

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA MIHEVC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA MIHEVC

**OCENA ENDOKRINIH UČINKOV IN REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI
IZBRANIH NEOPIOIDNIH ANALGETIKOV Z UPORABO RAČUNALNIŠKIH
PROGRAMOV**

**ASSESSMENT OF ENDOCRINE EFFECTS AND REPRODUCTIVE TOXICITY
OF SELECTED NON-OPIOID ANALGESICS USING COMPUTER PROGRAMS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč, svetovanje in spodbudo pri pisanju magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm.

Hvala tudi družini in prijateljem za vso podporo in pomoč v času študija.

Izjava

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

Eva Mihevc

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

Član komisije: doc. dr. Ilija German Ilić, mag. farm.

Vsebina

1	Uvod.....	1
1.1	Bolečina in analgetiki	1
1.2	Neopioidni analgetiki.....	2
1.2.1	Paracetamol	2
1.2.2	Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine ali NSAID.....	3
1.2.2.1	Indometacin	4
1.2.2.2	Ibuprofen.....	5
1.2.2.3	Naproksen	5
1.2.2.4	Acetilsalicilna kislina.....	6
1.3	Endokrini sistem	7
1.3.1	Hormoni.....	8
1.3.2	Receptorji	8
1.4	Endokrina toksičnost.....	10
1.4.1	Endokrini motilci.....	10
1.5	Reproduktivna in razvojna toksičnost.....	11
1.6	<i>In silico</i> metode.....	12
1.6.1	Računalniški modeli	13
1.6.2	Napoved endokrine in reproduktivne toksičnosti.....	13
2	Namen dela	15
3	Materiali in metode	16
3.1	Izbrani analgetiki	16
3.2	Negativna in pozitivna kontrola.....	18
3.3	Uporabljeni računalniški programi in specifikacija nastavitev.....	19
3.3.1	Endocrine Disruptome.....	19
3.3.2	Vega QSAR	21
3.3.3	Derek Nexus	22
3.3.4	TEST.....	23
4	Rezultati in razprava	24
4.1	Napoved endokrine toksičnosti.....	24
4.1.1	Program Vega QSAR, model Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model	24

4.1.2	Program Endocrine disruptome	25
4.1.3	Razprava	27
4.1.3.1	Vezava na ER in AR	27
4.1.3.2	Vezava na ostale receptorje	30
4.2	Napoved različnih vidikov reproduktivne toksičnosti	31
4.2.1	Program Derek Nexus	31
4.2.2	Program Vega QSAR, model Developmental Toxicity model	31
4.2.3	Program Vega QSAR, model Developmental/Reproductive Toxicity library 33	
4.2.4	Program TEST	34
4.2.5	Razprava	35
4.2.5.1	Paracetamol	35
4.2.5.2	NSAID	37
4.3	Ocena varnosti izbranih analgetikov	43
5	Sklep	47
6	Literatura	49

Kazalo preglednic

Preglednica I: Izbrani analgetiki ter njihova struktura, IUPAC imena, CAS številke in SMILES kode	16
Preglednica II: Pozitivna in negativna kontrola ter njuni strukturi, IUPAC imeni, CAS številke in SMILES kodi	18
Preglednica III: Mejne vrednosti proste energije vezave (v kcal/mol)	20
Preglednica IV: Rezultati programa Vega QSAR za napoved endokrine toksičnosti kot posledica vezave na receptor ER za izbrane analgetike in kontroli	25
Preglednica V: Prosta energija vezave (v kcal/mol) izbranih analgetikov, pozitivne in negativne kontrole na jedrne receptorje	26
Preglednica VI: Rezultati programa Vega QSAR za napoved razvojne toksičnosti za izbrane analgetike in kontroli	32
Preglednica VII: Rezultati programa Vega QSAR za napoved razvojne/reproduktivne toksičnosti za izbrane analgetike in kontroli	33
Preglednica VIII: Napoved programa TEST za reproduktivno toksičnost izbranih analgetikov in kontroli	34

Preglednica IX: Povzetek terapevtskih plazemskih koncentracij pri ljudeh ter toksičnih učinkov in odmerkov/koncentracij pri katerih so v študijah opazili le-te 43

Kazalo slik

Slika 1: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura paracetamola	3
Slika 2: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura indometacina.....	4
Slika 3: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura ibuprofena.....	5
Slika 4: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura naproksena	6
Slika 5: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura acetilsalicilne kisline.	7

Povzetek

Bolečina je prvi odgovor na nevarnost in opozorilo za neobičajno dogajanje znotraj organizma. Neopioidni analgetiki, ki jih lahko dobimo tudi v lekarni brez recepta, so pogosto prva izbira pri zdravljenju bolečin. So varni, učinkoviti in pogosto uporabljeni, a vendar pri jemanju zdravil vedno obstaja določeno tveganje, ki ga ne predstavljajo samo znani neželeni učinki, ampak tudi njihovo širše delovanje. V zadnjih letih je vse več podatkov in raziskav, kako snovi vplivajo na endokrini sistem ter kakšna je njihova reproduktivna in razvojna toksičnost.

Paracetamol, indometacin, ibuprofen, naproksen in acetilsalicilno kislino smo izbrali kot predmet proučevanja magistrske naloge, saj lahko kljub temu, da veljajo za varno izbiro, povzročijo težave. S pomočjo računalniških programov, ki danes predstavljajo predstopnjo nadaljnjih *in vitro* in *in vivo* študij, smo pridobili rezultate o delovanju izbranih analgetikov na endokrini sistem, reproduktivne organe in sam razvoj zarodka ter jih primerjali z literaturnimi podatki. Rezultati kažejo, da se izbrani neopioidni analgetiki z majhno verjetnostjo vežejo na estrogenske receptorje, na androgenske receptorje pa imajo večji vpliv. Vplivajo lahko na pojav fizičnih nepravilnosti zarodkov, večjo pojavnost splavov, plodnost in spremenjeno hormonsko ravnovesje. Vezava na ostale jedrne receptorje je manj raziskana, zato je na voljo manj podatkov. Najmanj nevarna za reprodukcijo in razvoj sta najpogosteje uživana paracetamol in acetilsalicilna kislina, pri katerih je možen predvsem vpliv na testise, kvaliteto sperme in moško plodnost. Večjo nevarnost pa po zbranih podatkih predstavljata ibuprofen in naproksen. Ibuprofen vpliva na reprodukcijo pri ženskah in moških, vpliva pa tudi na rast in razvoj zarodka. Naproksen, za katerega so napovedi programov najslabše, naj bi vplival na ovulacijo, spermatogenezo in fizične nepravilnosti zarodka.

Podatki in pridobljeni rezultati torej kažejo na potencialne nevarnosti, povezane z uporabo proučevanih analgetikov. V ozir je potrebno vzeti predvsem povezavo med uporabljenimi koncentracijami/odmerki in vplivi, opaženimi v *in vitro* ter *in vivo* študijah na živalih in te rezultate nato skušati ekstrapolirati in uporabiti pri interpretaciji potencialnih učinkov na ljudeh. Neopioidne analgetike moramo jemati pametno in ko je to zares potrebno, saj obstajajo odprta vprašanja, na katera trenutno še nimamo zanesljivih odgovorov.

Ključne besede: neopioidni analgetiki, endokrini sistem, reprodukcija, razvoj, toksičnost

Abstract

Pain is the body's first response to danger and constitutes a warning that something unusual is happening in the human organism. Non-opioid analgesics, which can be bought in a community pharmacy without prescription and belong to the group of OTC drugs (OTC – over the counter) are often our first choice in pain treatment. They are safe, efficient and frequently used but some risk is always present, not only due to the known side effects but also due to their pleiotropic actions. In the past few years a lot of data has been generated and studies conducted focusing on endocrine disruptive potential, reproductive and developmental toxicity of analgesics.

In the scope of the Master's thesis, a selection of analgesics including paracetamol, indomethacin, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid was investigated. Namely, they are known to cause adverse effects despite being known as safe. Using different computer programs, we predicted safety profiles of selected analgesics, which revealed their influence on the endocrine system, reproductive organs and embryonic development. The obtained results were then compared with the available literature data. Results show that selected non-opioid analgesics bind to estrogen receptors with low probability but seem to have a greater impact on androgen receptors. They can increase the incidence of physical abnormalities of the embryos and the incidence of abortions, while they also have an impact on fertility and altered hormonal balance. Binding to other nuclear receptors has not been studied, therefore less data is available. Paracetamol and acetylsalicylic acid are classified as the least dangerous for reproduction and development, however they also showed certain potential to affect testicles, the quality of sperm and male fertility. According to data the greatest risk is posed by ingesting ibuprofen and naproxen. Ibuprofen affects reproduction in women and men and also the growth and development of the fetus. Naproxen, which exhibits the worst safety profile as predicted by the programs, is suggested to affect ovulation, spermatogenesis and physical abnormalities of the fetus.

Data and results indicate that certain risks associated with the use of analgesics do exist. It is necessary to take into account the link between the employed dose/concentration and the effects observed in studies. These results can later be used for better interpretation of potential effects in humans. Non-opioid analgesics should be used wisely and only when necessary, as open questions still remain, to which we do not have reliable answers yet.

Key words: non-opioid analgesics, endocrine system, reproduction, development, toxicity

Seznam okrajšav

ACP	angl. acid phosphatase, slov. kislja fosfataza
AGD	angl. anogenital distance, slov. anogenitalna razdalja
ALP	angl. alkaline phosphatase, slov. alkalna fosfataza
AMH	angl. anti-Müllerian hormone, slov. anti-Müllerjev hormon
AR	angl. androgen receptor, slov. androgenski receptor
ASA	angl. acetylsalicylic acid, slov. acetilsalicilna kislina
BPA	bisfenol A
CAS	Chemical Abstracts Service
COX	angl. cyclooxygenase, slov. ciklooksigenaza
DART	Developmental and Reproductive Toxicology
DNA	angl. deoxyribonucleic acid, slov. deoksiribonukleinska kislina
DoTS	Docking interface for Target Systems
EASIS	Endocrine Active Substances Information System
EDKB	Endocrine Disruptor Knowledge Base
EM	endokrini motilec
EPA	angl. Environmental Protection Agency, slov. Ameriška agencija za varstvo okolja
ER	angl. estrogen receptor, slov. estrogenski receptor
FDA	angl. Food and Drug Administration, slov. Ameriška agencija za hrano in zdravila
FERA	angl. Food and Environment Research Agency, slov. Britanska raziskovalna agencija za hrano in okolje
FGC	angl. fetal germ cells, slov. zarodne celice plodu
GR	angl. glucocorticoid receptor, slov. glukokortikoidni receptor
hCG	angl. human chorionic gonadotropin, slov. humani horionski gonadotropin

INN	angl. International Nonproprietary Name, slov. mednarodno nelastniško ime
IUPAC	angl. International Union of Pure and Applied Chemistry, slov. Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
LC50	angl. median lethal concentration, slov. povprečna smrtna koncentracija
LD50	angl. median lethal dose, slov. povprečen smrtni odmerek
LH	angl. luteinizing hormone, slov. luteinizirajoči hormon
LXR	angl. liver X receptor, slov. jetrni receptor X
NOAEL	angl. no-observed-adverse-effect level, slov. najvišji testni odmerek, pri katerem niso opazili nobenih negativnih učinkov
NSAID	angl. nonsteroidal anti-inflammatory drug, slov. nesteroidna protivnetna učinkovina
OTC	angl. Over-The-Counter, slov. zdravila dostopna brez recepta
PG	prostaglandin
PPAR	angl. peroxisome proliferator-activated receptor, slov. s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor
QSAR	angl. Quantitative Structure-Activity Relationship, slov. kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem
REACH	angl. Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, slov. Registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij
RNA	angl. ribonucleic acid, slov. ribonukleinska kislina
RTECS	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
RXR	angl. retinoid X receptor, slov. retinoidni receptor X
SAR	angl. Structure-Activity Relationship, slov. odnos med strukturo in delovanjem
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
TEST	Toxicity Estimation Software Tool
TR	angl. thyroid hormone receptor, slov. tiroidni receptor

1 Uvod

Vsak posameznik se je v svojem življenju verjetno vsaj enkrat srečal z bolečinami in posegel po sredstvih za lajšanje le-teh, analgetikih. Bolečina je najpogostejši vzrok za obisk zdravnika. Zdravila za omenjene težave nam najpogosteje predpiše zdravnik, nekatera pa lahko dobimo v lekarni tudi brez recepta. Neopioidni analgetiki veljajo za varna in učinkovita ter ene najpogosteje uporabljenih skupin zdravilnih učinkovin, a prav velika razširjenost in pogostost jemanja sta razloga, zaradi katerih premalokrat pomislimo na njihove stranske učinke.

Poleg najpogostejših stranskih učinkov, ki so navedeni v navodilih za uporabo, moramo pomisliti tudi na njihovo širše, nespecifično delovanje. Posredno lahko namreč vplivajo na delovanje različnih organov in sistemov človeškega telesa, posledice pa se lahko pokažejo šele čez čas. Zavedati se moramo dejstva, da je vsaka snov, ko preseže določeno koncentracijo, potencialno toksična.

V zadnjih letih več pozornosti namenjamo vplivu različnih snovi na človeško telo in zdravilne učinkovine pri tem niso nobena izjema. Ker zdravilne učinkovine na različne načine vnesemo v telo in tako neposredno vplivajo na naš organizem, smo do njih vse bolj kritični. Več primerov je pri novejših učinkovinah, a tudi že uveljavljene učinkovine lahko vzbujajo dvom. Zaradi tega se pojavlja vse več novih raziskav o vplivu zdravilnih učinkovin na človeško telo, med katerimi so tudi analgetiki.

