**) vezavne afinitete ne povečajo, ampak zmanjšajo (50), kar smo potrdili tudi z našim programom.

Pri vezavni afiniteti ima pomembno vlogo tudi nasičenost vezi v heterocikličnih obročih. Bolj rigidni flavoni se na ER vežejo bolje kot pa fleksibilnejši flavanoni (primer apigenina in naringenina) (Preglednica XIII) (40).

Preglednica XIII: Relativne vezavne afinitete flavonoidov na ER

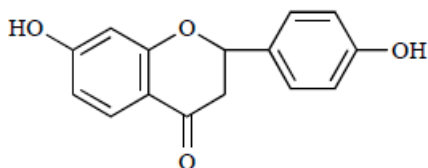
	RBA ERα (%)	RBA ERβ (%)
apigenin	0,3	6
kamferol	0,1	3
kvercetin	0,01	3
naringenin	0,01	0,11

Fenolni hidroksilni skupini na pozicijah 7 in 4' delujeta kot mimetik hidroksilne skupine na mestu 3 endogenega estradiola, obroča A in C pa oponašata obroč steroidnega skeleta C in D ter A in B. Iz tega lahko sklepamo, da prisotnost hidroksilne skupine na mestu 4' poveča estrogeno delovanje (48).

Vzrok manjše estrogenske aktivnosti flavonoidov je tudi hidroksilna skupina na mestu 5. Razlika v estrogenski aktivnosti flavonov in izoflavonov je lahko tudi posledica različne orientiranosti 5-hidroksi skupine glede na vezavno mesto receptorja. S študijami so dokazali, da ima pri zmanjšani aktivnosti pomembno vlogo tudi prisotnost 4-keto skupine izoflavonoidov na C obroču (48).

Podobno kot za izoflavonoide, velja tudi za flavonoide, da je njihova vezava na ER selektivna. Selektivno delovanje na ER β izkazuje **likviritigenin** (Slika 15), ki mu je naš program napovedal veliko verjetnost vezave. Z *in vitro* študijo so dokazali, da se likviritigenin veže na ER β s kar 20-krat večjo afiniteto kot na ER α , medtem ko smo z *in silico* metodo napovedali za oba podtipa receptorjev isto verjetnost vezave. Likviritigenin se *in vivo* metabolizira do 7,4'-dihidroksiflavona, za katerega so z *in vitro* študijami dokazali, da aktivira ER β 3-krat močnejše kot sama izhodna spojina (40), medtem ko smo z našim programom za ER β napovedali enako verjetnost vezave tega metabolita in

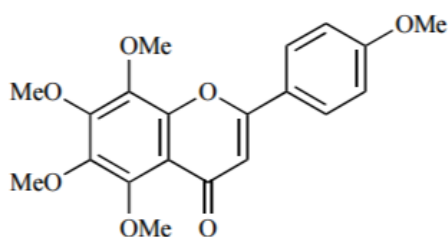
likviritigenina. Z *in silico* metodo smo torej napovedali visoko verjetnost vezave omenjenih spojin na ER α , ER β in ER β an. Majhna verjetnost interakcije pa je bila napovedana le za antagonistično konformacijo ER α .



Slika 15: Likviritigenin (40)

Za **luteolin** so s kompetitivnimi poskusi, kjer so uporabili človeški rekombinantni ER določili njegovo EC₅₀ vrednosti, ki je znašala 0,5 μ M. Dokazali so tudi stimulirajoče delovanje na proliferacijo MCF-7 rakavih celic. Zanj smo z *in silico* metodo napovedali srednjo verjetnost vezave.

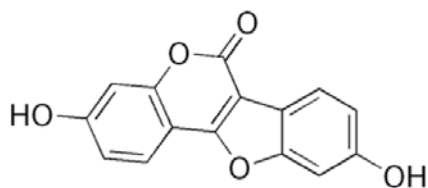
Tangeretin (Slika 16) pa v proliferacijskem poskusu na celicah MCF-7 ni izkazal nikakršnega estrogenega delovanja, kar je posledica odsotnosti OH skupin na pozicijah 4', 5 in 7. Zanj smo tudi z našim programom Endocrine Disruptome napovedali majhno verjetnost vezave, kar je skladno z rezultati *in vitro* študij (40).



Slika 16: Tangeretin

VEZAVA KUMESTRANOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

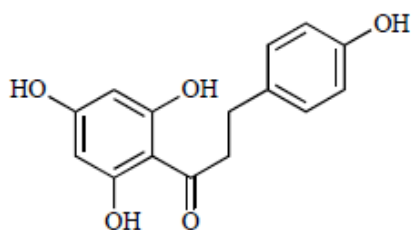
Kot fitoestrogen z najmočnejšo vezavno afiniteto na ER se je v *in vitro* študijah izkazal **kumestrol** (Slika 17), katerega relativna vezavna afiniteta na ER α je znašala 20%, na ER β pa 140%. Njegova struktura je popolnoma rigidna in planarna, torej zelo podobna strukturi estradiola (41). Kljub temu pa so z *in vitro* študijami potrdili, da se kumestrol veže na α konformacijo receptorja s kar 3-krat manjšo afiniteto kot sam estradiol, medtem ko se na ER β veže z afiniteto, primerljivo z afiniteto estradiola (49).



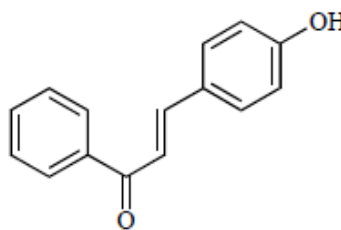
Slika 17: Kumestrol

VEZAVA HALKONOIDOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

Halkoni so najfleksibilnejši izmed obravnavanih spojin, saj veriga treh kovalentno povezanih ogljikov med aromatskima obročema omogoča veliko fleksibilnost same molekule. Njihov RBA je kar 100.000-krat manjši od RBA estradiola (RBA estradiola je 100%, EC₅₀ vrednost pa znaša okoli 0,001 μ M). Če relativna vezavna afiniteta endogenega estradiola znaša 100%, potem je ta vrednost za halkonoide znatno manjša. **Floretin** (Slika 18) ima izmed halkonoidov najvišje vrednosti RBA (0,069%), sledi mu **4'-hidroksihalkon** z RBA 0,0037% ter **halkon**, katerega RBA znaša 0,0015% (41). Razdalja med OH skupinami ter A in B obročem znaša med 11 in 12 Å, kar je podobno kot v primeru estradiola, kljub temu pa prej omenjena fleksibilnost zmanjša samo sposobnost vezave. Odstranitev ene od OH skupin se odraža v zmanjšani aktivnosti, zato so monohidroksi derivati veliko šibkejši ligandi (4-hidroksihalkon, Slika 19) (43). Tega sicer z našimi izračuni vezavnih afinitet nismo potrdili, saj so bile le-te za floretin in 4-hidroksihalkon dokaj primerljive. V primeru vezave na antagonistično konformacijo ER β je program za 4-hidroksihalkon napovedal celo nekoliko višjo verjetnost vezave.



Slika 18: Floretin (RBA: 0,069%) (42)



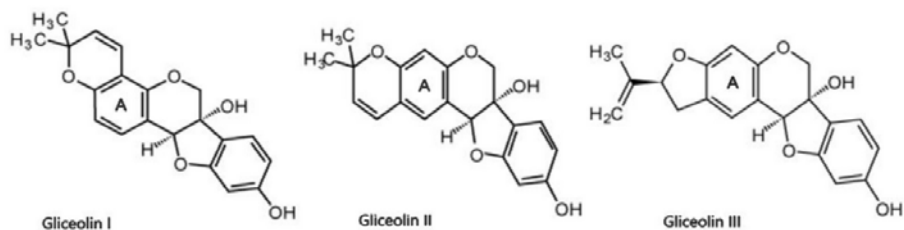
Slika 19: 4-hidroksihalkon (RBA: 0,0028%) (42)

Izvedli so tudi *in vitro* proliferacijski preizkus na celicah MCF-7, in sicer z **izolikviritigeninom**, kjer so dokazali, da ta pri nizkih koncentracijah ($\leq 1 \mu\text{M}$) stimulira proliferacijo od ER α odvisnih MCF-7 celic raka dojke, medtem ko ima pri višjih koncentracijah citotoksičen učinek ($\geq 10 \mu\text{M}$) (40).

VEZAVA PTEROKARPANOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

Pomembna podskupina izoflavonov so tudi pterokarpani, oz. z okužbo inducirani fitoaleksini, med katere štejemo glicinol, gliceolidin I in II, gliceolin I, II, III, IV, medikarpin, bitukarpin A in B, eritrabisin II in ostali.

Daidzein predstavlja prekursorsko molekulo za glicinol, ta pa je nadalje prekursor trem različnim gliceolinom (I, II, III), ki so medsebojno strukturno zelo podobni (40). Razlikujejo se le v velikosti obročev ter poziciji zadnjega obroča, ki je pripojen na obroč A (Slika 20). Te strukturne razlike se lahko odražajo v različnih bioloških učinkih teh spojin (50).

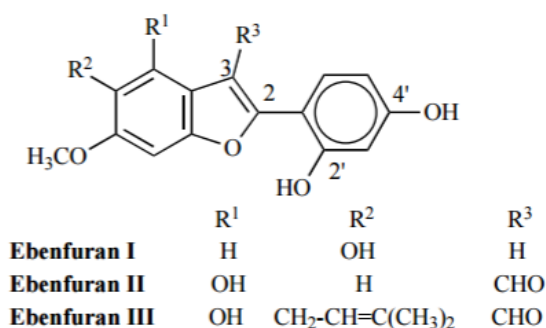


Slika 20: Izomeri gliceolina (56)

V številnih *in vitro* eksperimentih se je kot izomer z antiestrogenim delovanjem izkazal **gliceolin I**, ki je izražal tudi najvišjo afiniteto do ER α , in sicer z IC₅₀ vrednostjo $1,68 \mu\text{M}$. IC₅₀ vrednost za **gliceolin II** je znašala $6,57 \mu\text{M}$ in za **gliceolin III** $> 10 \mu\text{M}$, medtem ko je bila ta vrednost za mešanico gliceolinov mnogo nižja, in sicer $1,46 \mu\text{M}$ (52). Tako mešanica gliceolinov kot tudi vsaka posamezna izomerna oblika gliceolina, imajo višjo afiniteto do ER α kot pa do ER β konformacije. Tega s programsko opremo Endocrine Disruptome nismo potrdili, saj smo večjo verjetnost interakcije napovedali za ER β . Kljub antiestrogenemu delovanju gliceolinov ima **glicinol** estrogeno delovanje, kar so dokazali s poskusom na MCF-7 celicah (53). Glicinol je v veliki meri induciral tranaktivacijo ER, in sicer v območju koncentracij med 100 nM in $10 \mu\text{M}$. Medtem pa je že pri koncentraciji $1 \mu\text{M}$ povzročil celično proliferacijo. IC₅₀ vrednosti glicinola sicer znašajo za ER α $0,014 \mu\text{M}$ in za ER β $0,009 \mu\text{M}$ (54).