1.1 Bolečina in analgetiki

Bolečina je prvi odgovor telesa na nevarnost in opozorilo za neobičajno dogajanje znotraj organizma. Gre za čutno ali čustveno zaznavo telesa, ki je posamezniku neprijetna. Je del obrambnega mehanizma in nastane zaradi aktivacije bolečinskih receptorjev ali nociceptorjev, prostih živčnih končičev, ki se nahajajo izven hrbtenice (v koži, mišicah, drobovju), medtem ko imajo telesa v ganglijih. Receptorji po aksonih prenesejo mehanske, kemične ali termične signale v centralni živčni sistem preko senzoričnih nevronov, ki se nahajajo v hrbtenjači (1, 2, 3, 4, 5).

Analgezija pomeni odsotnost bolečine, ne da bi pri tem človek izgubil zavest. Za lajšanje in zdravljenje bolečin uporabljamo zdravila proti bolečinam ali t.i. analgetike, ki jih izberemo glede na jakost in vrsto bolečine. Na izbiro vplivajo tudi njihove

farmakokinetične lastnosti in farmacevtska oblika. Ločimo opioidne in neopioidne analgetike, v naši nalogi se bomo osredotočili na izbrane predstavnike slednjih (1, 2, 3).

1.2 Neopioidni analgetiki

Med neopioidne analgetike spadajo paracetamol, nesteroidne protivnetne učinkovine ter metamizol. Njihova prednost je ta, da za razliko od opioidnih ne povzročijo odvisnosti in tolerance. Dejstvo, ki ga je potrebno upoštevati pri jemanju teh zdravilnih učinkovin je, da povečanje odmerka poveča protibolečinski učinek le do določene mere, dokler ne doseže platoja. Višji odmerek lahko privede le do večjega števila neželenih učinkov, česar pa si ne želimo (1, 2).

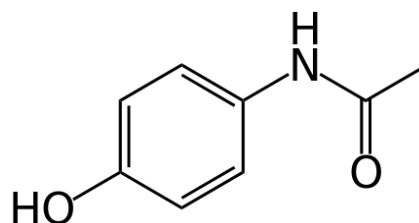
1.2.1 Paracetamol

Paracetamol (acetaminofen, *N*-acetyl-*p*-aminofenol) je največkrat uporabljen predstavnik analgetikov in velja za zdravilo izbora pri lajšanju blagih in zmernih bolečin. Hkrati je tudi antipiretik, vendar nima protivnetnega učinka. V priporočenih odmerkih in občasnem jemanju se smatra za varno zdravilno učinkovino z malo neželenimi učinki. Preko zaviranja COX-3 v možganih zmanjšuje bolečino in vročino, do COX-1 in COX-2 pa ima pri terapevtskih koncentracijah le šibko afiniteto in skorajda ne zavira sinteze prostaglandinov na periferiji. Slednji so pomembne spojine pri procesu vnetja in prav to je razlog, da paracetamol ne deluje protivnetno (2, 6, 7). V zadnjih letih so predpostavili še alternativen mehanizem delovanja, saj so ugotovili, da konjugat paracetamola z arahidonsko kislino, *N*-arahidonoilfenolamin (AM404), preprečuje privzem neurotransmitterja anandamida v postsinaptičnih nevronih in tako ojača delovanje endogenega kanabioidnega sistema ter dodatno lajša bolečino (8). Hkrati pa ta konjugat aktivira tudi receptorje TRPV1, kar posledično otežuje prenos bolečinskih signalov v možganih. Na sluznico prebavil in aktivnost trombocitov nima negativnega vpliva. Če presežemo njegov priporočen vnos, je hepatotoksičen zaradi kopičenja toksičnega metabolita in neprimeren za bolnike, ki imajo hujše težave z ledvicami (2, 6, 7).

Je učinkovina, ki se po zaužitju popolnoma in hitro absorbira iz prebavil. Najvišjo plazemsko koncentracijo tako doseže v 30 do 120 minutah. Po telesu se prav tako hitro ter enakomerno porazdeli, delno se veže tudi na plazemske proteine (20-50 %). Prehaja placento in krvno-možgansko pregrado. V jetrih se večina učinkovine presnovi in veže z

glukuronsko in sulfonsko kislino. Manjše količine presnavlja encim citokrom P450, pri čemer nastaja toksičen metabolit, ki je problematičen pri večjih odmerkih, ko se presnovek *N*-acetil-*p*-benzokinonimin veže na sulfhidrilno skupino bioloških makromolekul v jetrih in povzroča okvare. Negativni učinki se pojavijo že pri odmerkih 6 g/dan. Jemanje je neodvisno od hrane, izogibati pa se je potrebno alkoholu, saj poveča nevarnost hepatotoksičnosti. Paracetamol kot tudi vsi ostali neopioidni analgetiki ne povzročajo odvisnosti. Večina se ga v obliki metabolitov izloča skozi ledvice, majhen delež pa se izloči nespremenjen. Priporočeni dnevni odmerek paracetamola je 500-1000 mg, 3 – 4-krat/dan, kar skupno predstavlja maksimalni dnevni odmerek 4000 mg. Nekaj farmakokinetičnih parametrov, fizikalno-kemijskih lastnosti in struktura so prikazani na sliki 1 (9, 10, 11).

- trdna bela kristalinična snov, brez vonja, grenkega okusa
- topnost v vodi: 14.000 mg/L pri 25 °C
- T vrelišča > 500 °C, T tališča okoli 170 °C
- logP 0,46
- pH nasičene vodne raztopine 5,5-6,5
- pKa 9,38



- povp. terapevtska plazemska konc.: 2,1 µg/ml
- čas, potreben za doseg najvišje plazemske koncentracije: 0,33 ± 1,44 h
- biološka uporabnost: 68 %
- razpolovna doba: 1-4 h

Slika 1: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura paracetamola (povzeto po 11, 12)

1.2.2 Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine ali NSAID

Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine so pogosto predpisane in uporabljene zdravilne učinkovine, saj lajšajo bolečine, delujejo antipiretično in hkrati še protivnetno. Med predstavnike NSAID med drugim štejemo indometacin, ibuprofen, naproksen in acetilsalicilno kislino. Zavirajo encim ciklooksigenazo, ki ima pomembno vlogo pri nastanku prostaglandinov. Ciklooksigenaza obstaja v obliki več izoencimov – COX-1, COX-2 in COX-3. Inducirajo jo protivnetni dražljaji in strokovnjaki predvidevajo, da je odgovorna za bolečino, vnetje in povišano telesno temperaturo. Uporaba NSAID je posledično smiselna pri bolečinah, ki so povezane z vnetji, pri enkratnem odmerku pa je

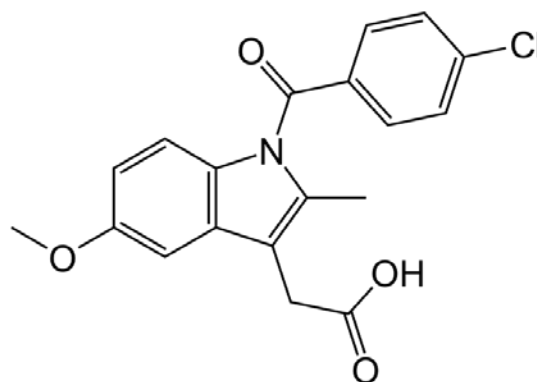
protibolečinski učinek primerljiv s paracetamolom. Med posameznimi predstavniki te skupine analgetikov obstajajo manjše razlike, vendar so te veliko večje med bolniki, njihovim odzivom na zdravljenje ter pri samem pojavu neželenih učinkov. Pri dolgotrajnejši uporabi NSAID lahko pride do neželenega draženja sluznice prebavnega trakta, negativnega vpliva na ledvično funkcijo in strjevanje krvi (2).

Vsem predstavnikom NSAID je skupna značilnost, da so šibke organske kisline in se večinoma dobro absorbirajo iz prebavnega trakta. Prisotna hrana pa znatno ne vpliva na njihovo biološko uporabnost v organizmu. Obsežno se metabolizirajo in kasneje izločajo predvsem skozi ledvice, delno pa tudi z žolčem. Večina predstavnikov te skupine analgetikov se v veliki meri veže na plazemske beljakovine (95-99 %, predvsem na albumin) (12).

1.2.2.1 *Indometacin*

Indometacin spada med NSAID in je derivat indolocetne kisline. Preko zaviranja ciklooksigenaze zavira sintezo prostaglandinov (je neselektivni zaviralec COX) in hkrati zmanjšuje gibljivost levkocitov, ki sodelujejo pri procesu vnetja.

- blede rumena do rumenorjava
kristalinična snov, brez vonja, rahlo
grenkega okusa
 - topnost v vodi: 0,937 mg/L pri 25 °C
 - T tališča pri 158 °C
 - logP 3,4
 - pKa 4,5
-
- terapevtska plazemska konc.: 0,8-2,5
µg/ml
 - čas, potreben za doseg najvišje
plazemske koncentracije: 1,3 h
 - biološka uporabnost: 100 %
 - razpolovna doba: 2,5 h



Slika 2: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura indometacina (povzeto po 12, 13)

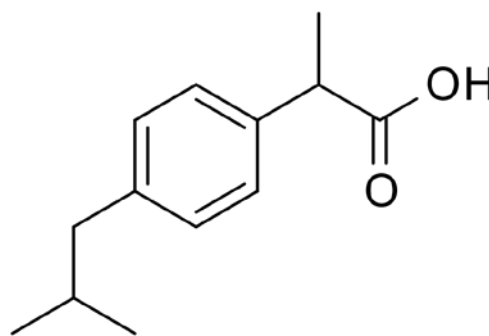
Učinkovina se po peroralni uporabi hitro in skoraj popolnoma absorbira ter veže na plazemske proteine (v 99 %). Po absorpciji pa se v jetrih presnovi do glukuronidnih konjugatov in drugih metabolitov, ki so večinoma neaktivni. Izloča se preko ledvic, pa tudi s fecesom in žolčem. Del se izloči tudi preko enterohepatičnega obtoka, nekaj pa se ga

izloči nespremenjenega. Pri prevelikih odmerkih se pojavijo slabost, bruhanje, glavobol, omotičnost in druge težave, največji problem pa so gastrointestinalne težave. Priporočen skupen dnevni odmerek indometacina je 50-150 mg, skupen maksimalni dnevni odmerek pa je 200 mg. Nekaj farmakokinetičnih parametrov, fizikalno-kemijskih lastnosti in struktura so prikazani na sliki 2 (10, 13).

1.2.2.2 *Ibuprofen*

Ibuprofen je derivat propanojske kisline, ki prav tako zavira sintezo prostaglandinov in tromboksana, saj je zaviralec encimov COX. Deluje protibolečinsko in antipiretično, hkrati pa je tudi antikoagulant. Za zdravljenje blagih do zmernih bolečin se uporablja v odmerkih do 2400 mg/dan, pri čemer imajo višji odmerki znotraj tega intervala tudi protivnetni učinek. Velja za eno izmed najvarnejših zdravlilnih učinkovin iz skupine NSAID. Absorpcija ibuprofena je hitra, učinkovina se nato v visokem odstotku (99 %) veže na plazemske beljakovine. Presnova do karboksiliranih in hidrosiliranih metabolitov poteka v jetrih. Izloča pa se hitro, in sicer skozi ledvice. Možno je tudi prehajanje placent. Neželeni učinki pri visokih odmerkih so podobni kot pri jemanju indometacina. Priporočeni dnevni odmerek ibuprofena je 200-400 mg, 3 – 4-krat/dan. Nekaj farmakokinetičnih parametrov, fizikalno-kemijskih lastnosti in struktura so prikazani na sliki 3 (10, 12, 14).

- trdna brezbarvna snov karakterističnega vonja
 - topnost v vodi: 21 mg/L pri 25 °C
 - T tališča pri 76 °C
 - logP 3,97
 - pKa 4,91
-
- terapevtska plazemska konc.: 39,4-63,7 µg/ml
 - čas, potreben za doseg najvišje plazemske koncentracije: 1,6 ± 0,9 h
 - biološka uporabnost: 87-100 %
 - razpolovna doba: 2-4 h



Slika 3: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura ibuprofena (povzeto po 12, 14, 15)

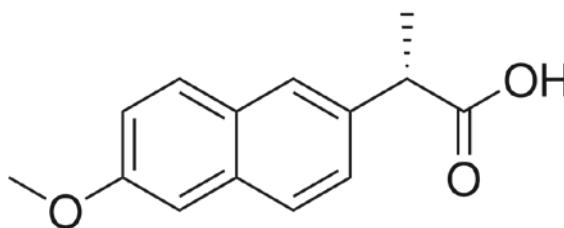
1.2.2.3 *Naprosen*

Naprosen ali natrijev naproksenat spada med derivate propanojske kisline in je še eden izmed predstavnikov NSAID, ki zavira ciklooksigenazo (neselektivni zaviralec) ter

zmanjšuje koncentracijo prostaglandinov in tromboksana v telesu. Prav tako znižuje telesno temperaturo, deluje protibolečinsko ter zavira agregacijo trombocitov. Problematičen je zato, ker lahko povzroči neželene učinke na prebavilih (10).

Po peroralni aplikaciji se popolnoma absorbira. Še hitrejšo absorpcijo pa doseže njegova natrijeva sol. Ima dolgo razpolovno dobo in se v visokem odstotku (več kot 99 %) veže na plazemske proteine, pri čemer lahko tekmuje za vezavna mesta z drugimi učinkovinami. Metabolizem poteka v jetrih. Izloča se večinoma skozi ledvice, nekaj malega pa se ga izloči tudi z blatom. Neželeni učinki so enaki kot pri ostalih že opisanih NSAID. Priporočen skupen dnevni odmerek naproksena je 550-1100 mg, maksimalni dnevni odmerek pa znaša 1650 mg. Nekaj farmakokinetičnih parametrov, fizikalno-kemijskih lastnosti in struktura so prikazani na sliki 4 (10, 16).

- trdna bela oz belkasta kristalinična snov, ki je praktično brez vonja
 - topnost v vodi: 15,9 mg/L pri 25 °C
 - T tališča pri 153 °C
 - logP 3,18
 - pKa 4,15
- terapevtska plazemska konc.: 62-96 µg/ml
 - čas, potreben za doseg najvišje plazemske koncentracije: 2-4 h
 - biološka uporabnost: 95 %
 - razpolovna doba: 12-15 h



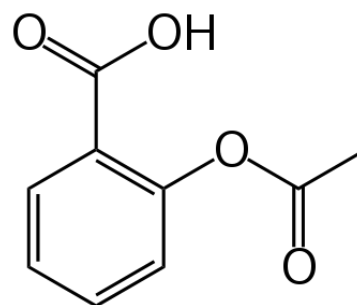
Slika 4: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura naproksena (povzeto po 12, 16)

1.2.2.4 Acetilsalicilna kislina

Acetilsalicilna kislina (ASA) je najbolj znana predstavnik NSAID in se pogosto uporablja za lajšanje blagih bolečin (glavobol, bolečine v sklepih in mišicah, menstrualne bolečine), bolečin pri kroničnih boleznih (revmatoidni artritis), zniževanje povišane telesne temperature, pri prehladu in gripi. V osnovi zavira sintezo prostaglandinov preko zaviranja encimov COX, v manjši meri pa tudi sintezo tromboksanov in agregacijo trombocitov. V ta namen se v manjših odmerkih preventivno uporablja za preprečevanje nastanka krvnih strdkov, miokardnih infarktov in ishemičnih napadov (10).

Gre za šibko organsko kislino, ki je netopna v vodi. Po peroralni aplikaciji se hitro absorbira, najvišje plazemske koncentracije pa doseže 1-2 uri po aplikaciji. Takoj se hidrolizira z esterazami v želodcu in pretvori v salicilno kislino. Salicilna kislina se nato v glavnem metabolizira do konjugatov z glicinom ali z glukuronsko kislino ali pa se prosta izloči skozi ledvice. Na plazemske proteine se tako acetilsalicilna kislina kot tudi njen presnovek salicilna kislina vežeta v visokem odstotku, kar lahko predstavlja težavo pri jemanju več zdravil hkrati. Salicilati prehajajo s pasivno difuzijo v vsa tkiva, tudi v materino mleko, tkiva zarodka in v centralni živčni sistem. Pri nižjih odmerkih (t.j. 600-1000 mg/dan) je razpolovni čas odvisen od zasedenosti metabolnih poti in znaša med 2-3 ure, pri prevelikih odmerkih (t.j. večji od 2-4 g/dan) pa se podaljša tudi do 15 ur. Priporočeni dnevni odmerek acetilsalicilne kisline je 500-1000 mg, 3 – 4-krat/dan, pri čemer pazimo, da ne prekoračimo skupnega maksimalnega dnevnega odmerka, ki znaša 4000 mg. Nekaj farmakokinetičnih parametrov, fizikalno-kemijskih lastnosti in struktura so prikazani na sliki 5 (10).

- trdna brezbarvna do bela kristalinična snov, brez vonja, rahlo grenkega okusa
 - topnost v vodi: 4600 mg/L pri 25 °C
 - T tališča pri 135 °C
 - logP 1,19
 - pKa 3,49
- terapevtska plazemska konc.: 4,9-8,9 µg/ml
 - čas, potreben za doseg najvišje plazemske koncentracije: $0,39 \pm 0,21$ h
 - biološka uporabnost: 80-100 %
 - razpolovna doba: 2-3 h



Slika 5: Farmakokinetične, fizikalno-kemijske lastnosti in struktura acetilsalicilne kisline (povzeto po 12, 17)

1.3 Endokrini sistem

V telesu obstajajo številni kemični komunikacijski sistemi, s katerimi organizem nadzoruje vzdrževanje fizioloških procesov in homeostazo. Eden izmed teh je tudi endokrini sistem, ki ga preučuje endokrinologija. Endokrini sistem je zelo kompleksen, saj je povezan z živčevjem in imunskim sistemom ter regulira rast, razvoj, presnovo, reprodukcijo, krvni tlak, koncentracijo ionov in ostalih snovi v krvi. Sestavljajo ga enote, ki proizvajajo

prenašalce signalov, t.i. endokrine celice in nevroni, prenašalci signalov t.i. hormoni ter prejemniki signalov t.i. celice tkiv z receptorji (18, 19).

1.3.1 Hormoni

Hormoni ali kemijski prenašalci signalov se tvorijo v endokrinih celicah, ki se nahajajo v žlezah ali pa so razpršene po tkivih. Med žleze, v katerih pride do tvorbe hormonov v možganih, uvrščamo hipotalamus, adenohipofizo, neurohipofizo in epifizo. Med periferne žleze sodijo ščitnica, obščitnica, nadledvična žleza, jajčnik, moda in endokrini del trebušne slinavke. Prenašalce signalov lahko izločajo tudi organi, ki primarno niso endokrini. Med slednje prištevamo ledvice, maščobno tkivo, srce, želodec, črevo. Po kemizmu so hormoni lahko proteini, steroidi in amini (18, 19).

Poznamo več vrst delovanja hormonov, najpogosteje pa se v obtok izločajo v manjših količinah in potujejo po krvi, limfi ali medcelični tekočini do tarčnih tkiv, kjer pride do fiziološkega odgovora (t.i. endokrino delovanje). Sproščanje večine je periodično, poznamo pa tudi ritmično sproščanje. Ločimo proste hormone in takšne, vezane na beljakovine, ki praviloma ne vstopajo v celico in predstavljajo zalogo ter po sprostitvi z beljakovin opravijo svoje delo. Sproščanje hormonov mora biti pravilno, saj v nasprotnem primeru govorimo o hormonskem neravnovesju, ki lahko privede do bolezenskih stanj. Prav tako je pomembno, da je v ciljanih tkivih dovolj funkcionalnih receptorjev, ki se ustrezno odzovejo na signale. Posebnost hormonov je, da so sposobni uravnnavati lastne mehanizme regulacije s povratnimi zvezami – negativnimi in pozitivnimi (18, 19, 20).

1.3.2 Receptorji

Receptorji so specifične proteinske makromolekule, ki po selektivni vezavi signalne molekule in konformacijskih spremembah povzročijo fiziološki odgovor v celici. Do določenih hormonov izkazujejo majhno kapaciteto in visoko afiniteto, s tem pa je omogočen natančen odgovor na manjše količine hormona. Ločimo membranske receptorje, ki so vpeti v celično membrano ali prosto plavajo v citoplazmi in jedrne, ki se nahajajo v jedru celice (18, 19).

Membranske receptorje, za katere je značilen hiter odgovor, delimo na receptorje s sedmimi transmembranskimi podenotami, takšne z eno transmembransko podenoto, takšne iz več podenot in ionske kanale. Z vezavo na te se aktivirajo G-proteini, ki z aktivacijo

encimov sprožijo znotrajcelične reakcije. Število receptorjev je regulirano z učinkom hormona na celico. Navadno je proporcionalno, vendar se ob prebitku hormona v celici razgradi tudi receptor in posledično se njihovo število zmanjša. Obratno pa se ob nizkih količinah prenašalcev signala obnovi receptorski del in poveča število receptorjev (18).

Jedrni receptorji so, kot pove že ime, locirani v jedru celice in sestavljeni iz treh podenot, odgovornih za: vezavo hormona, vezavo na DNA in vezavo znotrajceličnih proteinov. Hormoni, ki so steroidi ali derivati aminokislin, prehajajo membrano in se specifično vežejo na jedrni receptor. Posledično se aktivira kompleks, ki se veže na DNA. Nato se dodatno vežejo še proteini, ki ob nadzoru genskega prepisa začnejo prepisovanje DNA in sledi sinteza specifičnih beljakovin. Jedrni receptorji regulirajo rast in razvoj zarodka, izražanje fenotipa, regulirajo metabolne procese holesterola, žolčne kisline in maščobnih kislin, sodelujejo pri kontroliranju in izražanju encimov ter prenašalcev. Nepravilnosti lahko vodijo do neplodnosti, debelosti, sladkorne bolezni, rakavih obolenj (18, 21). V nalogi se bomo osredotočili predvsem na spodaj našteje jedrne receptorje:

- Androgenski receptor (AR), ki je primarni receptor za endogena hormona testosteron in dihidrotestosteron. Sodeluje pri razvoju in vzdrževanju moških spolnih hormonov (21, 22).
- Estrogenska receptorja alfa ($ER\alpha$) in beta ($ER\beta$) sta receptorja za estradiol. $ER\alpha$ se nahaja v maternični sluznici, celicah raka dojke, jajčnikih in hipotalamusu. $ER\beta$ najdemo v ledvicah, možganih, kosteh, srcu, pljučih, prostati, sluznici črevesja, endotelijskih celicah (21, 22).
- Glukokortikoidni receptor (GR) regulira razvoj, metabolizem in imunski odgovor. Njegova endogena liganda sta med drugim kortizol in aldosteron (21, 22).
- Jetrna X receptorja α in β ($LXR\alpha$ in $LXR\beta$) regulirata raven holesterola, maščobnih kislin in glukoze. V različnih tkivih je izražanje teh dveh izoform različno, ligandi so oksidirani derivati holesterola (21, 22).
- S peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptorji α , β in γ ($PPAR\alpha$, β in γ) so skupina receptorjev prostih maščobnih kislin in določenih oblik prostaglandinov. Regulirajo metabolizem, razvoj, celično diferenciacijo in kancerogenezo. $PPAR\alpha$ uravnava presnovo lipidov v jetrih, $PPAR\beta$ pa je povezan z rakavimi obolenji,

debelostjo, sladkorno boleznijo in aterosklerozo. Najbolj raziskan je PPAR γ (ta deluje podobno kot PPAR β), ki ureja presnovo glukoze in sodeluje pri skladiščenju prostih maščobnih kislin ter je tarča zdravil za sladkorno bolezen (21, 22).

- Retinoidni X receptor α (RXR α) je eden izmed treh oblik RXR in lahko z receptorji PPAR, receptorjem za vitamin D in ostalimi tvori heterodimere, ki regulirajo transkripcijo tarčnih genov. Je receptor za retinojsko kislino (21, 22).
- Tiroidna hormonska receptorja α in β (TR α in β) sodelujeta pri reguliranju presnove, srčnega ritma in v samem razvoju organizma ter sta receptorja za tiroidne hormone (21, 22).

V skupino jedrnih receptorjev pa poleg zgoraj naštetih spadajo tudi ostali receptorji za tiroidne hormone, retinoide in vitamin D. Vključeni so tudi receptorji za druge hidrofobne signalne molekule, ki so v telesu naravno (maščobne kisline, eikozanoidi, žolčna kislina, holesterol) ali so zunanjskega izvora (zdravilne učinkovine, karcinogeni, okoljski onesnaževalci ali ksenobiotiki) (18, 21).

1.4 Endokrina toksičnost

V preteklosti endokrina toksičnost ni bila pogosto raziskana, a danes se vse več poudarja pomembnost endokrinega sistema v povezavi z drugimi funkcijami človeškega organizma. O endokrini toksičnosti govorimo, ko določena snov vpliva na sintezo, izločanje, transport, metabolizem, vezavo ali eliminacijo hormonov, ki so potrebni za homeostazo. Rezultat je nenormalno delovanje, razvoj, rast, vedenje ali reprodukcija. Snovi, ki znatno vplivajo na naravno delovanje endokrinega sistema, imenujemo endokrini motilci (23, 24).

1.4.1 Endokrini motilci

Veliko število snovi, s katerimi smo v stiku ali jih zaužijemo, so v zadnjih letih označili za endokrine motilce (EM). Gre za heterogene snovi, ki jih lahko razdelimo v več kategorij. Najdemo jih povsod – v vodi, zraku, zemlji, sedimentih. Nekateri so zelo obstojni in imajo dolgo razpolovno dobo ter predstavljajo nevarnost že v majhnih odmerkih. Mednje štejemo naravno prisotne snovi, pesticide, plastično in drugo embalažo, industrijske in gospodinjske kemikalije, gradbeni in izolacijski material, barvila, tudi nekatere zdravilne učinkovine ter snovi, prisotne v kozmetiki, oblačilih (24, 25).

Endokrini motilci imajo različno strukturo in posledično tudi različen način delovanja, zato je med njimi težko najti neko povezavo. Njihov odziv je nelinearen, kompleksen in tkivno specifičen. Obdajajo nas na vsakem koraku in lahko delujejo bodisi direktno na sintezo hormonov ali pa na metabolizem, transport in delovanje membranskih in jedrnih receptorjev (delujejo kot antagonisti). Lahko vplivajo na izražanje genov, veliko EM pa vpliva tudi na reproduktivne organe in posledično na razvoj in rast zarodka v nosečnosti. Kljub poznavanju mehanizmov endokrinih motilcev pa ne moremo z gotovostjo trditi, da so odgovorni za določene bolezni, saj so v ta proces vključeni tudi drugi dejavniki (odmerek, doba izpostavljenosti, način izpostavljenosti, metabolizem, sestava telesa, genetski polimorfizmi, izpostavljenost več EM, itd.) (24, 25, 26).

1.5 Reproductivna in razvojna toksičnost

Pojem reproductivna toksičnost se nanaša na neželene učinke na spolne organe, vedenje, delovanje in plodnost odraslih ter tudi na toksičnost pri potomcih, ki je posledica izpostavljenosti določeni substanci ali kombinaciji le-teh v nosečnosti. Le-to pogosto imenujemo tudi razvojna toksičnost. Neželeni učinki na spolno delovanje in plodnost se lahko kažejo kot zgodnja ali pozna puberteta, nenormalno stanje reproductivnega ciklusa, nenavadno spolno vedenje, neplodnost, težave pri nosečnosti in porodu itd. Snovi pa lahko vplivajo tudi na potomce med nosečnostjo in po porodu ter se odražajo kot splav, strukturne nepravilnosti zarodka, nepravilnosti v delovanju organov in spremenjena rast (27).