VEZAVA BENZOFURANOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

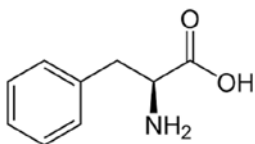
Arilbenzofurani (Slika 21) so zaradi prisotnosti treh OH skupin za odtenek bolj polarni kot ostali fitoestrogeni. Z *in vitro* eksperimentom ugotavljanja vezave na receptorje so določili njihove afinitete vezave na ER, pri čemer je znašala vrednost RBA za **ebenfuran I** 0,29% in za **ebenfuran II** 0,28%, medtem ko se je **ebenfuran III** izkazal kot neaktiven (40). Z večjo vrednostjo RBA ebenfurana I se skladajo tudi naši rezultati. Izračunani IC₅₀ vrednosti za ebenfuran I in II znašata 0,046 μM in 0,043 μM. Njuno delovanje so preučeval Katsanou in sodelavci ter ugotovili, da oba stimulirata proliferacijo MCF-7 celic že pri 10 μM, medtem ko jo pri višjih koncentracijah zavirata. Ebenfuran III pa je pri vseh uporabljenih koncentracijah deloval inhibitorno na proliferacijo (40).



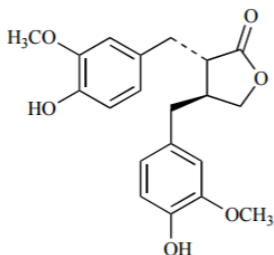
Slika 21: Ebenfuran I, II, III (40)

VEZAVA LIGNANOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

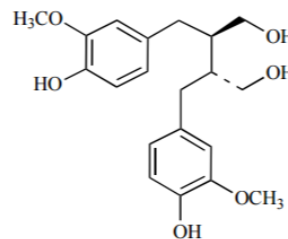
Lignani so derivati fenilalanina (Slika 22), med katere štejemo **matairezinol** (Slika 23), **sekoizolaricirezinol** (Slika 24), **pinorezinol**, **izolaricirezinol** in **laricirezinol**. Ti se pod vplivom bakterij, prisotnih v kolonu, metabolizirajo do enterodiola in enterolaktona. Za enterolakton so s poskusom premestitve radioaktivno označenega liganda določili vezavo na ER, in sicer IC₅₀: 130 μM za ERα in 99 μM za ERβ (40).



Slika 22: Fenilalanin



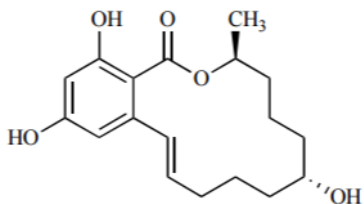
Slika 23: Matairezinol (40)



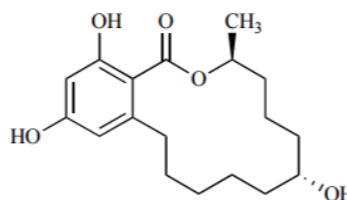
Slika 24: Sekoizolaricirezinol (40)

VEZAVA MIKOESTROGENOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

Mikotoksini so sekundarni metaboliti plesni, ki so odgovorni za številne bolezni pri ljudeh in živalih. **Zearalenon**, ki ga najdemo v koruzi, pšenici in ovsu, je eden izmed najmočnejše zastopanih mikotoksinov. Sestavljen je iz aromatskega obroča, spojenega z makrocikličnim laktonom. V jetrih se metabolizira (reducira) do dveh enantiomerov, in sicer do α - in β -zearalenola. Fang in sodelavci so ugotovili, da imata **α -zearalenol** (Slika 25) in **α -zearalanol** (Slika 26) okoli 100-krat višje vrednosti RBA, v primerjavi z β izomeri (RBA α -zearalenola je znašala 43%, α -zearalanola pa 30%; β -zearalenola 0,20% ter β -zearalanola 0,64%) (40). *In silico* rezultati, pridobljeni z našim programom se z omenjenim ne skladajo, saj so izračunane vezavne afinitete tako α - kot tudi β -zearalenola bile medsebojno primerljive.



Slika 25: α -zearalenol (40)



Slika 26: α -zearalanol (40)

Alkoholna derivata, α -zearalenol in α -zearalanol, sta strukturno podobna endogenemu estradiolu, in sicer v smislu ustrezne razdalje med atomoma kisika (okoli 11,0 Å). Ta razdalja je pri **β -zearalanolu** in **β -zearalenolu** krajša za 1 Å. Z molekulskim modeliranjem in rentgenskim slikanjem kristalnih struktur ER β in ER α so ugotovili, da se zearalenon in α -zearalanol vežeta na aktivno mesta receptorja na podoben način kot estradiol (fenolni obroč zasede enako regijo kot A obroč endogenega estradiola), vendar izražata manjšo stopnjo aktivnosti, saj so za popolno vezavo potrebne tudi različne konformacijske spremembe (40).

VEZAVA STILBENOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

Namočnejše zastopan izmed stilbenov je vsekakor **resveratrol**, katerega odlikuje njegovo antioksidativno, protivnetno in anti-trombotično delovanje ter blagodejen vpliv na zdravje. Zaradi strukturne podobnosti resveratrola z dietilstilbestrolom (DES), sinteznim estrogenom, so delovanje resveratrola ovrednotili na ER pozitivnih celicah MCF-7. Prišli so do spoznanja, da se resveratrol kompetitivno veže na ER, in sicer z IC₅₀ vrednostjo 10

μM (proti $0,001 \mu\text{M}$ estradiola). Gre za spojino z nizko vezavno afiniteto na ER (40), kar potrjujejo tudi naši rezultati. Kljub vsemu ostaja njegov estrogenski učinek kontroverzen. Pri ER-pozitivnih MCF-7 celicah in T47D celicah ima resveratrol namreč vlogo superagonista, kar pomeni, da inducira aktivnost reporterskega gena do višjega nivoja kot pa estradiol. Po drugi strani pa sproži pri drugih tipih celic manj učinkovit ali enak učinek kot estradiol. S študijami na sesalčjih celičnih linijah so dokazali, da je lahko v primeru odsotnosti estradiola, njegovo delovanje agonistično ali antagonistično. Če pa je hormon prisoten, pa deluje resveratrol antiestrogeno že pri koncentraciji 1 nM . Pri določanju selektivnosti vezave na receptorske izoforme so ugotovili, da naj bi se resveratrol vezal nanju s podobnima afinitetama, kar je glede na ostale fitoestrogene dokaj nenavadno, saj se ti preferenčno vežejo na β konformacijo ER. Naši rezultati tega niso potrdili, saj kljub temu, da sta bili za obe izoformi napovedani majhni verjetnosti interakcije z ER, je bila verjetnost vezave na $\text{ER}\alpha$ večja. Prav tako naj v nasprotju z $\text{ER}\alpha$ ne bi izkazoval estrogenskega antagonističnega delovanja na $\text{ER}\beta$ (40). Tudi tega z našimi rezultati ne moremo potrditi, saj je bila verjetnost vezave na antagonistično konformacijo $\text{ER}\alpha$ in $\text{ER}\beta$ skoraj enaka.

Metabolizem resveratrola poteka s pomočjo citokroma CYP450, ki katalizira reakcijo hidroksilacije ter ga pretvori v **piceatanol**. Slednji naj bi že pri nizkih koncentracijah ($0,05 \mu\text{M}$) spodbujal proliferacijo estrogensko odvisnih MCF-7 celic raka dojke, pri višjih ($> 25 \mu\text{M}$) pa zmanjšal rast rakavih celic (40).

VEZAVA OSTALIH FENOLOV NA ESTROGENSKE RECEPTORJE

Trans-anetol je fenolni eter, za katerega so z *in vitro* kompetitivnim $\text{ER}\alpha$ testom dokazali, da tudi v milimolarnih koncentracijah ne more izpodriniti vezanega estradiola z receptorja. Kljub temu pa se eden izmed njegovih glavnih metabolitov, **4-hidroksi-1-propenilbenzen** (4OHPB), kompetitivno veže na ER, in sicer z $\text{IC}_{50} \sim 10 \mu\text{M}$ (40). Z našim programom smo za *trans*-anetol za vse izoforme ER predvideli majhno verjetnost vezave. Med fenolne spojine sodi tudi **evgenol**, ki je glavna sestavina eteričnega olja, ki ga najdemo pretežno v nageljnovih žbicah. Odlikuje ga njegovo antibakterijsko, protiglivično, protivirusno, protivnestno, antioksidativno ter protirakavo delovanje. Kot spojina s protirakavim delovanjem se je izkazal tudi v *in vitro* testiranju na MCF-7 celicah. Evgenol je namreč inhibiral celično proliferacijo ter induciral apoptozo MCF-7 celic. Njegova biološka

aktivnost je verjetno posledica antagonističnega delovanja na ER, in sicer z IC_{50} vrednostjo 22,75 μ M (40, 55, 56).

Fitoestrogene lahko torej razvrstimo glede na moč vezave na estrogene receptor, in sicer so mikoestrogeni tisti z najvišjimi vrednostmi RBA, sledijo kumestran, nato flavonoidi in nazadnje halonoidi. Estrogeno delovanje flavonoidov (daidzein, apigenin, kamferol, naringenin, furetin) sovpada s 100–500-krat nižjimi vezavnimi afinitetami v primerjavi z afiniteto endogenega estradiola.

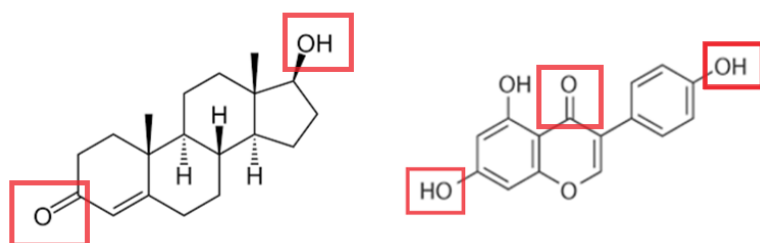
Program je sicer največjo oziroma visoko afiniteto vezave na agonistično konformacijo receptorja ER α predvidel za 28% testiranih polifenolov in 10% za njegovo antagonistično konformacijo. Za ER β pa smo za 15 % spojin napovedali veliko verjetnost interakcije z receptorjem ter za ER β an 21 %. Majhno verjetnost vezave negativne kontrole smo napovedali pravilno, medtem ko smo pri pozitivni kontroli, v našem primeru BPA, napovedali le majhno do srednjo verjetnost vezave ligandov. Rezultati kažejo, da ima genistein v primerjavi z BPA večjo afiniteto do ER, saj je pozitivna kontrola šibkejši ligand za ta receptor in ga program ne klasificira kot spojino z največjo verjetnostjo vezave. BPA (bisfenol A) je sicer ena izmed najbolj raziskanih spojin, ki dokazano deluje na številne jedrne receptorje, in sicer AR, ER, TR ter PPAR (40).

4.2.1.2. VEZAVA POLIFENOLOV NA ANDROGENSKI RECEPTOR

VEZAVA IZOFLAVONOIDOV NA ANDROGENSKI RECEPTOR

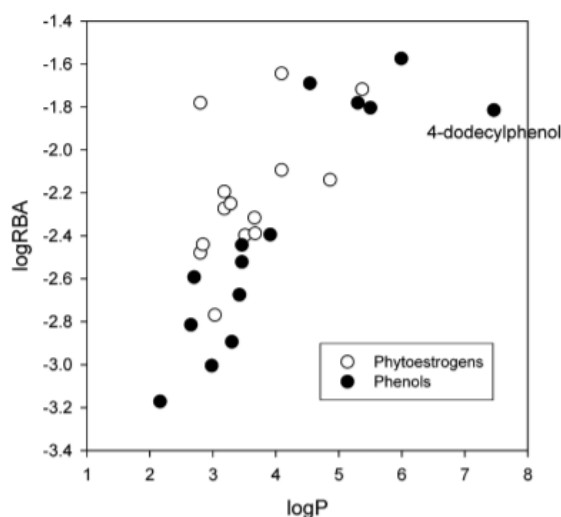
Vlogo androgenega receptorja velikokrat povezujemo s težavami s prostato, saj sodeluje pri razvoju in rasti celic raka prostate. **Genistein** predstavlja pomembno spojino naravnega izvora, ki preko različnih signalnih poti zavira delovanje AR ter tako deluje protitumorno. Glede na rezultate pridobljene z *in silico* metodami naj bi se genistein dobro prilegal LBD domeni AR. Z *in vitro* poskusi pa tega niso povsem dokazali, saj pri koncentracijah od 1 pM do 10 μ M niso opazili nikakršnih učinkov na AR (57). V večini teh študij so uporabili celične linije LNCaP, ki mogočajo vezavo tudi drugim, steroidom podobnim molekulam. Glede na strukturno podobnost testosterona in genisteina, predstavlja slednji potencialni ligand za AR. V študiji, kjer so uporabili fiziološke koncentracije genisteina, se je proliferacija LNCaP celic na AR povečala. Odziv LNCaP celic na genistein je bil dvofazen, in sicer je celično proliferacijo stimuliral pri fiziološki koncentraciji (< 10 μ M) ter jo inhibiral pri koncentracijah, višjih od 25 μ M (58).

Za **genistein** in **daidzein** je naš program napovedal največje verjetnosti vezave, in sicer tako na agonistično kot tudi na antagonistično konformacijo jedrnega receptorja AR. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da imajo največjo vezavno afiniteto na AR prav spojine, s prisotno hidroksilno ali ketonsko skupino ali prisotnimi reduciranimi dvojnimi vezmi. Verjetnost vezave večine preučevanih polifenolov na AR, ki smo jo napovedali s programom Endocrine Disruptome je prav tako v območju najvišje do visoke verjetnosti. Glede na strukture preučevanih polifenolov, ki so z vsebovanimi hidroksilnimi ali ketonskimi skupinami dokaj podobne molekuli testosterona, je to tudi pričakovano (Slika 27). Kljub temu, pa se na *in silico* rezultate ne moremo povsem zanesti, saj pri teh ne upoštevamo vpliva biološke uporabnosti. Prav ta je namreč odgovorna za izražanje učinkov fitoestrogenov v *in vivo* sistemu, kateri pa niso popolnoma skladni z našimi *in silico* rezultati.



Slika 27: Strukturna primerjava testosterona in genisteina

Vrednosti RBA fitoestrogenov dokaj dobro korelirajo z vrednostmi logP. Spojine, ki se na receptor ne vežejo, imajo nizke vrednosti logP, zato je omenjeni koeficient za vezavo na AR odločilnega pomena (Slika 28). Kljub temu pa prevelika hidrofobnost spojine ne doprinaša k vezavi na receptor (primer 4-dodecilfenola) (57).



Slika 28: logP v primerjavi z logRBA na AR (57)

Poleg tega imajo fitoestrogeni sposobnost tvorbe H-vezi. To lahko pojasni nizko vezavno afiniteto **kumestrola** do AR, v primerjavi z visoko vezavno afiniteto do ER. Posledica majhne hidrofobnosti je zmanjšana vezavna afiniteta do jedrnega receptorja, česar entalpija, pridobljena preko ene H-vezi, ne more kompenzirati. Sposobnost tvorbe H-vezi in pravilno razmerje hidrofobnosti imajo torej pomembno vlogo pri vezavi molekul na AR (57).

Preglednica XIV: Podatki vezave polifenolov na AR (RBA se nanaša na AR agonista, R1881 ([17 α -metil-3H]-metiltrienolon)) (57)

	IC ₅₀ (μ M)	logP	RBA (%)	logP (Endocrine Disruptome)
kumestrol	>42,8	1,57	NB	2,77
ekvol	75	3,67	0,0041	2,82
genistein	84,5	2,84	0,0036	2,58
zearalenon	42,2	4,86	0,0073	3,58
β-zearalenol	38	4,09	0,0081	3,37
4-hidroksilhalkon	48	3,18	0,0064	3,29

VEZAVA NARAVNIH POLIFENOLOV NA TIROIDNI RECEPTOR

Eden izmed pomembnejših jedrnih receptorjev je tiroidni receptor (TR), preko katerega je posredovano delovanje tiroidnega hormona (TH). Po vezavi tiroidnega hormona na TR regulira številne biološke procese, ki predstavljajo osnovo za rast, razvoj ter diferenciacijo,

predvsem pa za razvoj možganov. S številnimi študijami so potrdili, da endokrini motilci motijo vezavo TH na TR ter s tem posledično vplivajo na njegovo signalizacijo, pride lahko tudi npr. do upada koncentracije TH v krvnem obtoku, do motenj v celični rasti ter funkciji TR. Tudi spojine, ki se vežejo na ER, lahko vplivajo na nevroendokrini razvoj, in sicer preko povezav med ER in TR. S predkliničnimi študijami na živalih so dokazali povečano koncentracijo serumskega tiroksina T4 kot posledico uživanja sojinih proteinov ali izoflavonoidov. Sojo, ki je bogat vir fitoestrogenov, so povezali z razvojem golšavosti ter s tem povečanim tveganjem za razvoj raka ščitnice (59).

Na celični liniji GH3 so preiskovali učinke posameznih fitoestrogenov ter njihovih zmesi (60). Od tiroidnega hormona odvisna celična rast podganskih tumorskih hipofiznih celic (GH3 celična linija; T-screen preizkus) predstavlja uporabno metodo za *in vitro* vrednotenje agonističnih ali antagonističnih lastnosti spojin na TR. Njihova rast je povsem odvisna od aktivnosti tiroidnega hormona T3. Stimulatorni učinek T3 na rast je odvisen od intracelularno izraženih TR, ki po vezavi s TH in vezavi na tiroidni odzivni element (TRE; thyroid hormone response elements) v celičnem jedru, vodijo do izražanja genov ter celične rasti. Interakcija spojin s TR lahko ima agonistične učinke, ki privedejo do povečane celične rasti oz. njihove proliferacije, medtem ko ima vezava T3 na TR ali vezava antagonistov na TR za posledico inhibitorne učinke na celično rast. Omejitev tega preizkusa je ta, da lahko z njim zaznamo tudi druge spojine, ki bi lahko sprožile proliferacijo celic preko direktne vezave na TR ter preko sekundarnih signalnih poti. Očitno je torej, da je rast GH3 celic odvisna od T3 hormona, vendar je v bazalno rast ter v T3 inducirano rast GH3 celic vključen tudi ER, najverjetneje gre za posledico učinka povečanja ER v odvisnosti od T3. Vsekakor pa ne smemo izključiti možnosti, da je regulacija celične rasti s fitoestrogeni, odvisna le od odziva TH (59).

Pri najnižjih testnih koncentracijah (10^{-4} μ M) so **genistein**, **daidzein** in **ekvol** zmanjšali proliferacijo GH3 celic. Pri višjih koncentracijah pa sta tako Zmes 1 (ekvimolarna zmes genisteina, daidzeina in ekvola) kot tudi njene posamezne komponente povečali proliferacijo teh celic, in sicer sorazmerno v odvisnosti od koncentracije. Zmes 2 (ekvimolarna zmes **formononetina** in **biokanina A**) in Zmes 3 (ekvimolarna zmes **enterolaktona** in **enterodiola**) sta pri najnižjih testnih koncentracijah znižali GH3 celično proliferacijo. Pri najvišjih necitotoksičnih koncentracijah pa sta Zmes 2 (10^{-6} M) in Zmes 4 (ekvimolarni **sekoizolaricirezinol**, **matairezinol**, **laricirezinol** in **pinorezinol**) (10^{-5} M) signifikantno povečali proliferacijo (59).