Reproductivna in razvojna toksičnost zajema več različnih vidikov, podatke pa lahko pridobivamo z različnimi eksperimentalnimi metodami, in sicer z *in silico*, *in vitro* ter *in vivo* študijami. Slednje so po navadi precej kompleksne, dolge in zahtevajo velik finančni vložek. Ravno to so razlogi, da je strokovnjakom v velikem interesu iskanje novih načinov pridobivanja podatkov o vplivu snovi na reproductivni sistem. Snovi, ki lahko negativno vplivajo na reproductivno, v Evropi delimo v več kategorij: kategorija 1A (angl. *Known human reproductiv toxicant*) so znani toksikanti in to potrjujejo človeške študije, kategorija 1B (angl. *Presumed human reproductiv toxicant*) so domnevni toksikanti, kar je potrjeno z izidi študij na živalih; kategorija 2 (angl. *Suspected human reproductiv toxicant*) so toksikanti, pri katerih obstaja sum za tovrstno delovanje, a z manj dokazi iz človeških in živalskih študij (27, 28, 29).

Po zbranih podatkih so analgetiki najpogosteje uporabljane zdravilne učinkovine v nosečnosti. V tem obdobju, ko lahko pride do razvojne toksičnosti, moramo upoštevati tveganja in izbirati zdravilne učinkovine z ustreznimi parametri (vezava na plazemske proteine, topnost v maščobah, hitrost presnove, molekulska masa, prehod skozi placento). Vse učinkovine, prisotne v krvnem obtoku matere, lahko v določenem obsegu prehajajo placento. Kot najbolj kritično obdobje velja tisto od 4. do 10. tedna nosečnosti. S prirojenimi napakami se rodi približno 3 % novorojenčkov. Zdravilne učinkovine lahko na plod vplivajo direktno, lahko pa vplivajo na samo fiziologijo nosečnosti. V Sloveniji za razvrstitev zdravil glede na embriotoksične in teratogene učinke na plod uporabljamo kategorije ameriške agencije FDA, ki opredeljuje 5 kategorij zdravilnih učinkovin. Kategorija A zajema varne zdravilne učinkovine (obstajajo kontrolirane raziskave, ki niso dokazale škodljivih učinkov), kategorija B vključuje zdravilne učinkovine, pri katerih obstaja le malo verjetno tveganje (ni kontroliranih raziskav na ljudeh, raziskave na živalih niso dokazale škodljivosti), v kategorijo C spadajo zdravilne učinkovine, ki jih je kljub morebitnem tveganju dovoljeno uporabljati (ni kontroliranih raziskav na ljudeh, raziskave na živalih so pokazale škodljivost), kategorija D zajema zdravilne učinkovine, ki so škodljive, a se kljub tveganju za plod v določenih primerih uporabljajo v dobrobit matere. Zadnja kategorija X pa zajema škodljive zdravilne učinkovine, pri katerih so raziskave na ljudeh in živalih dokazale škodljivost, zato njihovo jemanje med nosečnostjo ni dovoljeno (30).

1.6 *In silico* metode

Izraz *in silico* vrednotenje se nanaša na uporabo računalniških programov za analizo že obstoječih podatkov, modeliranje in napovedovanje aktivnosti izbranih snovi. V bistvu gre za uporabo računalniških orodij za analizo podatkov z različnimi algoritmi, ki so izdelani tako, da napovejo določene lastnosti. Prav toksičnost spojin in možni neželeni učinki so največji problem pri odkrivanju novih zdravil. Z namenom selekcioniranja spojin se *in silico* metode v farmacevtski industriji uporabljajo že desetletja pri začetnih procesih optimizacije novo odkritih učinkovin. Gre za hitre in poceni metode, še sploh v primerjavi z *in vitro* ter *in vivo* testiranjem, kar je velikega pomena predvsem pri analizi večjega števila spojin, saj se zmanjša število poskusov na živalih in poraba kemikalij za analize. Nekatere metode se osredotočajo na celoten organizem, nekatere le na posamezne organe ali biološke procese. Ločimo tudi metode, ki se osredotočajo na celostno toksičnost ali pa le

na posamezne dejavnike, ki sodelujejo pri procesih toksičnosti. Uporabnost modela za izbrano spojino je odvisna od razpoložljivih podatkov strukturno podobnih spojin, ki so na voljo in je omejena. Prav bazo razpoložljivih podatkov bi se v prihodnosti dalo izboljšati, saj so ti pogosto pomanjkljivi. Med računalniške *in silico* metode sodijo npr. različne podatkovne baze, QSAR modeli, ekspertni sistemi, 3D-QSAR, modeli sidranja in druge javno dostopne podatkovne baze (31, 32, 33).

1.6.1 Računalniški modeli

QSAR ali model kvantitativnega odnosa med strukturo in delovanjem v kombinaciji s SAR (model odnosa med strukturo in delovanjem) skupaj imenujemo (Q)SAR modeli. Ti modeli iščejo matematično povezavo med molekulskimi deskriptorji, s katerimi opišemo molekulo, ter lastnostmi in aktivnostjo spojine. Na podlagi kemijske strukture lahko napovemo nekatere fizikalno-kemijske lastnosti spojine. S statističnimi metodami je potrebno preveriti napovedno moč modela in opraviti validacijo, kar je najbolje storiti s spojinami, ki se niso uporabljaje pri razvoju modela (31, 34).

Ekspertni sistemi so programi, ki kodirajo vrsto pravil, določenih s strani strokovnjakov z različnih področij. Gre za kombinacijo računalniških programov in podatkovnih baz, ki jih je potrebno posodablјati in nadgrajevati, saj v nasprotnem primeru postane sistem neuporaben in zastarel. Program prepozna prisotnost že znanih fragmentov, ki so odgovorni za toksične učinke v spojini, ki jo želimo ovrednotiti. Problematična je lahko nepopolna knjižnica toksičnih fragmentov, kar privede do nepopolnih ter lažno negativnih rezultatov, ki toksične spojine označijo kot varne (31, 35).

1.6.2 Napoved endokrine in reproduktivne toksičnosti

Napoved endokrinih učinkov je v največji meri zaradi omejenih podatkov dostopna predvsem za androgenske in estrogenske receptorje. Za napoved informacij in podatkov je na voljo več različnih pristopov, ki smo jih omenili in opisali zgoraj. Ker gre za kompleksne sisteme človeškega telesa, je način pridobivanja podatkov o toksičnosti z napovedovanjem z računalniškimi programi izjemno zaželen. Izrednega pomena so tudi široko dostopne, posodobljene podatkovne baze z relevantnimi podatki. Mednje sodijo The Comparative Toxicogenomics Database, Endocrine Disruptor Knowledge Base (EDKB), EDCs DataBank, Endocrine Active Substances Information System (EASIS), Toxicity ForeCaster (ToxCast™) Data (36, 37, 38, 39, 40).

Na drugi strani je napoved reproduktivne in razvojne toksičnosti še kompleksnejša in še manj raziskana. Za to vrsto toksičnosti obstaja manjše število podatkovnih baz in modelov, saj zaradi skupka mnogih procesov, ki sodelujejo pri tem, ni stoddostno zanesljivih virov. Podatkovne baze s podatki o reproduktivni/razvojni toksičnosti so npr. Leadscope, Inc., The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS®), Developmental and Reproductive Toxicology Database (DART), The OECD QSAR Toolbox (41, 42, 43, 44).

2 Namen dela

Zaradi njihove razširjene uporabe se pogosto srečujemo z zdravilnimi učinkovinami za lajšanje bolečin. Te v svoji strukturi vsebujejo določene strukturne elemente, ki lahko oponašajo endogene ligande, zaradi česar obstaja določena verjetnost vezave na nekatere steroidne receptorje. Mnenja strokovnjakov se pri ocenah varnosti analgetikov razlikujejo, saj so njihovi eksperimentalni podatki glede toksičnosti pogosto dvoumni ali pomanjkljivi.

V magistrski nalogi bomo s pomočjo *in silico* metod napovedali endokrino in reproduktivno toksičnosti izbranih analgetikov.

- S programom Endocrine Disruptome ter Vega QSAR (Relative Binding Affinity model) bomo napovedali vezavno afiniteto izbranih analgetikov na 12 različnih jedrnih receptorjev.
- S programi Derek Nexus, Vega QSAR (Developmental Toxicity in Developmental/Reproductive Toxicity library) in TEST bomo napovedali različne vidike reproduktivne toksičnosti izbranih analgetikov.
- Dobljene rezultate bomo primerjali z že znanimi podatki iz literature (*in vitro*, *in vivo*) in ocenili tudi napovedno moč programov.
- Na osnovi podatkov iz literature ter tistih, pridobljenih *in silico*, bomo podali oceno tveganja in izpostavili najbolj in najmanj varnega izmed proučevanih analgetikov.

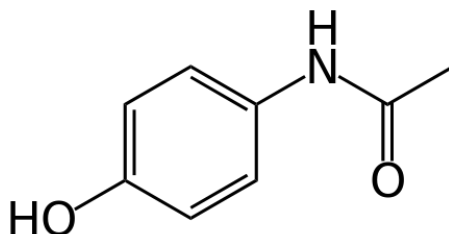
3 Materiali in metode

3.1 Izbrani analgetiki

V magistrski nalogi se bomo osredotočili na predstavnike skupine analgetičnih zdravilnih učinkovin: paracetamol, indometacin, ibuprofen, naproksen in acetilsalicilno kislino. V preglednici I so prikazane strukturne formule, SMILES kode, CAS številke, INN poimenovanje ter sistematično (IUPAC) ime izbranih učinkovin.

Preglednica I: Izbrani analgetiki ter njihova struktura, IUPAC imena, CAS številke in SMILES kode

PARACETAMOL

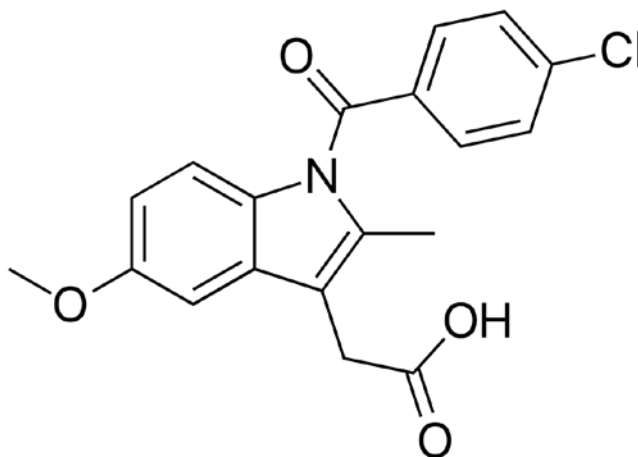


IUPAC ime: *N*-(4-hidroksifenil)acetamid

CAS: 103-90-2

SMILES: CC(=O)NC1=CC=C(C=C1)O

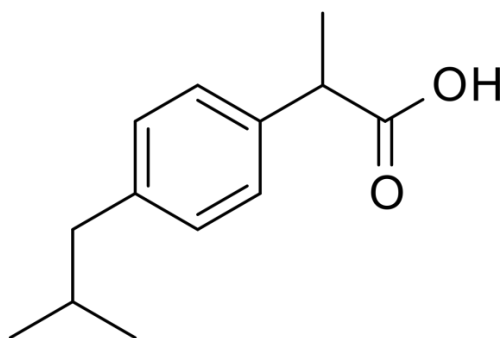
INDOMETACIN



IUPAC ime: 2-[1-(4-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-1*H*-indol-3-il]ocetna

CAS: 53-86-1

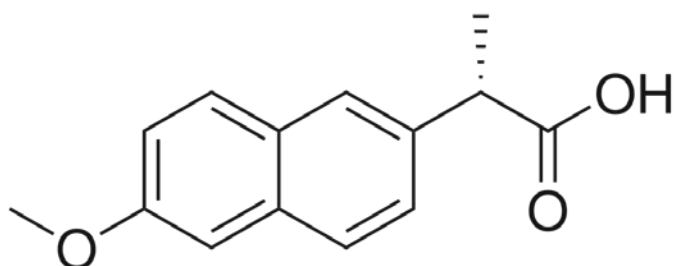
SMILES: CC1=C(C2=C(N1C(=O)C3=CC=C(C=C3)Cl)C=CC(=C2)OC)CC(=O)O

IBUPROFEN

IUPAC ime: 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanojska kislina

CAS: 15687-27-1

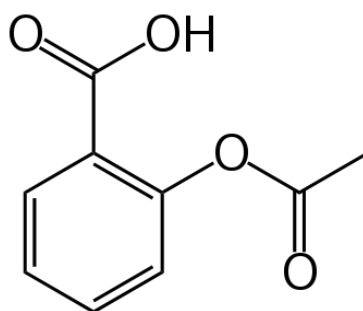
SMILES: CC(C)CC1=CC=C(C=C1)C(C)C(=O)O

NAPROKSEN

IUPAC ime: (2*S*)-2-(6-metoksinaftalen-2-il)propanojska kislina

CAS: 22204-53-1

SMILES: CC(C)C(C1=CC2=C(C=C1)C=C(C=C2)OC)C(=O)O

ACETILSALICILNA KISLINA

IUPAC ime: 2-acetoksibenzojska kislina

CAS: 50-78-2

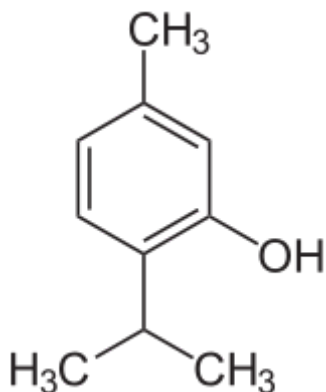
SMILES: CC(=O)OC1=CC=CC=C1C(=O)O

3.2 Negativna in pozitivna kontrola

V preglednici II sta prikazani strukturi, SMILES kodi in CAS številki pozitivne in negativne kontrole v magistrski nalogi. Le-ti sta bili enotni v vseh testih.