Kompetitivni učinek fitoestrogenov na s T3 povzročeno GH3 proliferacijo celic pa so preiskovali s sočasno aplikacijo fitoestrogenov ter 0.5 nM T3. Izkazalo se je, da so pri višjih koncentracijah posamezni fitoestrogeni ter Zmesi 1 in 2, potencirali učinek s T3 povzročene proliferacije GH3 celic, medtem ko opaznih učinkov Zmesi 3 in 4 na proliferacijo celic ni bilo opaziti. Zmes 1 je v odsotnosti T3 izzvala od odmerka odvisno proliferacijo celic (Preglednica XV) (59).

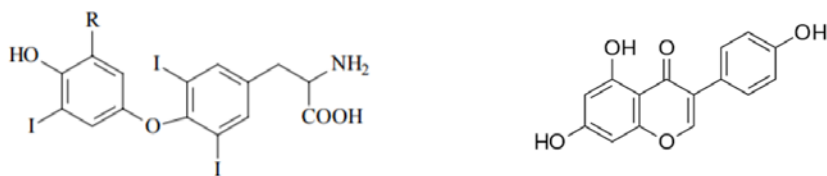
Preglednica XV: EC₅₀ in relativni proliferacijski učinek polifenolov ter hormona T3 (RPrE% : relativni proliferacijski učinek (razmerje med maksimalno celično rastjo, ki jo povzroči testna spojina in T3-EC₁₀₀; EC₁₀₀: koncentracija, pri kateri je učinek največji)

	EC ₅₀ (μM)	RPrE%	RPrE% +T3
T3	6*10 ⁻⁴	100	
kumestrol	2,3*10 ⁻³	33	134
genistein	0,011	34	124
daidzein	0,12	31	145
ekvol	0,014	31	134

Za **genistein** smo s programom Endocrine Disruptome sicer napovedali visoko verjetnost vezave na TR, in sicer tako za TRα kot tudi za TRβ. Za **daidzein** pa smo predvideli visoko verjetnost vezave na TRα ter srednjo verjetnost vezave na TRβ. TRβ je jedrni receptor, na katerega se selektivno veže T3, zato bi se lahko povečana aktivnost le-tega odražala v povišani serumski koncentraciji T3. Slednja je lahko povečana tudi zaradi vezave agonistov na jedrni receptor. Z našim programom smo za večino testiranih spojin napovedali visoko, do srednje visoko verjetnost vezave na TRβ. Pomembno vlogo pri vezavi T3 in T4 na tiroidne receptorje imajo hidroksilna in karboksilna skupina, prisotne v strukturah preučevanih spojin. Ti funkcionalni skupini sta pri naših testnih spojinah nemalokrat prisotni, zato je rezultat *in silico* metode tudi pričakovan.

VPLIV IZOFLAVONOIDOV NA TIROKSIN PEROKSIDAZNO AKTIVNOST

Ker so nekateri izoflavonoidi strukturno zelo podobni hormonoma T3 in T4 (Slika 29), bi lahko potencialno vplivali na hipotalamus-hipofizni povratni sistem.

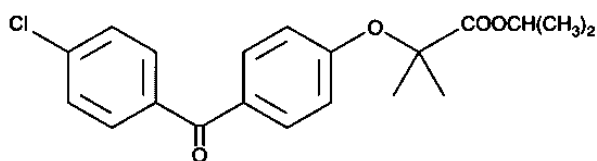


Slika 29: Struktura T3 (R=H) in T4 (R=I) (61) ter genisteina

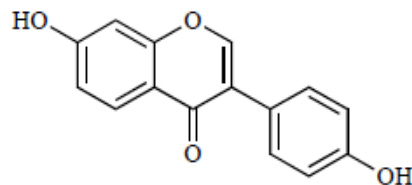
Genistein in **daidzein** inhibirata encim tiroperoksidazo, ki katalizira jodinacijo in biosintezo tiroidnih hormonov, kar so potrdili z *in vivo* eksperimentom na podganah, obenem pa niso opazili kakršnihkoli drugih negativnih učinkov na delovanje ščitnice. Zaradi posrednega delovanja estrogenov na ščitnico so podvomili tudi v neželene učinke fitoestrogenov, saj podatki študij tukaj niso povsem enotni. Faktorji tveganja, kot so pomanjkanje joda in subklinični hipotirodizem, lahko namreč povečajo dovzetnost posameznikov za potencialne neželene učinke sojinih izoflavonov na delovanje ščitnice (62). Že dolgo časa je znano, da so dojenčki, ki so jih hranili s sojinimi nadomestki mleka, in ki niso zaužili zadostnih količin joda, razvili hipotirodizem in golšavost. Kljub temu pa imajo fitoestrogeni številne koristne učinke, npr. lignani, ki ščitijo pred nastankom raka ščitnice (62).

4.2.1.3. VEZAVA POLIFENOLOV NA OSTALE JEDRNE RECEPTORJE

Fitoestrogeni lahko aktivirajo tudi receptorje iz družine PPAR, predvsem PPAR α in PPAR γ . S peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor α spada v skupino jedrnih receptorjev, ki jih aktivirajo z ligandom aktivirani transkripcijski dejavniki. Slednji kontrolirajo transkripcijo številnih genov, vključenih v metabolizem lipidov. Aktivacija tega receptorja namreč poveča β -oksidacijo maščobnih kislin in zmanjša nivo lipidov v krvnem obtoku ali v celici (63). Preko teh receptorjev fitoestrogeni izboljšajo stanje hiperlipidemije in kardiovaskularnih bolezni, vplivajo na metabolični sindrom in diabetes tipa 2. Izoflavoni in njihovi metaboliti delujejo kot agonisti PPAR receptorjev. Še vedno pa ni povsem znano, ali lahko že s fiziološkimi koncentracijami dosežemo delovanje, posredovano preko PPAR (62). Fleksibilnost aktivnega mesta PPAR α omogoča vezavo številnih različnih ligandov. Ker je struktura izoflavonov (Slika 31) zelo podobna strukturi fibratov (Slika 30), ki se uporabljajo za zdravljenje hiperlipidemije ter diabetesa tipa 2, predstavljajo izoflavoni obetajočo se rešitev za omenjene zdravstvene težave (8).



Slika 30: Fenofibrat (64)



Slika 31: Daidzein (40)

Za določanje aktivnosti PPAR so se poslužili *in vitro* preizkusa na celicah raka materničnega vratu HeLa, transficiranih s himernim Gal-PPAR reporterskim genom. Specifični ligand PPAR α , spojina Wy14643, aktivira himerni Gal-PPAR α konstrukt z vrednostjo EC₅₀ 5 μ M. Na podoben način specifični ligand PPAR γ , pioglitazon, aktivira Gal-PPAR γ sistem, in sicer z EC₅₀ 3 μ M (65). S preizkusom na himernem Gal-PPAR α so določili EC₅₀ vrednosti nekaterih izoflavonoidov. Največjo biološko aktivnost so izkazali **genistein** (EC₅₀ 16 μ M), **formononetin** (EC₅₀ <1,0 μ M) ter **biokanin A** (EC₅₀ 1,3 μ M) (65). Biokanin A (EC₅₀ 3,7 μ M), formononetin (EC₅₀ 2,6 μ M) in genistein (EC₅₀ 23 μ M) so se izkazali kot najmočnejši tudi pri vezavi na PPAR γ (51). Biokanin A in genistein se med seboj razlikujeta le po eni metilni skupini, pozicionirani na fenolnem B obroču, zaradi česar je biokanin A aktivnejši v primerjavi z genisteinom (65).

Preglednica XVI: EC₅₀ vrednosti polifenolov za PPAR α / γ (65)

	PPAR α EC ₅₀ (μ M)	PPAR γ EC ₅₀ (μ M)
biokanin A	1,3	3,7
formononetin	<1,0	2,6
genistein	16	23
WY14643	5	/
pioglitazon	/	3

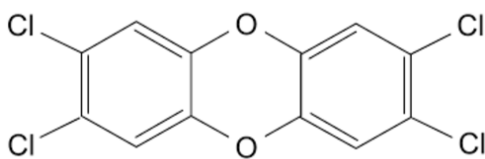
Naš program je za preučevane polifenole napovedal majhno verjetnost vezave na omenjene jedrne receptorje. Nekoliko večjo verjetnost je napovedal za kvercetin, 3,6,4'-trihidroksiflavon, naringenin, krizin, luteolin, apigenin ter kamferol.

Veliko slabše pa so raziskani učinki naravnih polifenolov na jedrne LXR in RXR receptorje. Program Endocrine Disruptome je za vse testirane spojine napovedal majhno

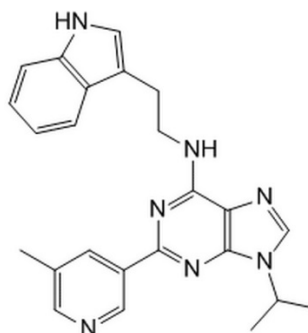
verjetnost vezave na receptorje LXR α , LXR β in RXR α . Poleg endokrine toksičnosti, posredovane preko jedrnih receptorjev, pa ne smemo zanemariti možnosti delovanja polifenolov preko drugih mehanizmov.

4.2.1.4. VEZAVA POLIFENOLOV NA AhR

AhR je od ligandov odvisen transkripcijski dejavnik. Aktivacija tega receptorja lahko sproži kaskado sekundarnih ali terciarnih sprememb v izražanju genov, kar lahko posledično vodi do karcinogenega, teratogenega delovanja, imunosupresije ter indukcije encimov (CYP1A1 in CYP1B1). Aktivirajo ga lahko raznovrstne kemijske spojine, od katerih je eden izmed bolj znanih agonistov zagotovo AhR TCDD oz. dioksin (Slika 32).



Slika 32: TCDD- agonist



Slika 33: GNF351, AhR antagonist (65)

S številnimi *in vitro* študijami pa so dokazali, da na omenjeni receptor delujejo tudi izoflavonoidi (59). S testnimi spojinami so izvedli *in vitro* preizkus AhR transkripcijske aktivacije in določili ali izbrana spojina aktivira ali inhibira AhR ter s tem posledično vpliva na izražanje genov. Pri tem so uporabili stabilno transficirane Hepa1.12cR celice. Pri preizkusu so flavonoide in izoflavonoide testirali posamično ter v prisotnosti TCDD (EC_{50} : $60 \cdot 10^{-6} \mu M$). Obseg transaktivacije so izmerili s pomočjo luciferazne aktivnosti, izražene v relativnih svetlobnih enotah na mikrogram celičnega proteina (RLUs/ μg na celični protein) (59). Agonistični učinek fitoestrogenov so določili z izpostavitvijo Hepa1.12cR celic posameznim fitoestrogenom in njihovim zmesem, in sicer brez dodanega TCDD-ja. Pri najvišjih testnih koncentracijah ($10 \mu M$) so kumestrol, genistein, daidzein in ekvol izzvali agonistični odziv AhR (Preglednica XVII). Izmed teh se je **kumestrol** z vrednostjo EC_{50} $1,8 \mu M$ izkazal kot najšibkejši agonist AhR, **ekvol** (EC_{50} $0,93 \mu M$), **genistein** (EC_{50} $0,28 \mu M$) in **daidzein** (EC_{50} $0,13 \mu M$), pa so izkazali agonistično aktivnost

že pri submikromolarnih koncentracijah. Za določanje antagonističnih učinkov polifenolov na aktivnost AhR pa so celice izpostavili tudi $60 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ TCDD-ja. Kumestol je kljub temu še naprej induciral transaktivacijo AhR.

Preglednica XVII: Vpliv fitoestrogenov na AhR transaktivacijo (LOEC: najnižja koncentracija, kjer je opazen učinek; MOEC: najnižja koncentracija, kjer je opazen maksimalni učinek)

	EC ₅₀ (μM)	LOEC (M)	MOEC (M)	LOEC + TCDD	MOEC + TCDD
TCDD	$7,7 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-12}$	10^{-9}		
kumestrol	1,8	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6} M	10^{-6} M
genistein	0,28	10^{-6}	10^{-5}		
daidzein	0,13	10^{-6}	10^{-5}		
ekvol	0,93	10^{-7}	10^{-5}		

S preizkusom transaktivacije AhR so torej dokazali agonistične učinke genisteina in daidzeina na AhR, ki pa v prisotnosti TCDD-ja na samo aktivnost receptorja nista imela nobenega vpliva. Kljub temu pa se literaturni rezultati razlikujejo glede na uporabljeno metodo. Z imunološkim preizkusom AhR so namreč v prisotnosti TCDD-ja potrdili rahlo inhibitorno delovanje genisteina in daidzeina (59). Omenjeno odstopanje lahko pripišemo razlikam v metodologiji dela, saj pri imunološkem preizkusu zaznavajo reaktivnost AhR s pomočjo dioksinov, pri čemer ne uporabljajo živih celic. Pri preizkusu transkripcijske aktivacije AhR pa gre za zaznavanje transaktivacije živih celic. Vzrok nastalim razlikam je lahko tudi encimski metabolizem spojin v mišjih hepatomskih celicah, zaradi česar bi lahko spojine v večji meri vplivale na transaktivacijo AhR (59).

Na podlagi *in vitro* študij lahko zaključimo, da imajo izbrani polifenoli v primerjavi z močnimi receptorskimi ligandi relativno nizek odstotek delovanja, zato bi bilo potrebno opraviti še številne študije, s katerimi bi lahko potrdili ali se učinki polifenolov odražajo tudi v *in vivo* sistemih ali ne (59).

4.2.1.5. VPLIV POLIFENOLOV NA AKTIVOST AROMATAZE, 17 β -HSD in 3 β -HSD

Aromataza, 3 β -HSD (3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza) in 17 β -HSD (17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza) so encimi, ki so ključnega pomena pri biosintezi ter metabolizmu hormonov. Odgovorni so za pretvorbo dehidroepiandrosterona (DHEA) ali 5-androsten-

3 β ,17 β -diola v 4-androsten-3,17-dion (Δ_4), estron (E1) ali estradiol (E2) ter nadalje za pretvorbo estrona v estradiol, ki je izrednega pomena pri razvoju raka dojke (48). Za določanje aktivnosti aromataze, 3 β -HSD in 17 β -HSD so uporabili testni sistem z mikrosomi placente, z radioaktivno označenim Δ_4 in DHEA (48). Ugotovili so, da izoflavonoidi s pripetim fenolnim obročem na poziciji 3 piranskega obroča (**kumestrol, genistein, daidzein, biokanin A**) inhibirajo 3 β -HSD in/ali 17 β -HSD veliko bolje kot pa aromatazo. Ravno nasprotno delovanje pa izkazujejo flavonoidi (**flavon, 7-hidroksiflavon, 7-metoksiflavon, 7,8-dihidroksiflavon, krisin, apigenin in naringenin**), in sicer inhibirajo aktivnost aromataze in /ali 17 β -HSD, ne pa tudi 3 β -HSD. Prisotnost hidroksilnih skupin flavonoidov na mestih 5 in 7 je za inhibicijo aromataze in 17 β -HSD nujno potrebna. Ta je prav tako odgovorna za inhibicijo 3 β -HSD in 17 β -HSD (genistein $\rightarrow$ daidzein). Hidroksilna skupina na mestu 4' je kritičnega pomena za inhibicijo delovanja 3 β -HSD in 17 β -HSD, kar so dokazali z metilacijo OH skupine (genistein $\rightarrow$ biokanin A ali daidzein $\rightarrow$ formononetin), pri čemer se je zmanjšalo inhibitorno delovanje na 3 β -HSD in 17 β -HSD (38). Omenjena razlika med izoflavonoidi in flavonoidi je posledica različne orientacije B fenolnega obroča na C piranskem obroču ter posledično drugačne orientiranosti spojin na vezavnem mestu. Metilacija mesta 4' poveča tudi inhibicijo aromataze (genistein $\rightarrow$ biokanin A). Poleg tega naj bi hidroksilirana substituenta izoflavonoidov na mestu 3' izkazovala nasprotno učinke na encime 3 β -HSD in 17 β -HSD (daidzein $\rightarrow$ 3',4',7-trihidroksiizoflavon) (48).

Preglednica VIII: IC₅₀ vrednosti fitoestrogenov na človeške encime placente (ND: inhibicija ni zaznana) (48)

	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
	aromataza	3β-HSD	17β-HSD
flavon	48	ND	ND
7-hidroksiflavon	0,2	ND	0,9
7-metoksiflavon	3,2	ND	ND
7,8-dihidroksiflavon	8	ND	ND
krisin	0,7	ND	3,6
apigenin	2,9	ND	0,3
naringenin	9,2	ND	15
kumestrol	25	>50	0,2
genistein	ND	2,9	1

daidzein	ND	10	10
biokanin A	49	10	4,9
formononetin	ND	>50	>50
prunetin	ND	ND	>50

Ostale *in vitro* študije, izvedene bodisi na prečiščenih ali rekombinantno pridobljenih encimskih preparatih, mikrosomih placente so pokazale, da so fitoestrogeni že pri nizkih koncentracijah povzročili 50 % inhibicijo encimske aktivnosti (IC₅₀).

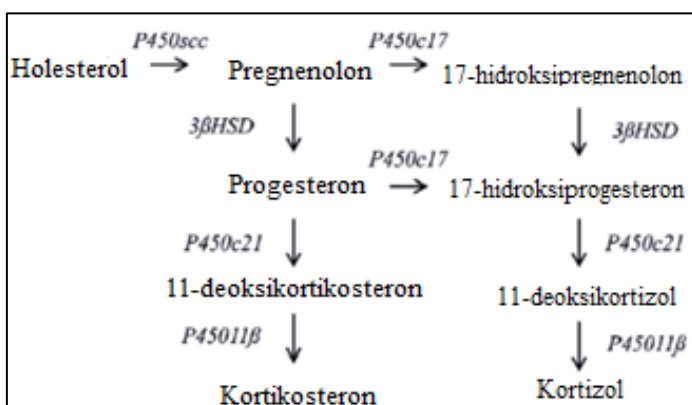
V študiji, izvedeni na humanih granuloznih celicah (GL), so dokazali inhibitorno delovanje **apigenina** na aromatazo in 17 β -HSD ter **genisteina** na 17 β -HSD. V tem testnem sistemu so se **zearalenon**, **kumestrol**, **kvercetin**, **biokanin A** in **apigenin**, izkazali za najmočnejše delujoče inhibitorje 17 β -HSD tipa V. Vendar pa se rezultati teh študij ne skladajo povsem s študijami, izvedenimi na brezceličnih sistemih (izoliranih encimih) ali rakavih celičnih linijah. Razlog za to je lahko v visoki encimski aktivnosti primarnih kultur celic GL. Prav tako niso poročali o akutnih učinkih fitoestrogenov na encimsko aktivnost, a je kljub temu bila inhibicija aromatazne aktivnosti očitna. Vzrok je lahko slaba lipidotopnost fitoestrogenov, zaradi česar je tudi permeabilnost celične membrane slabša ter upočasnen prenos molekule v samo celico. Možno je tudi, da se zaradi hitrega metabolizma spojin v neaktivne substance in njihove metabolite, spremeni izražanje/koncentracija intracelularnih steroidogenih encimov (66). **Naringenin** in **krizin** sta se pri ženskah z endometriozo izkazala kot močna inhibitorja aromatazne aktivnosti, medtem ko je bilo delovanje genisteina in daidzeina šibkejše. S pomočjo *in vitro* študij, na hepatocitih in mikrosomih placente, so to tudi dokazali. **Genistein** je v endometrijskih stromalnih celicah povečal aktivnost aromataze. Iz tega sklepamo, da delovanje genisteina na encimsko aktivnost ni direktno, ampak je posredovano preko aromataze, izražene v endometrijskih stromalnih celicah ali preko intermediatov aromatazne aktivnosti (68).