Preglednica II: Pozitivna in negativna kontrola ter njuni strukturi, IUPAC imeni, CAS številki in SMILES kodi

TIMOL

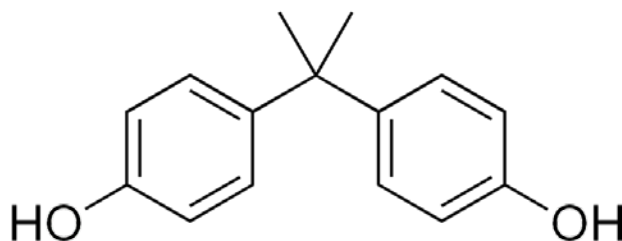


IUPAC ime: 5-metill-2-(propan-2-il)fenol

CAS: 89-83-8

SMILES: CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O

BISFENOL A



IUPAC ime: 4-[2-(4-hidroksifenil)propan-2-il]fenol

CAS: 80-05-7

SMILES: CC(C)(C1=CC=C(C=C1)O)C2=CC=C(C=C2)O

Kot negativno kontrolo smo v naši nalogi izbrali timol, ki v strukturi vsebuje aromatski obroč in hidroksilno skupino na aromatskem obroču. Zanj predvidevamo, da je ustrezna negativna kontrola, saj se do sedaj v študijah ni izkazal kot endokrino toksičen ali kot spojina, ki bi motila hormonsko ravnovesje. V naravi se nahaja v rastlinah (npr. timijan,

origano, indijska kopriva). Ameriška Agencija za varstvo okolja (EPA – Environmental Protection Agency) je glede na dostopno strokovno literaturo podala mnenje, da timol ne predstavlja nevarnosti za zdravje in je spojina z minimalnim toksičnim potencialom. Kot pozitivno kontrolo pa smo izbrali bisfenol A (BPA). Gre za organsko spojino z dvema fenolnima obročema, ki se v večini uporablja pri izdelavi polikarbonatne plastike in epoksi smole. Ljudje prihajamo v stik z BPA predvsem preko embalaže za shranjevanje hrane in pijače, nahaja pa se tudi v razni zaščitni opremi, odporni na udarce, in medicinskih pripomočkih ter v naš organizem prehaja z zaužitjem. Velja za znanega in dobro preučevanega endokrinega motilca (45, 46, 47, 48).

3.3 Uporabljeni računalniški programi in specifikacija nastavitvev

Izbrane neopioidne analgetike in njihov vpliv na endokrini in reproduktivni sistem smo vrednotili s programi Endocrine Disruptome, Vega QSAR, Derek Nexus in TEST. V nadaljevanju so opisani principi vrednotenja in pridobivanja podatkov s temi programi, dostopna točka, različica in nastavitve posameznega programa.

3.3.1 Endocrine Disruptome

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

Različica: 21. 01. 2015

Nastavitve: ni nastavitvev

Endocrine Disruptome sta razvila Katra Kolšek in Samo Turk v sodelovanju s Fakulteto za farmacijo, Univerze v Ljubljani in Kemijskim inštitutom. Je prosto dostopen spletni program, ki je preprost za uporabo in s pomočjo katerega lahko preko sidranja molekul v vezavno mesto napovemo vezavo izbranih kemijskih spojin na dvanajst človeških jedrnih receptorjev. Ti receptorji so: estrogenska receptorja α in β ($ER\alpha$, $ER\beta$), androgenski receptor (AR), glukokortikoidni receptor (GR), jetrna X receptorja α in β ($LXR\alpha$, $LXR\beta$), s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptorji α , β in γ ($PPAR\alpha$, $PPAR\beta$, $PPAR\gamma$), retinoidni X receptor α ($RXR\alpha$) ter tiroidna receptorja α in β ($TR\alpha$, $TR\beta$). Za določene receptorje (AR, $ER\alpha$, $ER\beta$, GR) je program sposoben napovedi vezave tako na agonistično kot tudi antagonistično konformacijo (22).

Deluje na platformi imenovani Docking interface for Target Systems (DoTS), ki uporablja program AutoDock Vina, s katerim so določili konformacijo jedrnih receptorjev za

optimalno vezavo, in napove sidranje izbranih molekul v šestnajst potrjenih struktur receptorjev. Da pridobimo rezultate, v program narišemo strukturo molekule (preko vgrajenega vmesnika ChemDoodle Sketcher) ali vnesemo njeno SMILES kodo. Program nam poda/izračuna osnovne informacije o željeni spojini (molekulska masa, logP, akceptorji in donorji vodikovih vezi, opozorila o potencialno nevarnih strukturnih fragmentih), po nekaj minutah pa še napoved vezave v obliki barvne tabele. Strukture in protokoli v omenjenem programu so validirani z močnimi ligandi, kar je potrebno upoštevati pri interpretaciji dobljenih rezultatov, saj lahko šibki ligandi prav tako predstavljajo problem pri kronični izpostavljenosti. V tabeli z rezultati **rdeča** označuje največjo verjetnost vezave (občutljivost oz. t.i. $SE < 0,25$), **oranžna** veliko verjetnost ($0,25 < SE < 0,50$), **rumena** srednjo verjetnost ($0,50 < SE < 0,75$), **zelena** pa majhno verjetnost vezave ($SE > 0,75$). Dobljena vrednost za vsak receptor je prosta energija vezave v kcal/mol. Bolj kot je številčna vrednost negativna, večja je možnost vezave. Za vsak posamezni receptor imamo podane mejne vrednosti, ki so prikazane v preglednici III (v primeru agonistov; za receptorje AR, ER, GR tudi za antagonistov) (22).

Preglednica III: Mejne vrednosti proste energije vezave (v kcal/mol) (povzeto po 22)

RECEPTOR	NAJVEČJA VERJETNOST	VELIKA VERJETNOST	SREDNJA VERJETNOST	MAJHNA VERJETNOST
AR	< -8,6	< -8,1	< -7,4	> -7,4
AR an	< -8,4	< -7,6	< -3,1	> -3,1
ER α	< -9,3	< -8,8	< -8,2	> -8,2
ER α an	< -10,7	< -9,5	< -8,6	> -8,6
ER β	< -9,2	< -8,7	< -8,0	> -8,0
ER β an	< -9,0	< -8,6	< -8,3	> -8,3
GR	< -10,7	< -9,7	< -7,3	> -7,3
GR an	< -9,8	< -9,2	< -8,5	> -8,5
LXR α	< -11,9	< -10,7	< -9,8	> -9,8
LXR β	< -12,1	< -11,3	< -10,3	> -10,3
PPAR α	< -10,0	< -9,4	< -8,9	> -8,9
PPAR β	< -10,5	< -10,1	< -9,6	> -9,6
PPAR γ	< -10,3	< -9,6	< -8,9	> -8,9
RXR α	< -12,1	< -10,8	< -10,0	> -10,0
TR α	< -10,2	< -9,2	< -7,2	> -7,2
TR β	< -10,5	< -9,4	< -7,8	> -7,8

* an = antagonist

3.3.2 Vega QSAR

Dostop: registracija in prenos na spletni strani <https://www.vegahub.eu/download/vega-qsar-download/>

Različica: 1.1.4

Nastavitve:

- Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model (IRFMN) – v. 1.0.1
- Developmental Toxicity model (CAESAR) – v. 2.1.7
- Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) – v. 1.0.0

Vega QSAR je *in silico* model, ki ga je razvil italijanski inštitut Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri Milano v sodelovanju s številnimi drugimi evropskimi in ameriškimi inštituti in institucijami (Politecnico di Milano, UK FERA, US EPA, Kemijski inštitut). Hkrati je produkt številnih projektov (ANTARES, CAESAR, Tox bank itd.). Primarno so platformo razvili kot podporo uredbi REACH za regulatorne namene. Z njim dobimo jasne napovedi toksičnosti izbrane spojine s pomočjo QSAR modelov (večina iz projekta CAESAR). Deluje s pomočjo programa Java in za pridobivanje rezultatov ne potrebuje povezave s svetovnim spletom. V program ročno vnesemo SMILES kodo spojine, jo izberemo iz seznama ali pa naložimo SDF datoteko spojine, ki jo želimo vrednotiti. V naslednjem koraku moramo glede na to, kaj želimo vrednotiti, izbrati ustrezen QSAR model. Na voljo so modeli za analizo spojin, ki so razdeljeni v štiri skupine: toksičnost, ekotoksičnost, okoljski vplivi ter fizikalno-kemijske lastnosti. Rezultate dobimo v obliki PDF dokumenta ali kot CSV format. Poročilo je sestavljeno pregledno. Število obarvanih zvezdic pomeni zanesljivost napovedi: a) tri obarvane zvezdice (***) pomenijo, da je napoved visoko zanesljiva in se spojina nahaja znotraj območja uporabnosti izbranega modela; b) dve zvezdici (**) pomenita možnost nahajanja spojine izven območja uporabnosti in srednjo zanesljivost napovedi; c) ena zvezdica (*) pomeni nizko zanesljivost in nahajanje spojine izven območja zanesljivosti. Poleg zvezdic je prikazan tudi krogec: zelen pomeni, da je spojina netoksična/neaktivna, rdeč pa predstavlja toksično/aktivno spojino. V poročilo so vključeni tudi rezultati podobnih spojin, ki so vneseni v program in opombe, če je pri napovedi prišlo do kakšnih težav. Za nekatere spojine so na voljo tudi eksperimentalni podatki (49).

Model »Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model«, ki temelji na QSAR klasifikacijskem modelu in algoritmu klasifikacijskega in regresijskega drevesa, smo uporabili za napoved endokrine toksičnosti preko vezavne afinitete na ER. Model »Developmental Toxicity model« je vgrajen v program Vega in poda rezultate na podlagi binarne klasifikacije FDA v obliki kvalitativne napovedi razvojne toksičnosti. Omenjeni model predstavlja razširitev modela CAESAR, ki je prosto dostopen in ga je podprla Evropska komisija za specifične potrebe uredbe REACH. Model »Developmental/Reproductive Toxicity library« kvalitativno napove razvojno in reproduktivno toksičnost ter temelji na binarni klasifikaciji verjetnosti znotraj platforme Vega. Model obsega virtualno knjižnico toksičnih spojin, ki so jih opisali v raziskavi podjetja Procter & Gamble. Potencialno toksične spojine so identificirali, razdelili v kategorije in model skuša najti ujemanje med analizirano spojino in spojino v knjižnici. Če povezava obstaja, je spojina označena kot toksična, drugače pa se jo razvrsti kot netoksikant (49, 50).

3.3.3 Derek Nexus

Dostop: plačljiv program, dostopen na Fakulteti za farmacijo

Različica: Derek Nexus: 6.0.1, Nexus: 2.2.1

Nastavitve: Selected Species: *bacterium, mammal*; Reasoning Level: *At least*

EQUIVOCAL; Perceive tautomers: *Yes*; Perceive mixtures: *Yes*; Match alerts without rules:

No; Show Open likelihood: *No*; Show Negative Predictions: *Yes*; Show Rapid Prototypes:

Yes; Filter nearest neighbours on misclassified features: *Yes*.

Program Derek Nexus je produkt neprofitne organizacije Lhasa Limited, ki je specializirana za razvoj strokovnih računalniških programov, s pomočjo katerih lahko napovemo toksičnost in metabolizem izbranih učinkovin. Organizacija ves čas posodablja, dopolnjuje, razvija nove programe in s tem pomaga pri razvoju ter novih znanstvenih odkritjih. Sam program omogoča oceno potencialne toksičnosti *in silico*, s čimer prihranimo čas, denar, lahko izboljšamo lastnosti učinkovin tekom razvoja in ovrednotimo profile toksičnosti (51).

V program vnesemo strukturo (jo narišemo, uvozimo kot obliko .mol, .skc, .sdf), ta pa jo nato standardizira in primerja z bazo podatkov ter napove toksičnost. Rezultat je podan kot povzetek verjetnosti, da je izbrana snov toksična, dodatno pa so na voljo še podrobnejše

informacije ter razlogi za potencialno toksičnost. Derek Nexus nam lahko napove in predvidi kancerogenost, mutagenost, genotoksičnost, preobčutljivost kože ali dihal, teratogenost, reproduktivno toksičnost. V naši nalogi se bomo osredotočili predvsem na vidik reproduktivne toksičnosti in teratogenosti. Napoved toksičnosti je lahko gotova (*certain*), skoraj gotova (*probable*), verjetna (*plausible*), dvoumna (*equivocal*), dvomljiva (*doubted*), malo verjetna (*improbable*), nemogoča (*impossible*), odprta (*open*) ali kontradiktorna (*contradicted*). Program nam rezultate poda v obliki referenc, komentarjev, primerov in poda strukturni fragment molekule, ki je odgovoren za toksičnost (51).

3.3.4 TEST

Dostop: brezplačen prenos s spletne strani <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>

Različica: 4.2.1

Nastavitve: Endpoint: *Developmental toxicity*, Method: *Consensus*

Toxicity Estimation Software Tool (TEST) je program ameriške agencije EPA, s katerim enostavno in hitro napovemo potencialno reproduktivno toksičnost izbranih spojin s QSAR modelom. Gre za modele, ki se uporabljajo za napoved toksičnosti snovi na podlagi njihove strukture in pri napovedi uporabljajo preprosto linearno funkcijo. V program enostavno vnesemo CAS številko spojine, SMILES kodo, lahko jo narišemo ali izberemo iz baze podatkov. Izberemo nastavitve (npr. LC50, LD50, mutagenost, bioakumulacijski faktor, reproduktivna toksičnost) in različne metode (hierarhična metoda, FDA metoda, metoda enotnega modela, metoda prispevka skupine, metoda najbližjega soseda, metoda odločanja s konsenzom, metoda odločitvenega drevesa). V nalogi bomo uporabili metodo odločanja s konsenzom, kjer je toksičnost rezultat povprečnih napovedi toksičnosti ostalih metod, ki jih program omogoča. Odpre se nam nova spletna stran, kjer so prikazani podatki o kvantitativni in kvalitativni napovedi reproduktivni toksičnosti naše spojine (52).