4.2.1.6. VPLIV POLIFENOLOV NA SINTEZO GLUKOKORTIKOIDOV

Z *in vitro* študijami na človeških fetalnih in postnatalnih adrenokortikalnih celicah, so dokazali inhibitorno delovanje **genisteina** in **daidzeina** na bazalno in z ACTH (adrenokortikotropni hormon)-stimulirano adrenokortikalno sekrecijo kortizola in kortikosterona (69). Genistein in daidzein sta zmanjšala z agonisti (ACTH ali cAMP)

stimulirano produkcijo kortizola že pri koncentraciji EC_{50} 1-4 μM . Pri poskusu na fetalnih adrenalnokortikalnih celicah sta bili tako bazalna kot tudi z ACTH-stimulirana produkcija DHEA-S (dehidroepiandosteron sulfat) visoki, torej je omenjena fitoestrogena nista spremenila. Nasprotno pa je genistein v postnatalnih adrenokortikalnih celicah povečal produkcijo DHEA-S in DHEA (70).

Poleg tega genistein in daidzein povečata tudi produkcijo androgena ter zmanjšata produkcijo glukokortikoidov. Sintezo kortizola namreč zmanjšata preko zaviranja encimske aktivnosti P450c21 (Slika 34), zato se sinteza DHEA/DHEA-S posledično poveča (70). Zaviranje sinteze kortizola naj ne bi imelo večjega vpliva na telo, saj je hipotalamus-hipofizno-adrenalna os izjemno občutljiva na zmanjšan nivo kortizola ter bi s povečanim izločanjem ACTH ohranila glukokortikoidno homeostazo (70). Genistein in daidzein na aktivnost P450c21 v človeških fetalnih celicah nista imela nikakršnega vpliva. Iz tega sklepamo, da encim P450c21 ni vključen v inhibitorno delovanje fitoestrogenov na adrenalno sintezo glukokortikoidov. Slednje se najverjetneje pojavi v kasnejših korakih steroidogeneze (69).



Slika 34: Vloga P450scc pri sintezi glukokortikoidov (povzeto po 70)

Ker so genistein, daidzein, formononetin in biokanin A odgovorni za inhibicijo mikrosomalne aktivnosti adrenalne 3β -HSD, lahko preko motenj adrenalne steroidogeneze na nivoju 3β -HSD negativno vplivajo na sintezo glukokortikoidov (69).

4.2.2. OCENA IZPOSTAVLJENOSTI

Plazemske koncentracije fitoestrogenov in njihovih metabolitov so preiskovali s številnimi študijami. Pri ljudeh, ki soje ne uživajo, se plazemske koncentracije izoflavonov nahajajo v nanomolarnem območju (<40 nM), medtem ko po njenem zaužitju pride do takojšnjega

porasta plazemskih koncentracij, ki se gibljejo znotraj mikromolarnega območja. Soja je razširjena predvsem v Azijski kulturi, kjer povprečno zaužijejo 50 mg izoflavonov na kg telesne mase na dan. Ta količina je znatno nižja v zahodnem svetu (ZDA), in sicer znaša približno 1 do 3 mg na kg telesne mase na dan (71). Tako se plazemske koncentracije genisteina pri Azijski populaciji gibljejo okoli 0,502 μM , pri Zahodni populaciji pa okoli 0,023 μM (Preglednica XIX) (71).

Preglednica XIX: Primerjava plazemskih koncentracij med Vzhodno in Zahodno populacijo (72, 73, 74)

	Plazemska koncentracija-zahodna populacija (μM)	Plazemska koncentracija-vzhodna populacija (μM)
genistein	0,023	0,502
daidzein	0,015	0,246
glicitein	0,012	0,170
ekvol	>0,020	0,057

Največje količine izoflavonoidov pa zaužijejo dojenčki, ki jih hranijo izključno s sojinimi nadomestki materinega mleka. To pomeni 6 do 9 mg izoflavonoidov na kilogram telesne teže dnevno, kar ima za posledico visoko koncentracijo slednjih v krvi (okoli 3,7 μM) (71). (Preglednica XX). Izpostavljenost višjim koncentracijam fitoestrogenov v obdobju razvoja otroka ima lahko za posledico motnje s plodnostjo ter vedenjske motnje. Nasprotno pa imajo

dojenčki, ki jih dojijo matere, oziroma jih hranijo s pripravki iz kravjega mleka, nizke koncentracije izoflavonoidov v krvi ($3,48 \cdot 10^{-2}$ in $1,74 \cdot 10^{-2}$ μM) (71). O dolgoročnih posledicah izpostavljenosti izoflavonom na reprodukcijsko sposobnost in plodnost so do sedaj žal izvedli le zelo malo epidemioloških študij.

Preglednica XX: Plazemske koncentracije genisteina pri ženskah in dojenčkih (71)

Plazemske koncentracije	Estradiol (μM)	Genistein (μM)
ženska populacija-zahod	$9,25 \cdot 10^{-4}$ - $6,6 \cdot 10^{-3}$ (folikularna faza)	$3,7 \cdot 10^{-3}$ - $7,4 \cdot 10^{-3}$ (folikularna faza)
	$5,18 \cdot 10^{-3}$ - $1,99 \cdot 10^{-2}$ (preovulatorni vrh)	$3,7 \cdot 10^{-3}$ - $7,4 \cdot 10^{-3}$ (preovulatorni vrh)
ženska populacija-Japonska		$2,67 \cdot 10^{-2}$ - $3,07 \cdot 10^{-1}$

dojenček-materino mleko	$<1,48 \cdot 10^{-4}$ - $2,96 \cdot 10^{-4}$	$7,4 \cdot 10^{-3}$ - $1,74 \cdot 10^{-2}$
dojenček-kravje mleko	$<1,48 \cdot 10^{-4}$ - $2,96 \cdot 10^{-4}$	$3,48 \cdot 10^{-2}$
dojenček-sojin pripravek	<0,04-0,08	684-757

Preglednica XXI: Izmerjene maksimalne plazemske koncentracije fitoestrogenov (26)

POLIFENOLI	VIR	KOLIČINA PREBAVLJENIH POLIFENOLOV	IZMERJENA MAKSIMALNA PLAZEMSKA KONCENTRACIJA (μM)
epigalokatehin galat	Zeleni čaj	105 mg	0,13-0,31
	Čista spojina	50-1600 mg	0,28-7,4
katehin	Rdeče vino	34 mg	0,072
	Čista spojina	0,36 mg/kg tt	0,14-0,49
	Črni čaj	140 mg	0,34
naringenin	Sok pomaranče	22,6-45 mg	0,06-0,2
	Sok grenivke	199 mg	5,99
	Čista spojina	135 mg	7,4
kvercetin	Jabolko	107 mg	0,3
	Čebula	100 mg	7,6
	Čista spojina	200 mg	1,1
daidzein	Sojino mleko	108 mg	0,47
	Sojin izvleček	0,28-0,84 mg/kg tt	1,7-9,0
	Čista spojina	50 mg	0,76
genistein	Sojino mleko	102 mg	0,41
	Sojin izvleček	2-16 mg/kg tt	3,4-25,4
	Čista spojina	50 mg	1,26
glicitein	Sojino mleko	114 mg	0,09
	Čista spojina	25 mg	0,72

Na podlagi napisanega vidimo, da sta v večini primerov prav genistein in daidzein tista, ki smo jima pretežno izpostavljeni. Glavni vir omenjenih izoflavonoidov je soja, ki v t.i »zdravih izdelkih« nastopa kot vir proteinov. Izoflavonoidi, prisotni v soji, so količinsko najbolj zastopani fitoestrogeni in jih prav zato smatramo, kot potencialne endokrine motilce. Genistein in daidzein sta strukturno zelo podobna endogenemu 17β -estradiolu ter kar jima omogoča delovanje na estrogenske ter androgenske receptorje. Seveda pa je le to odvisno od količine zaužitih fitoestrogenov, od genetskega polimorfizma vsakega posameznika ter tudi od možnih interakcij z zdravili. Vsekakor pa je potrebno omeniti tudi njihovo protektivno delovanje pred nastankom karcinomov, srčno-žilnih bolezni, sposobnost antioksidativnega delovanja, zaradi katerih je njihova raba v zadnjih letih, ko se poslužujemo trenda zdravega načina življenja, močno v porastu.

5. SKLEP

Na podlagi *in silico* napovedi endokrine toksičnosti polifenolov lahko zaključimo, da potencialna nevarnost endokrinega delovanja obstaja. Ta je posredovana predvsem preko estrogenskih receptorjev. S programom Endocrine Disruptome smo napovedali tudi samo verjetnost vezave polifenolov na jedrne receptorje. Dobljeni rezultati so bili precej podobni rezultatom *in vitro* in *in vivo* raziskav, vendar so za večjo zanesljivost *in silico* podatkov potrebne še dodatne raziskave. Ob pregledu *in vitro* ter *in vivo* raziskav, lahko glede na plazemske koncentracije ugotovimo naslednje:

Delovanje na ER

- Glede na literarne maksimalne plazemske koncentracije genisteina, ki se gibljejo v mikromolarnem območju (3,4-25,4 μM) ter vrednost EC_{50} , ki za $\text{ER}\alpha$ znaša 2 μM sklepamo, da genistein lahko deluje estrogeno.
- Z maksimalnimi plazemskimi koncentracijami genisteina, daidzeina prav tako sprožimo endokrino delovanje preko $\text{ER}\beta$. Koncentracije potrebne za doseganje polovice maksimalnega učinka znašajo za genistein 0,008 μM ter 0,08 μM za daidzein. Tudi naringenin, katerega maksimalne plazemske koncentracije se po obroku gibljejo okoli 5,99 μM , je tisti, ki aktivira $\text{ER}\beta$ (EC_{50} 0,7 μM).

Delovanje na AR

- *In vivo* določene maksimalne plazemske koncentracije genisteina po zaužitju obroka s sojo, ne dosegajo inhibitornih IC_{50} vrednosti. To se ne ujema z našimi rezultati, ki kažejo na visoko afiniteto genisteina do androgenskih receptorjev. Pri naši *in silico* metodi namreč nismo upoštevali pomembnega dejavnika, in sicer biološke uporabnosti. Zaradi tega se rezultati *in vitro* ter *in silico* metod razlikujejo od rezultatov *in vivo* študij. Slaba biološka uporabnost genisteina, oziroma izoflavonov na splošno, vpliva na izražanje učinkov fitoestrogenov v *in vivo* sistemu.