4 Rezultati in razprava

4.1 Napoved endokrine toksičnosti

4.1.1 Program Vega QSAR, model Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model

Program Vega QSAR, natančneje model Estrogen Relative Binding Affinity Model, napove verjetnost, da je spojina endokrino toksična kot posledica vezave na receptor ER. Program za izbrane spojine napove njihovo aktivnost (označi jih kot aktivne ali neaktivne) in hkrati tudi zanesljivost napovedi (označeno z zvezdicami; nizka *, srednja ** ali visoka *** zanesljivost). Za nekatere spojine so v podatkovni bazi modela na voljo tudi eksperimentalni podatki. Pri teh spojinah zanesljivost ni označena z zvezdicami.

Za izbrane analgetike in kontroli so podatki na voljo v preglednici IV.

- Za negativno kontrolo **timol** je program napovedal neaktivnost. Napoved je zelo zanesljiva in podprta z eksperimentalnimi podatki v podatkovni bazi. Napoved se prav tako nahaja znotraj območja uporabnosti modela.
- Napoved za pozitivno kontrolo **BPA** je pozitivna (spojina je aktivna) in dobro zanesljiva, kar lahko preverimo in kar potrjujejo tudi eksperimentalni podatki, ki so na voljo v podatkovni bazi izbranega modela. Napoved je znotraj območja uporabnosti modela.
- **Paracetamol** je označen kot aktivna spojina, a je zanesljivost napovedi nizka. Eksperimentalni podatki niso na voljo, napoved je zunaj območja uporabnosti.
- **Indometacin** je predvideno aktivna spojina, a je zanesljivost napovedi nizka. Eksperimentalni podatki niso na voljo, napoved se nahaja zunaj območja uporabnosti modela.
- Program je za **ibuprofen** napovedal, da je ta neaktiven, in da je zanesljivost napovedi visoka. Tudi tu eksperimentalni podatki niso na voljo, napoved se nahaja v območju uporabnosti modela.
- **Naproksen** prav tako naj ne bi bil aktiven, kar program napove z visoko zanesljivostjo. Eksperimentalni podatki za ta analgetik v podatkovni bazi sicer niso na voljo, a je napoved znotraj območja uporabnosti.

- Za **acetilsalicilno kislino** program napove in z zanesljivostjo predvidi neaktivnost, za kar sicer v podatkovni bazi modela ni na voljo eksperimentalnih podatkov. Spojina se nahaja znotraj območja uporabnosti modela.

Preglednica IV: Rezultati programa Vega QSAR za napoved endokrine toksičnosti kot posledica vezave na receptor ER za izbrane analgetike in kontroli

<i>SPOJINA</i>	<i>AKTIVNOST</i>	<i>ZANESLJIVOST</i>	<i>EKSP. PODATKI</i>
<i>timol (-)</i>	neaktivna	dobra	na voljo
<i>BPA (+)</i>	aktivna	dobra	na voljo
<i>paracetamol</i>	aktivna	*/nizka	niso na voljo
<i>indometacin</i>	aktivna	*/nizka	niso na voljo
<i>ibuprofen</i>	neaktivna	***/visoka	niso na voljo
<i>naproksen</i>	neaktivna	***/visoka	niso na voljo
<i>acetilsalicilna kislina</i>	neaktivna	***/visoka	niso na voljo

4.1.2 Program Endocrine disruptome

Program Endocrine dsiruptome nam omogoča, da napovemo vezavo na različne jedrne receptorje, in sicer omogoča napoved verjetnosti vezave za dvanajst jedrnih receptorjev, štirje receptorji pa poleg vezave na agonistično omogočajo tudi vezavo na antagonistično konformacijo. Skupaj lahko torej napovemo verjetnost vezave učinkovin na šestnajst konformacij jedrnih receptorjev.

V program smo vnesli SMILES kode molekul in rezultati, ki jih je napovedal program, so izraženi s številčnimi vrednostmi in v ustrezno obarvani tabeli. V tej tabeli **rdeča** barva označuje največjo verjetnost vezave, **oranžna** pomeni visoko verjetnost, pri **rumeni** barvi je vezava srednje verjetna, **zelena** barva pa označuje majhno verjetnost vezave spojine na jedrni receptor. Za izbrane analgetike in naši kontroli so rezultati podani v preglednici V.

- Za negativno kontrolo **timol** je program napovedal **srednjo verjetnost** vezave na *antagonistično konformacijo receptorja AR*, verjetnost vezave na ostale je majhna.
- Za pozitivno kontrolo **BPA** je **največja verjetnost** vezave na receptor *AR an*, **velika verjetnost** vezave za vezavo BPA obstaja tudi na *AR*. S **srednjo verjetnostjo** se pozitivna kontrola predvidoma veže na receptorje *ER α* , *ER β* , *GR*, *TR α* in *TR β* . Vezava na *ostale* jedrne receptorje je **malo verjetna**.

- Za **paracetamol** je verjetnost vezave na receptor *AR an* **srednja**, za vse *ostale* pa **majhna**.
- **Indometacin** se s **srednjo verjetnostjo** veže na jedrna receptorja *AR an* in *GR*. Verjetnost vezave na *ostale* receptorje je **majhna**.
- **Ibuprofen** se na receptorja *AR an* in *TR α* veže s **srednjo verjetnostjo**, medtem ko se na *ostale* veže **malo verjetno**.
- **Naproksen** se z **veliko verjetnostjo** veže na obe konformaciji receptorja *AR* (*AR* in *AR an*). S **srednjo verjetnostjo** se bo vezal na *GR* ter receptorja *TR α* in *TR β* , na *ostale* receptorje pa se naproksen veže z **majhno verjetnostjo**.
- **Acetilsalicilna kislina** se, podobno kot paracetamol, s **srednjo verjetnostjo** veže na *AR an*, vezava na *ostale* receptorje pa je **malo verjetna**.

Preglednica V: Prosta energija vezave (v kcal/mol) izbranih analgetikov, pozitivne in negativne kontrole na jedrne receptorje

JEDRNI RECEPTORJI	paracetamol	indometacin	ibuprofen	naproksen	acetilsalicilna kislina	timol (-)	BPA (+)
<i>AR</i>	-6,3	-4,3	-7,3	-8,2	-6,1	-6,6	-8,4
<i>AR an</i>	-6,3	-5,7	-7,2	-7,8	-6,4	-6,6	-8,6
<i>ERα</i>	-5,9	-7,6	-6,9	-7,5	-5,7	-6,1	-8,3
<i>ERα an</i>	-5,9	-6,7	-6,9	-7,5	-5,7	-5,9	-8,5
<i>ERβ</i>	-6,1	-5,2	-7,1	-7,6	-6,0	-6,1	-8,3
<i>ERβ an</i>	-5,9	-5,9	-6,8	-7,3	-6,0	-6,0	-8,1
<i>GR</i>	-6,2	-8,8	-7,2	-7,8	-5,7	-6,3	-7,6
<i>GR an</i>	-5,5	-8,0	-6,2	-6,7	-5,7	-5,9	-7,5
<i>LXRα</i>	-5,9	-7,7	-7,6	-8,5	-6,1	-6,8	-8,2
<i>LXRβ</i>	-6,3	-8,3	-7,8	-8,9	-6,7	-6,8	-8,0
<i>PPARα</i>	-5,7	-6,6	-7,1	-6,9	-5,7	-6,2	-7,7
<i>PPARβ</i>	-5,9	-7,9	-7,3	-7,8	-6,3	-6,3	-7,7
<i>PPARγ</i>	-5,6	-8,1	-7,1	-7,6	-5,6	-5,9	-7,1
<i>RXRα</i>	-6,4	-8,7	-7,4	-8,4	-6,0	-6,2	-7,9
<i>TRα</i>	-6,3	-7,0	-7,6	-8,7	-6,3	-6,8	-8,5
<i>TRβ</i>	-6,0	-7,3	-7,7	-8,2	-6,2	-6,6	-8,6

4.1.3 Razprava

4.1.3.1 Vezava na ER in AR

Največ podatkov o vplivu analgetikov na jedrne receptorje je na voljo za estrogenske in androgenske receptorje. Poleg *in vitro* študij so tu še *in vivo* študije na živalih kot tudi epidemiološke študije. Pri moških je v ospredju študij vpliv NSAID na androgenske receptorje, pri ženskah pa so nekatere študije pokazale, da redna uporaba NSAID povzroči znižano raven estrogena, in sicer zaradi zaviranja določenih encimov (npr. aromataza, 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza), vključenih v biosintezo in presnovo estrogenskih hormonov (53).

Z računalniškimi programi smo za izbrane neopioidne analgetike pridobili podatke, na osnovi katerih smo iskali literaturne vire, s katerimi bi rezultate ovrgli, oziroma potrdili. Model Estrogen Receptor Relative Binding Affinity programa Vega QSAR je z visoko zanesljivostjo in znotraj območja uporabnosti modela napovedal, da se ibuprofen, naproksen in acetilsalicilna kislina ne vežejo na estrogenski receptor. To potrjujejo tudi podatki, pridobljeni s programom Endocrine disruptome, saj je za te spojine možnost vezave na ER (obe konformaciji ER α in ER β) malo verjetna. Drugače je v primeru paracetamola in indometacina. Paracetamol naj bi po podatkih programa Vega QSAR deloval kot aktivna spojina, ki se veže na estrogenski receptor, prav tako to velja tudi za indometacin. Podatki in napovedi za ti dve spojini se nahajajo izven območja uporabnosti modela in so zato manj zanesljivi. Program Endocrine disruptome daje drugačne rezultate, saj je napovedal majhno verjetnost vezave paracetamola in indometacina na ER. Rezultati obeh modelov so dvoumni, glede na to, da so pri programu Vega QSAR podatki izven območja uporabnosti modela in je napoved malo zanesljiva, pa lahko sklepamo, da so rezultati modela Endocrine disruptome zanesljivejši. Podatke za vezavo na androgenski receptor smo pridobili le s programom Endocrine disruptome. Paracetamol, indometacin, ibuprofen in acetilsalicilna kislina se s srednjo verjetnostjo vežejo na antagonistično konformacijo AR, medtem ko se naproksen z veliko verjetnostjo veže na agonistično in antagonistično konformacijo androgenega receptorja.

Moška reprodukcija temelji na androgenih hormonih in drugih, ki jih proizvajajo celice testisov. Nekatere epidemiološke študije kažejo na povezavo med dolgotrajno uporabo paracetamola in ibuprofena med nosečnostjo ter povečano možnostjo pojavljanja

kriptorhizma (nespuščeni testisi) pri izpostavljenih moških potomcih (54). Vzrok kriptorhizma pa je prav zmanjšana izpostavljenost zarodka androgenom v času razvoja. Prav tako naj bi zmanjšana količina testosterona pri zarodku vplivala na povečano produkcijo tega hormona v odrasli dobi, kar lahko posledično negativno vpliva na splošno zdravje moških (55). Podobno naj bi delovala tudi acetilsalicilna kislina (54). Prav acetilsalicilna kislina in ibuprofen naj bi vplivala tudi na pojav hipospadije (prirojena napaka, pri kateri se na konici penisa ne razvije izvodilo sečnice) (56). Pri ženskah, ki so imele spontani splav, so našli morebitno povezavo med jemanjem naproksena in ibuprofena, ki sta bila pogosto uporabljena analgetika pri teh nosečnicah (56). V študiji iz leta 2015 so ugotovili, da modulacija vnetja izboljša zasnovo in preživetje moških potomcev, saj so ženske, ki so imele prej težave z neuspešnimi nosečnostmi, po prejemanju nizkih odmerkov acetilsalicilne kisline pred spočetjem z večjo verjetnostjo rodile moške potomce (56). Rezultati vseh prej omenjenih epidemioloških študij kažejo na potencialno neugodne izide, če nosečnica med nosečnostjo jemlje neopioidne analgetike.

V študiji, v kateri so sodelovali moški s prekomerno telesno težo in neaktivni predstavniki, je štiritedensko jemanje NSAID vplivalo na spremenjeno hormonsko ravnovesje. Pri sodelujočih se je znižala tako raven prostega testosterona kot tudi prostega estradiola in estrona, vendar je mehanizem delovanja neznan in so potrebne nadaljnje obsežnejše študije (53). Eden izmed zadnjih člankov, ki združuje tri ločene epidemiološke študije (od leta 1996 do 2004), zajema vpliv paracetamola, NSAID in kombinacij na reproduktivne hormone in semensko tekočino pri moških. Rezultati kažejo, da je pri uporabnikih NSAID prišlo do rahlo višjega serumskega nivoja testosterona, kar je v nasprotju s podatki iz ostalih študij, ki v večini kažejo na vpliv analgetikov na zmanjšano produkcijo testosterona. Mehanizem ni znan, verjetno pa po mnenju strokovnjakov pri tem sodelujejo prostaglandini. Vpliva na ostale hormone in kvaliteto sperme ni bilo opaziti. Problem te študije je, da niso znani odmerki, režim jemanja, pogostost jemanja itd, ampak imamo le potrditev, da je udeleženec študije jemal analgetike oz. jih ni. Za potrditev rezultatov študije bi bilo potrebnih več konkretnjših podatkov in natančnejša analiza (57).

Obstaja tudi obsežna raziskava o vplivu ibuprofena na androgene, ki je bila izvedena s kombinacijo treh metod – kontrolirano klinično študijo, *ex vivo* organskim modelom človeških testisov in standardizirano *in vitro* steroidogeno celično linijo človeškega izvora. S študijo so pokazali, da ibuprofen izzove kompenziran hipogonadizem, in sicer s

selektivnim zaviranjem izražanja genov, ki sodelujejo pri steroidogenezi, sintezi peptidnih hormonov in prostaglandinov. Zdravim odraslim moškim so aplicirali 600 mg ibuprofena, plazemske koncentracije pa so v povprečju znašale 25-35 µg/ml. Štiriinštirideset dni (kratkoročna izpostavljenost) so preučevali nivo testosterona in 17β-estradiola, a niso zaznali sprememb v ravni teh dveh hormonov. Ugotovili pa so, da uporaba ibuprofena pri odraslih moških privede do povišanja LH (luteinizirajoči hormon), zmanjšane razmerja prostega testosterona in LH in zmanjšanja ravni hormona AMH (anti-Müllerjev hormon) (60). LH stimulira nastajanje testosterona v modih, medtem ko je AMH pomemben predvsem pri razvoju zarodka, kjer sodeluje pri diferenciaciji moškega spola. S starostjo nivo tega hormona pri moških pade, po sedaj znanih podatkih pa njegova prisotnost v krvi kasneje v starosti ne vpliva na nobeno od funkcij telesa (58, 59). Zmanjšanje razmerja prostega testosterona in LH (za 18 % po 14 dneh in 23 % po 44 dneh) je bilo predvsem posledica povečane ravni LH (po 14 dneh se je povečala za 23 %, po 44 dneh pa za 33 %). Odzivnost testisov na gonadotropine se je verjetno zmanjšala med izpostavljenostjo ibuprofenu. Podatki iz poskusov *ex vivo* to tezo podpirajo, kar kaže na to, da je bila posledica aplikacije ibuprofena predvsem antiandrogeno delovanje. Pri moških, ki ibuprofen jemljejo pri kroničnih bolečinah in artritisu, lahko kompenzirani hipogonadizem preide v primarnega, za katerega je značilna nizka koncentracija testosterona in posledično imajo ti moški probleme z libidom, zmanjšano mišično maso, depresijo in utrujenostjo. Antiandrogeno delovanje na Leydigove celice so ugotovili na podlagi *ex vivo* študij (model so bili odrasli testisi) tudi v primeru indometacina in acetilsalicilne kisline (60).

V študijah na živalih so strokovnjaki ugotovili še dodatne vplive analgetikov na estrogenski in androgenski sistem. Paracetamol lahko po zbranih podatkih pri moških predstavnikih povzroči zmanjšanje anogenitalne razdalje (t.j. razdalja med anusom in korenem penisa; glede na težo lahko izračunamo anogenitalni indeks = $AGDi = AGD/koren\ telesne\ teže$) in pomanjkanje androgenov. Posledice se lahko kažejo kot že prej omenjeni kriptorhizem, hipospadija, nerazvita prostata, nenormalna dolžina penisa. Vse to se je pokazalo že pri najnižjem odmerku 150 mg/kg/dan, ki je bil uporabljen v študiji na podganah in ustreza približno trikratnemu priporočenemu dnevni odmerku pri ljudeh. Zmanjšanje androgenov je bilo prisotno tudi po jemanju acetilsalicilne kisline pri podganah in se je pokazalo kot zaostala rast plodu (56). Znižanje koncentracije testosterona v plazmi in spremembe pri izločanju LH so zabeležili pri študiji na podganah,

ki so jim aplicirali indometacin (1-2,5 mg/dan) ali acetilsalicilno kislino (5 mg/100 g telesne mase) dlje časa (več kot 15 dni) (61). V drugi študiji je odmerek paracetamola 50 mg/kg/dan pri miših povzročil zmanjšano število foliklov in plodnost samic, ki so bile kot zarodki izpostavljene paracetamolu, kar je lahko povezano s hormonskim delovanjem (56).

Z *in vitro* študijami lahko dobro nakažemo vplive snovi na sisteme in so osnova za *in vivo* študije na živalih in epidemiološke študije. V *in vitro* študiji, kjer so kot model uporabili testise odraslih moških ter steroidogeno celično linijo, so preučevali vpliv paracetamola, acetilsalicilne kisline in indometacina na androgeno delovanje s koncentracijami, ki jih dosežemo z odmerki pri običajnih analgetičnih terapijah (1 g paracetamola, 600 mg ibuprofena in 100 mg indometacina). Vse tri učinkovine so izkazale antiandrogene učinke in vplive na hormonsko ravnovesje, ki so se razlikovali glede na učinkovino, odmerek in dobo izpostavljenosti. V vseh primerih se je zmanjšala sinteza testosterona in prostaglandinov. Največji upad sinteze testosterona je bil pri acetilsalicilni kislini, najmanjši pri indometacinu. Glede na podatke je najslabši zaviralec sinteze prostaglandinov paracetamol, največje razlike pri sintezi pa so bile opazne pri indometacinu (61). Močne antiestrogene učinke je na človeški celični liniji T47D, ki so jo uporabili za *in vitro* preučevanje aktivnosti vezave učinkovin na receptorje, pokazal ibuprofen. V isti študiji so poskuse delali tudi na *in vitro* testu s kvasovkami in tudi tam je ibuprofen pokazal antiestrogeni odziv. Naproksen pa je v tem testu izkazal antagonističen odziv na androgenski receptor (62).

Raziskave o endokrinem delovanju neopioidnih analgetikov na estrogenske in androgenske receptorje in hormone skrivajo v ozadju zapletene mehanizme, ki bodo potrebovali več časa in študij za razjasnitev. Znano je, da lahko določene učinkovine zavirajo izražanje genov za steroidogene encime ter encime, ki sodelujejo pri sintezi hormonov in s tem posredno zavirajo sintezo androgenov in estrogenov. To se kasneje izraža predvsem kot spremembe v razvoju spolnih organov in same reprodukcije. Jasnih poti zaviranja in vpliva ni, obstajajo pa teze in ugibanja, da lahko določeni odmerki analgetikov vplivajo na delovanje hormonov (56).

4.1.3.2 Vezava na ostale receptorje

Študije o vezavi analgetikov na ostale receptorje so zelo redke in zato o teh receptorjih lahko povzamemo ugotovitve le na podlagi naših rezultatov. Računalniški programi

temeljijo na podatkovnih bazah, ki so lahko zastarele in pomanjkljive, zato rezultati niso stoodstotno zanesljivi. Na GR se po podatkih programa Endocrine disruptome s srednjo verjetnostjo vežeta indometacin in naproksen, ostali neopioidni analgetiki pa z manjšo verjetnostjo. Na TR α se s srednjo verjetnostjo veže ibuprofen in naproksen, slednji pa se s srednjo verjetnostjo veže tudi na TR β . Glede na rezultate programa Endocrine disruptome je vezava izbranih neopioidnih analgetikov na LRX (α in β), PPAR (α , β in γ) in RXR α malo verjetna. Po podatkih ene izmed študij, kjer so raziskovali vpliv analgetikov na človeške testise zarodkov in produkcijo testosterona, se indometacin lahko veže na PPAR γ in ga aktivira, kar je lahko molekularna osnova za določene biološke učinke na testisih zarodka (rast in razvoj testisov, vpliv na plodnost in kakovost sperme) (63, 64).

4.2 Napoved različnih vidikov reproduktivne toksičnosti

4.2.1 Program Derek Nexus

Program Derek Nexus s svojimi nastavitvami omogoča napoved različnih vrst toksičnosti. V naši nalogi smo za izbrane analgetike preverili razvojno toksičnost, testikularno toksičnost in teratogenost. Verjetnost, da je spojina toksična, je razdeljena glede na stopnje verjetnosti, mi pa smo izbrali naslednje: gotova (*certain*), skoraj gotova (*probable*), verjetna (*plausible*), dvoumna (*equivocal*).

S programom smo napovedali naslednje rezultate:

- **Timol**, ki je naša negativna kontrola, ni nevaren za reproduktivne organe, saj je program ni opredelil kot toksične.
- Pozitivna kontrola **BPA** izkazuje dvoumno verjetnost testikularne toksičnosti, a ni reproduktivno toksična in teratogena.
- **Paracetamol, indometacin, ibuprofen, naproksen in acetilsalicilna kislina** glede na napoved programa Derek Nexus niso toksične spojine in ne predstavljajo tveganja za reproduktivno toksičnost, teratogenost in testikularno toksičnost.

4.2.2 Program Vega QSAR, model Developmental Toxicity model

S pomočjo modela Developmental Toxicity programa Vega QSAR smo napovedali razvojno toksičnost. Podobno kot model za endokrino toksičnost tudi ta napove aktivnost spojine (aktivna ali neaktivna) in zanesljivost napovedi (nizka *, srednja ** ali visoka ***)

zanesljivost). Tudi tu so za nekatere spojine na voljo eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela, vendar pri teh zanesljivost ni označena z zvezdicami.

Za izbrane analgetike in kontroli so podatki za razvojno toksičnost zbrani v preglednici VI

- Za negativno kontrolo **timol** je program z visoko zanesljivostjo napovedal, da je spojina razvojno toksična. Napoved se nahaja znotraj uporabnosti modela.
- Pozitivna kontrola **BPA** je prav tako razvojno toksična, napoved pa je visoko zanesljiva, čeprav nimamo možnosti preverjanja in potrditve z eksperimentalni podatki, saj ti niso na voljo v podatkovni bazi modela. Napoved je znotraj območja uporabnosti modela.
- **Paracetamol** je razvojno netoksična spojina, kar je podprto tudi z eksperimentalnimi podatki, ki so na voljo. Napoved je znotraj območja uporabnosti modela.
- Program predvideva, da je **indometacin** netoksična spojina. Eksperimentalni podatki so na voljo. Napoved je znotraj območja uporabnosti modela.
- **Ibuprofen** je razvojno toksičen, za kar obstajajo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi. Napoved je znotraj območja uporabnosti modela.
- **Naproksen** je prav tako razvojno toksičen, na voljo imamo tudi eksperimentalne podatke. Napoved je znotraj območja uporabnosti modela.
- Za **acetilsalicilno kislino** napovedi kažejo na neaktivnost, za kar ni na voljo eksperimentalnih podatkov, a je hkrati zanesljivost nizka. Napoved ni znotraj območja uporabnosti modela.

Preglednica VI: Rezultati programa Vega QSAR za napoved razvojne toksičnosti za izbrane analgetike in kontroli

SPOJINA	AKTIVNOST	ZANESLJIVOST	EKSP. PODATKI
<i>timol (-)</i>	aktivna	****/visoka	niso na voljo
<i>BPA (+)</i>	aktivna	***/visoka	niso na voljo
<i>paracetamol</i>	neaktivna	dobra	na voljo
<i>indometacin</i>	neaktivna	dobra	na voljo
<i>ibuprofen</i>	aktivna	dobra	na voljo
<i>naproksen</i>	aktivna	dobra	na voljo
<i>acetilsalicilna kislina</i>	neaktivna	*/nizka	niso na voljo

4.2.3 Program Vega QSAR, model Developmental/Reproductive Toxicity library

S pomočjo modela Developmental/Reproductive Toxicity library, ki je prav tako del programa Vega QSAR, smo napovedali razvojno/reproduktivno toksičnost. Princip napovedi je enak kot pri prejšnjih dveh modelih, saj le-ta napove aktivnost spojine (aktivna ali neaktivna) in zanesljivost napovedi (nizka *, srednja ** ali visoka *** zanesljivost). Dodatno so za nekatere spojine na voljo eksperimentalni podatki v podatkovni bazi modela, vendar pri teh zanesljivost ni označena z zvezdicami.

Za izbrane analgetike in kontrole so podatki za razvojno/reproduktivno toksičnost zbrani v preglednici VII.

Preglednica VII: Rezultati programa Vega QSAR za napoved razvojne/reproduktivne toksičnosti za izbrane analgetike in kontrole

<i>SPOJINA</i>	<i>AKTIVNOST</i>	<i>ZANESLJIVOST</i>	<i>EKSP. PODATKI</i>
<i>timol (-)</i>	neaktivna	*/nizka	niso na voljo
<i>BPA (+)</i>	aktivna	***/visoka	niso na voljo
<i>paracetamol</i>	neaktivna	*/nizka	niso na voljo
<i>indometacin</i>	aktivna	zmerna	na voljo
<i>ibuprofen</i>	aktivna	dobra	na voljo
<i>naproksen</i>	aktivna	dobra	na voljo
<i>acetilsalicilna kislina</i>	neaktivna	*/nizka	niso na voljo

- Za negativno kontrolo **timol** je program napovedal neaktivnost, a z nizko zanesljivostjo. Prav tako je podal informacijo, da se spojina nahaja izven območja uporabnosti modela.
- Napoved za pozitivno kontrolo **BPA** je aktivna in visoko zanesljiva, vendar eksperimentalni podatki niso na voljo v podatkovni bazi. Spojina se nahaja znotraj uporabnosti modela.
- **Paracetamol** je razvojno/reproduktivno netoksičen, eksperimentalnimi podatki niso na voljo, sama zanesljivost pa je nizka. Nahaja se izven uporabnosti modela.
- **Indometacin** je po eksperimentalnih podatkih toksična spojina, a je zanesljivost zmerna. Obstaja možnost, da se nahaja izven uporabnosti modela.
- **Ibuprofen** je razvojno/reproduktivno toksična spojina, kar potrjujejo tudi eksperimentalni podatki v podatkovni bazi. Zanesljivost napovedi je dobra, nahaja se znotraj uporabnosti modela.

- **Naproksen** je prav tako razvojno/reproduktivno toksičen, na voljo imamo tudi eksperimentalne podatke, napoved je dobra in se nahaja znotraj uporabnosti modela.
- **Acetilsalicilna kislina** je po napovedih neaktivna, za kar ni eksperimentalnih podatkov, hkrati pa je zanesljivost napovedi nizka ter izven območja uporabnosti modela.