Delovanje na TR

- Maksimalne koncentracije daidzeina v plazmi (1,7-9,0 μM) pa inducirajo tudi TR. Vrednost EC_{50} daidzeina za TR je namreč 0,12 μM , kar pomeni, da ta koncentracija povzroči polovico maksimalnega učinka. Torej lahko z maksimalnimi koncentracijami tega izoflavonoida v krvi aktiviramo TR.

- Enako velja za genistein, katerega EC_{50} vrednost znaša $0,011 \mu M$. To koncentracijo po vnosu hrane tudi zlahka dosežemo.

Delovanje na PPAR

- Genistein sproži pri koncentraciji $16 \mu M$ polovico maksimalnega učinka na PPAR. To koncentracijo lahko dosežemo po obroku, bogatem s sojo, ko se plazemske koncentracije genisteina povečajo do $3,4-25,4 \mu M$.

Delovanje na AhR

- Z maksimalnimi plazemskimi koncentracijami daidzeina in genisteina pa dosežemo tudi aktivacijo AhR, pri čemer je EC_{50} vrednost genisteina $0,28 \mu M$ in daidzeina $0,13 \mu M$.

Na podlagi do sedaj znanih podatkov predpostavljamo, da je posebna pozornost glede vnosa fitoestrogenov s prehrano, potrebna predvsem pri dojenčkih in majhnih otrocih, na čigar razvoj lahko omenjeni fitoestrogeni negativno vplivajo. Skrb prav tako ni odveč pri posameznikih, ki uživajo večje količine soje. Še vedno pa ne vemo zagotovo, kakšni so dolgoročni vplivi fitoestrogenov na reproduktivne sposobnosti posameznika. Z nadaljnjimi študijami bo potrebno razjasniti učinke fitoestrogenov ter določiti odmerke, pri katerih le ti nastopijo, opredeliti njihove prednosti in slabosti ter poglobiti znanje o mehanizmih njihovega delovanja.

6. VIRI IN LITERATURA

- (1) Bartke A, Hiller-Sturmhöfel S: The Endocrine System, An Overview, Alcohol Health & Research World, vol. 22, 1998, str.: 153-164.
- (2) Humphrey PR, Maureen DM: Rang & Dale's pharmacology, 7th ed, Edinburgh: Churchill Livingstone, cop. 2012, str.: 777.
- (3) Predavanje pri farmacevtski kemiji 3: Agonisti, Agonisti, antagonisti antagonisti na receptorje (http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2011-12/Predavanja/Agonisti_antagonisti_1112.pdf), dostopano: 23.05.2017.
- (4) <https://www.tocris.com/pharmacology/nuclear-receptors> dostopano 12.09.2017.
- (5) Predavanje pri farmacevtski kemiji 3: Receptorji kot tarče učinkovin (http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2011-12/Predavanja/Receptorji1112.pdf), dostopano: 03.06.2017.
- (6) Barlow S, Bergman A, Damstra T, Kavlock R, Van Der Kraak G, Global assessment of the science of endocrine disruptors, An assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme, WHO, 2002.
- (7) Bergman A, Heindel J.J, Jobling S, Kidd K.A, Zoeller R.T, State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012, An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization, UNEP in WHO, 2013.
- (8) Farmacevtski vesnik, št. 4 (http://www.sfd.si/modules/catalog/products/prodfile/fv_st4_2005.pdf), dostopano: 12.09.2017.
- (9) Van der Velden VH, Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma, Mediators of Inflammation, 1998; 7(4), str.: 229-237.

- (10) Fauci SA, Hauser SL, Jameson JL, Kasper DL, Longo DL, Loscalzo J: Harrison's Principles of Internal Medicine, 2011, vol 1, 18 izdaja (<http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=331&Sectionid=40727147>), dostopano: 21.06.2017.
- (11) Dupuy C, Miot F, Rousset B, et al: Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion, 2015 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285550/>), dostopano: 22.06.2017.
- (12) Plahuta M, Toman J. M, Motilci endokrinega sistema - nevarnost za okolje in človeka, Proteus, 2014, 1/77, str.: 6-10.
- (13) Main KM, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE: Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common development disorder with environmental aspects, Human reproduction 2001, 16, str.: 972-978.
- (14) Sharpe RM, Skakkebaek NE: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet 1993; 341, str.: 1392-1395.
- (15) Martin M, McLachlan JA, Simpson E: Endocrine disrupters and female reproductive health. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2006, 20, str.: 63-75.
- (16) Ludolph AC, Schaumburg H, Spencer PS: Experimental and Clinical Neurotoxicology, Second Edition, Oxford University Press, New York, 2000, str.: 3-83.
- (17) Inadera H: The immune system as a target for environmental chemicals: Xenoestrogens and other compounds, Toxicology Letters 2006, 164, str.: 191-206.
- (18) Ahmed SA: The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. Toxicology 2000, 150, str.: 191-206.
- (19) Gibson DA, Saunders PTK: Endocrine disruption of oestrogen action and female reproductive tract cancers. Endocrine-Related Cancer 2014, 21: T13-T31.
- (20) Shoei-Lung Li S, Singh S: Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalates. International journal of molecular sciences 2012, 13, str.: 10143-10153.

- (21) Preedy VR, Watson RR, Zibadi S: Polyphenols in Human Health and Disease, Academic Press, 2013, str.: 502.
- (22) Evans R, Faust M, Kortenkamp A, Martin O, McKinlay R, Orton F and Rosivatz E: State Of The Art Assessment Of Endocrine Disrupters Final Report, 2011, str.: 7-11. (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf), dostopano: 17.06.2017.
- (23) Hurst RD, Stevenson DE: Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more?, Cellular and Molecular Life Sciences, 2007; 64 (22): 2900-2916 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726576>), dostopano: 18.06.2017.
- (24) Arnason JT, Ferraro ZM, Ferrier J, Gruslin A, Ly C, Yockell-Lelièvre J: The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development, Human Reproduction Update, 2015, 21(0), str.: 228-248.
- (25) Absorption, Distribution, Metabolism And Excretion Of Phytoestrogens: Inter-Individual Variation And The Role Of The Gut Microflora, (<https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/PEG-2000-09Annex1-ADME.pdf>), dostopano: 07.05.2017.
- (26) D'Archivio M, Di Benedetto R, Filesì C, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R, Polyphenols, dietary sources and bioavailability, 8 Ann Ist Super Sanità 2007 | Vol. 43, No. 4, str.: 348-361.
- (27) Appel CL, Martin KR, Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword, Nutrition and Dietary Supplements, 2010, volume 2, str.:1-12.
- (28) Benfenati E, Bigoni D, Cassano A, Manganaro A, Martin T, Piclin N, Pintore M, Young D, CAESAR models for developmental toxicity, Chemistry Central Journal 2010; 4 (suppl 1) , str.: 1-11.
- (29) <http://edcs.unicartagena.edu.co/>, dostopano: 12.09.2017.
- (30) Endocrine Disruptor Knowledge Base, (<http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EndocrineDisruptorKnowledgebase/default.htm>), dostopano: 12.05.2017.
- (31) <http://ctdbase.org/>, dostopano: 12.05.2017.

- (32) <http://cascade.projectcoordinator.net/projectweb/portalproject/Cascade%20Research.html>, dostopano: 12.05.2017.
- (33) <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/dart.htm>, dostopano: 12.09.2017.
- (34) <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm>, dostopano: 03.04.2017.
- (35) Raunio H, *In silico* toxicology – non-testing methods, *Frontiers in Pharmacology*, 2011, 2, Article 33, str.: 2-8.
- (36) <http://www2.epa.gov/aboutepa/about-national-center-computational-toxicology-ncct>, dostopano: 07.06.2017.
- (37) Mavri J, Plošnik A, Vračko M, Computational study of binding affinity to nuclear receptors for some cosmetic ingredients, *Chemosphere* 135 (2015), str.: 325–334.
- (38) Gobec S, Kolšek K, Mavi J, Sollner Dolenc M, Turk S, Endocrine disruptome - an open source prediction tool for assessing endocrine disruption potential through nuclear receptor binding. *Journal of chemical information and modeling*, 2014, vol. 54, iss. 4, str.: 1254-1267.
- (39) Gerhauser C, Pudenz M, Toth K: Impact of Soy Isoflavones on the Epigenome in Cancer Prevention, *Nutrients* 2014, 6(10), 4218-4272 (<http://www.mdpi.com/2072-6643/6/10/4218/htm>), dostopano: 12.05.2017.
- (40) Garai J, Lóránd T, Vigh E, Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens, *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17 (30) , str.: 3542-3574.
- (41) Blair R, Branham W, Dial LS, Fang H, Hass BS, Moland CL, Perkins R, Sheehan DM, Shi LM, Tong W, Xie Q, Structure-Activity Relationships for a Large Diverse Set of Natural, Synthetic, and Environmental Estrogens, *Chem. Res. Toxicol.* 2001, vol.14, no.3, str.: 280-294.
- (42) https://www.researchgate.net/figure/259355504_fig3_A-Chemical-structure-of-quercetin-myricetin-kaempferol-and-apigenin-The-B-rings-of, dostopano: 03.05.2017.

- (43) An J, Leitman CD, Lomri N, Scharschmidt TC, Tzagarakis-Foster C, Estrogen Receptor β -Selective Transcriptional Activity and Recruitment of Coregulators by Phytoestrogens, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 21, 2001, str.: 17808–17814.
- (44) Carlsson B, Corton CJ, Gustafsson AJ, Kuiper GGJM, Lemmen GJ, Saag PT, Safe SH, Van Der Burg B, Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β , *Endocrinology*, Vol. 139, No. 10, 1998, str.: 4252-4263.
- (45) Belcher ms, Zsarnovszky A, Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens, and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, Vol. 299, No. 2, 2001, str.: 408–414.
- (46) Handa RJ, Lephart ED, Lund TD, Setchell KD, Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: phytoestrogens, *ILAR J.* 2004;45(4), str.: 443-454.
- (47) Kwak HS, Park SY, Kim MG, Yim CH, Yoon HK, Han KO: Marked Individual Variation in Isoflavone Metabolism After a Soy Challenge Can Modulate the Skeletal Effect of Isoflavones in Premenopausal Women, *Journal of Korean Medical Science*, 2009; 24 (5), str.: 867-873.
(<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2009.24.5.867&vmode=PU>
[BREADER](#)), dostopano: 12.09.2017.
- (48) Champavier Y, Chulia AJ, Habrioux G, Le Bail JC, Effects of phytoestrogens on aromatase, 3β and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells, *Life Sciences*. 2000;66(14), str.: 1281-1291.
- (49) <http://biology.kenyon.edu/courses/biol63/chime2001/estrogen/FRAMES/estradiol.html>, dostopano: 13.08.2017.
- (50) https://www.researchgate.net/figure/44622097_fig1_Fig-1-Relative-binding-affinity-of-glyceollin-I-enantiomers-Competition-binding-curves, dostopano: 19.05.2017.
- (51) <https://www.omicsonline.org/2157-7064/images/2157-7064-3-119-g005.html>, dostopano: 04.07.2017.

- (52) Burow ME, Boué SM, Elliott S, Salvo VA, Tilghman SL, Williams KY, Zimmermann MC, et al.: Glyceollin I, a Novel Antiestrogenic Phytoalexin Isolated from Activated Soy, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2010, 332(1), str.: 35–45.
- (53) García-Lafuente E, Guillamón, A, Martínez, Rostagno MA, Villares A, Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009), str.: 2–29.
- (54) Boué SM, Burow ME, Elliott S, Payton-Stewart F, Tilghman SL, Williams KY, Zimmerman MC, et al.: Identification of the Potent Phytoestrogen Glycinol in Elicited Soybean (*Glycine max*), *Endocrinology*, 2009, 150(5), str.: 2446–2453.
- (55) Anita Y, Hanafi M, Istyastono EP, Kardono LB, Radifar M, Structure-based design of eugenol analogs as potential estrogen receptor antagonists. *Bioinformation*. 2012;8(19), str.: 901-906.
- (56) Alexandre Azevedo R, Corrêa de Melo T, Dias Câmara D.A, Diniz Soares Pessoa N, Fávero de Oliveira C, Kleber Ferreira A, Levyc D, Luiz de Sá Júnior P, Mesquita Pasqualoto F.K, Moreira Fonseca P.M, Pereira A, Pinheiro Araldi R, Ruizc J.L.M, Santos Costaa A, Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell *in vitro*, *Phytomedicine* 23, 2016, str.: 725–735.
- (57) Branham WS, Dial SL, Fang H, Hong H, Moland CL, Owens W, Perkins R, Sheehan DM, Tong W, Xie Q, Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor, *Chem Res Toxicol*. 2003 Oct;16(10), str.:1338-1358.
- (58) Bosland CM, Mahmoud AM, Parray A, Saleem M, Siddique HR, Yang W, Zhu T, Differential Effects of Genistein on Prostate Cancer Cells Depend on Mutational Status of the Androgen Receptor, *PLOS ONE* 8(10), 2013, str.: 1032-1040.
- (59) Bonefeld-Jørgensen EC, Ghisari M, Krüger T, Long M, Effects of selected phytoestrogens and their mixtures on the function of the thyroid hormone and the aryl hydrocarbon receptor, *Nutrition and Cancer*. 2012; 64(7), str.: 1008-1019.
- (60) <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/dart.htm>, dostopano: 03.07.2017.

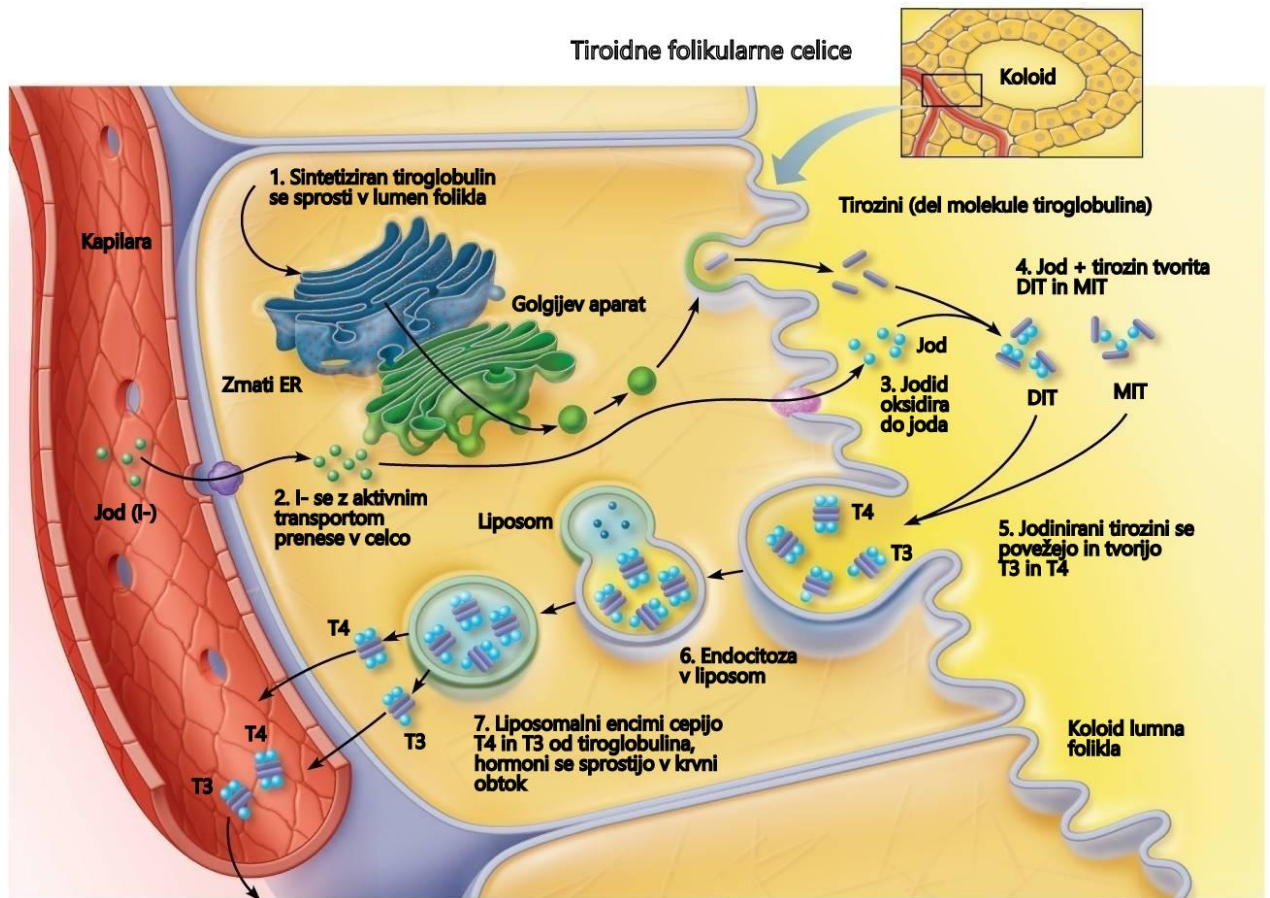
- (61) Thyroid Hormone Tutorial: The Thyroid And Thyroid Hormones (http://www.duc.auburn.edu/~deruija/endo_thyroidintro.pdf), dostopano: 15.06.2017.
- (62) Beekmann K, Louisse J, Rietjens CIMM, The potential health effects of dietary phytoestrogens, *British Journal of Pharmacology*, 2016, str.: 1263–1280.
- (63) Duck-Hee Kimc, Hye-Jin Shin, Ji Hyun Kimc, Mi-Ock Lee, Sujong K, Sun Young Kimc, Yong Sung Lee, Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR α , *Molecular and Cellular Endocrinology* 220, 2004, str.: 51–58.
- (64) <https://www.caymanchem.com/product/1000536>, dostopano: 11.09.2017.
- (65) Chan HY, Liu MH, Ng TJ, Shen P, Yong EM, Differential Effects of Isoflavones, from *Astragalus Membranaceus* and *Pueraria Thomsonii*, on the Activation of PPAR α , PPAR γ , and Adipocyte Differentiation *In Vitro*, *The Journal of Nutrition*, April 2006 , vol. 136 no. 4, str.: 899-905.
- (66) http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/AhR-Antagonist-III%2C-GNF351---Calbiochem,EMD_BIO-182707?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.si%2F&bd=1, dostopano: 10.08.2017.
- (67) Lacey M, Whitehead SA, Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: Evidence for FSH induction of 17 β -HSD, *Human Reproduction*, 2003, 18(3), str.: 487-494.
- (68) Agarwal SK, Crankshaw DJ, Edmunds KM, Foster WG, Holloway AC, The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells, *Reprod Nutr Dev*. 2005 Nov-Dec;45(6), str.:709-720.
- (69) Ciereszko R, Dusza L, Kaminska B, Kiezun M, *In vitro* effects of genistein and daidzein on the activity of adrenocortical steroidogenic enzymes in mature female pigs, *Journal of Physiology and Pharmacol*. 2013 Feb;64(1), str.:103-108.
- (70) Jaffe BR, Katz LS, Lee JY, Mesiano S, Phytoestrogens alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glucocorticoid and stimulate androgen

production by cultured adrenal cortical cells, J Clin Endocrinol Metab. 1999 Jul; 84(7), str.: 2443–2448.

- (71) Jefferson W, Patisaul BH, The pros and cons of phytoestrogens, Front Neuroendocrinol. 2010 Oct; 31(4), str.: 400–419.
- (72) Inoue M, Iwasaki M, Kurahashi N, Sasazuki S, Tsugane S: Plasma Isoflavones and Subsequent Risk of Prostate Cancer in a Nested Case-Control Study, The Japan Public Health Center, Journal of Clinical Oncology 2008 26:36, str.: 5923-5929.
- (73) Mattson MP: Diet — Brain Connections: Impact on Memory, Mood, Aging and Disease, Springer Science & Business Media, 2002, str.: 181.
- (74) Peeters HMP, Slimani N, Van der Schouw TY, Variations in Plasma Phytoestrogen Concentrations in European Adults, The Journal of Nutrition, Nutritional Epidemiology, vol. 137 no. 5, 2007, str.: 1294-1300.

7. PRILOGE

7.1. Priloga I



Slika 35: Sinteza tiroidnih hormonov (prirejeno po 12)