4.2.4 Program TEST

Program TEST poda številčno napoved verjetnosti, da je spojina razvojno toksična na podlagi strukture izbrane spojine z modelom QSAR. Številčni razpon je med 0 in 1, kjer 0 pomeni najnižjo, 1 pa predstavlja najvišjo vrednost. V praksi pomeni, da so spojine z vrednostmi med 0,50 in 1,00 (50-100 %) razvojno toksične, spojine z vrednostmi med 0 in 0,49 (0-49 %) pa niso razvojni toksikanti. Vrednost hkrati predstavlja tudi stopnjo/odstotek verjetnosti, da je snov razvojno toksična, in sicer višja vrednost pomeni večjo verjetnost za toksičnost. Dodatno je za vsako spojino opisano, ali je ta razvojno toksična ali ne.

Za izbrane analgetike in kontroli so podatki za razvojno toksičnost v programu TEST prikazani v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Napoved programa TEST za reproduktivno toksičnost izbranih analgetikov in kontroli

<i>SPOJINA</i>	<i>VREDNOST</i>	<i>RAZVOJNA TOKSIČNOST: DA ALI NE</i>
<i>timol (-)</i>	0,99	DA (99 %)
<i>BPA (+)</i>	0,68	DA (68 %)
<i>paracetamol</i>	0,52	DA (52 %)
<i>indometacin</i>	0,79	DA (79 %)
<i>ibuprofen</i>	0,68	DA (68 %)
<i>naproksen</i>	0,89	DA (89 %)
<i>acetilsalicilna kislina</i>	0,57	DA (57 %)

- Za negativno kontrolo **timol** je program napovedal 99 % (vrednost 0,99) verjetnost za reproduktivno toksičnost.
- Pozitivna kontrola **BPA** je razvojno toksična, verjetnost je 0,68.
- Za **paracetamol** in **acetilsalicilno kislino** je rezultat malo nad mejo za reproduktivno toksičnost (0,52 za paracetamol in 0,57 za ASA).

- Program je za vse ostale spojine napovedal večjo verjetnost reproduktivne toksičnosti: 0,79 za **indometacin**, za **ibuprofen** 0,68 in 0,89 za **naproksen**.

4.2.5 Razprava

Kot smo omenili že v uvodu, sta pojma reproduktivna in razvojna toksičnost precej široka in zajemata tako sposobnosti organizmov za razmnoževanje, kot tudi vplive na razvoj zarodka med nosečnostjo in spremembe izražene po rojstvu. Obstajajo raziskave, ki zajemajo vplive analgetikov na vse omenjene spremembe. Naše izbrane preiskovane učinkovine so neopioidni analgetiki, ki so večinoma dostopni vsem in jih je možno dobiti v lekarni tudi brez recepta. Ravno manjša kontrola nad jemanjem le-teh je razlog za večjo skrb glede reproduktivne in razvojne toksičnosti. Glede na razvrstitev učinkovin za uporabo v nosečnosti po FDA (poglavje 1.5) v Sloveniji nobeden izmed naših analgetikov ne spada v kategorijo A (varne zdravilne učinkovine). V kategorijo B spadajo paracetamol in NSAID, če jih nosečnica jemlje v 1. in 2. trimesečju. Acetilsalicilna kislina pa spada v kategorijo C, če se uporablja v 1. in 2. trimesečju, v kategoriji D pa so NSAID in ASA, če z njimi nosečnica lajša bolečine v zadnjem trimesečju svoje nosečnosti (30).

4.2.5.1 Paracetamol

Paracetamol velja za prvo izbiro v času nosečnosti. Z njim nosečnice lajšajo blage in zmerne bolečine, zato je smiselno razmišljati o vplivu učinkovine na razvoj zarodka. Rezultati raziskav pri ljudeh ne izkazujejo povečanega števila prirojenih nepravilnosti zaradi njegove uporabe, ni znan teratogen, ne vpliva na trombocite, pri večjih odmerkih pa je hepatotoksičen (30). Program Derek Nexus paracetamola ni prepoznal kot teratogenega ali testikularno oziroma reproduktivno toksičnega, kar smo potrdili tudi s programom Vega QSAR, a je bila pri rezultatih tega modela zanesljivost nizka in rezultati izven območja uporabnosti modela. Bolj zanesljivi rezultati so na voljo za razvojno toksičnost, kjer isti program paracetamola ni označil kot razvojno toksičnega. Malenkost nad mejo razvojne toksičnosti so bili rezultati, napovedani s programom TEST. Kljub temu so po podatkih različnih študij (*in vivo* študije na živalih in *in vitro* študije na različnih modelih) možne nekatere reproduktivne in razvojne anomalije, ki so posledica jemanja te učinkovine za lajšanje bolečin.

V *in vivo* študijah na živalih so pri aplikaciji visokih odmerkov (vsaj 400 mg/kg, intraperitonealno, 5 dni) pri mišjih samcih zaznali zaviranje sinteze DNA v testisih, kar se je

kasneje pokazalo kot zmanjšana masa testisov, spremembe in zakasnitev spermiogeneze in spremembe kromatina v spermi (65). V drugi študiji so na miših preučevali reproduktivno in razvojno toksičnost paracetamola v odmerkih 375, 715 in 1430 mg/kg. Paracetamol dokazano prehaja placento in koncentracija učinkovine v krvi matere je najverjetneje enaka tudi pri zarodku. Pri najvišjem odmerku je bilo opazno zmanjšanje plodnosti in preživetja novorojenih miši pri generaciji F0, pri generaciji F1 pa zmanjšanje telesne teže mladičev. NOAEL vrednost za te učinke je znašala 715 mg/kg. Pri tem odmerku so opazili tudi nenormalne spermije (66). Študija na brejih podganah, ki so jim aplicirali odmerke 150, 500 ali 1500 mg/kg celoten čas brejosti, ni pokazala histoloških sprememb jeter in ledvic pri najnižjih odmerkih. Pri višjih odmerkih je analiza s svetlobnim in elektronskim mikroskopom pokazala nekrotične površine jeter in ledvic, znake nekroze hepatocitov in ledvičnega tkiva, kar kaže na škodljiv vpliv paracetamola na mater in zarodek (67). Izpostavljenost paracetamolu naj bi vplivala tudi na količino testosterona pri moških potomcih. Raziskave te predpostavke so se lotili s pomočjo ksenografskega modela razvoja testisov zarodka pri ljudeh, pri čemer so fragmente tkiva testisov zarodka transplantirali v kastrirane miši, tretirane s hCG. Izpostavljenost visokim odmerkom (350 mg/kg, 1-krat dnevno, 7 dni) je pri miših povzročila zmanjšanje produkcije testosterona čez čas izpostavljenosti. Zmanjšanje testosterona so opazili tudi pri izpostavitvi normalnim odmerkom, ekvivalentnim tistim, ki jih jemljemo ljudje (20 mg/kg, 3-krat dnevno, 7 dni). V obeh primerih pa po enem dnevu ni bilo opaznih sprememb. Kot potrditev potencialne toksičnosti so v študiji izmerili tudi plazemske koncentracije paracetamola (uporabili so enak peroralni odmerek, enako analizo metodo) pri miših s transplantiranim ksenografskim modelom, ki so eno uro po aplikaciji znašale med 0,74 in 0,94 µg/ml, kar je precej pod koncentracijo, ki jo dosežemo pri normalnem odmerjanju pri odraslih ljudeh (6 µg/ml) (55).

Če povzamemo naše rezultate in jih primerjamo z literaturnimi, je mogoče zaključiti, da lahko paracetamol pri običajnih odmerkih vpliva predvsem na moško reproduktivno zmožnost, višji odmerki pa lahko negativno vplivajo na plod. Rezultati uporabljenih programov so pokazali majhno verjetnost pojava anomalij in toksičnih učinkov. Pri analizi moramo upoštevati, da podatki iz živalskih študij verjetno ne veljajo tudi za ljudi, vendar je zaradi pojava določenih učinkov potrebna previdnost. Med ljudmi in živalmi obstajajo razlike, a še vedno paracetamol v predpisanih odmerkih in pri kratkotrajnem jemanju po

vseh zbranih podatkih ne povzroča težav v reproduktivni dobi ljudi in med samo nosečnostjo.

4.2.5.2 NSAID

Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine so na trgu prisotne že dolgo časa, a še vedno niso znani reproduktivni in razvojni učinki dolgotrajnega jemanja teh zaviralcev prostaglandinov. Po sedaj znanih podatkih lahko NSAID zamaknejo čas poroda pri uporabi v zadnjem trimesečju, saj zavirajo krčenje maternice, povzročijo lahko zmanjšanje volumna amnijske tekočine in pljučno hipertenzijo pri novorojenčku. Indometacin, ibuprofen in naproksen lahko povzročijo okvare Botallovega voda in težave novorojenčkov pri izločanju seča (30). Medtem ko je program Derek Nexus vse NSAID označil kot netoksične glede na izbrane kriterije, je program Vega QSAR z zmerno zanesljivostjo izven območja uporabnosti modela kot reproduktivno toksičnega označil indometacin. Ibuprofen in naproksen sta glede na pridobljene rezultate reproduktivno toksična neopiodna analgetika (napoved je dobra in se nahaja znotraj modela). Developmental Toxicity model programa Vega QSAR je kot razvojno toksični spojini označil ibuprofen in naproksen in pri teh dveh so rezultati zanesljivi in se nahajajo znotraj območja uporabnosti modela. Indometacin ni razvojno toksična učinkovina. Program TEST je vse NSAID označil kot razvojno toksične.

- INDOMETACIN

Indometacin je, podobno kot paracetamol, v študiji z brejimi podganami, ki so jim aplicirali učinkovino (*in utero*, enkratni odmerek, odmerek znotraj terapijskega pri ljudeh), vplival na število in razvoj zarodnih celic plodu (fetal germ cells, FGC) pri zarodnih ženskega in moškega spola. Posledično to vpliva na plodnost samic pri F1 in F2 generacijah. Opazili so manjše število FGC in velikost jajčec pri F1 generaciji ter manjšo velikost jajčec in manjše število foliklov pri generaciji F2. Če lahko prenesemo rezultate na ljudi, bi se posledice jemanja indometacina (in tudi paracetamola) v nosečnosti lahko pokazale pri hčerah in vnukinjah, a bi bile za potrditev potrebne dodatne epidemiološke študije (68). Po drugi strani podatki kažejo, da indometacin pri miših in podganah ne vpliva na reprodukcijo v odmerkih do 0,5 mg/kg dnevno. Pri odmerku 4 mg/kg/dan je prišlo do počasnejše osifikacije plodu, kar se kasneje odraža kot nižja teža plodu, ostalih malformacij pa ni bilo opaziti (69, 70).

Glede na pridobljene podatke vidimo, da indometacin ne velja za reproduktivno oziroma razvojno toksično učinkovino. Tudi programi so ga večinoma označili kot netoksičnega, razen programa TEST, ki je vse označil kot toksične. Model Developmental/Reproductive Toxicity library programa Vega QSAR ga z zmerno verjetnostjo označuje kot toksičnega, a zunaj uporabnosti modela. Kot pri vsaki spojini, so tudi tu možni stranski učinki, a pri indometacinu se na podlagi literaturnih podatkov kažejo le kot reproduktivni vplivi na predstavnice ženskega spola prihodnjih generacij pri živalih. Vplivi na ledvične funkcije novorojenčkov so sicer znani, a indometacin ob kratkotrajnem jemanju in v predpisanih odmerkih ne predstavlja nevarnosti.

- *IBUPROFEN*

Slabše izide napovedi računalniških programov smo pridobili v primeru ibuprofena, ki je prav tako pogosta učinkovina za lajšanje bolečin, saj zavira sintezo prostaglandinov. Ibuprofen je pogosto uporabljen analgetik v prvem trimesečju, ko se zarodne celice jajčnikov najhitreje razvijajo in proliferirajo. To je pomemben podatek, saj nekateri predvidevajo, da na razvijanje jajčnikov in sposobnost reprodukcije žensk vpliva že obdobje zarodka v maternici. Pri glodalcih je na primer znano, da analgetiki vplivajo na razvoj jajčnikov. To so ugotavljali s pomočjo kulture človeških jajčnikov zarodka (starih 7-12 tednov), ki so bile izpostavljene ibuprofenu v koncentraciji 100 μM določeno časovno obdobje (2, 4 ali 7 dni). Eksplantati jajčnikov, ki so bili izpostavljeni koncentracijam 10 in 100 μM so povzročili zmanjšano število celic, manj proliferajočih celic, povečano apoptozo ter manjše število zarodnih celic ne glede na starost zarodka. Rezultati *ex vivo* testa na jajčnikih zarodkov torej kažejo na pojav težav pri jemanju ibuprofena že v prvem trimesečju in ne le v kasnejših obdobjih. Seveda moramo tu upoštevati variabilnost med osebami, a nevarnost vseeno obstaja (71). Ibuprofen naj bi vplival tudi na ovulacijo pri ženskah. V študiji na ljudeh pri skupini žensk, starih med 20-40 let z normalnim ciklusom, ki so jim 10 dni peroralno aplicirali ibuprofen, v odmerku 800 mg, 3-krat na dan, opaznih sprememb v ovulaciji ni bilo. Opazili so sicer povišanje LH, a so predpostavili, da bi naj ibuprofen zaviral ovulacijo le pri določenih posameznicah in ne na splošno (72). V študiji, ki je preučevala učinke kroničnega jemanja nizkih do zmernih odmerkov ibuprofena pri miših (0,56, 1,12 ali 1,68 mg / 100 g na dan; 60 ali 35 dni), so ugotavljali vplive na ovulacijo, zorenje jajčec, spermatogenezo in spermije, sposobnost oploditve idr. Prišli

so do zaključkov, da je najnižji odmerek pri samicah povzročil odklone pri ovulaciji (prišlo je do zmanjšanja in zaviranja), pri samcih pa je srednja koncentracija povzročila manjšo sposobnost *in vitro* oploditve (73). Pri visokih odmerkih ibuprofena pa lahko pride do zastoja v rasti in vidnih razvojnih sprememb zarodka, kar so preučevali v študiji z brejimi podganami, ki so jim peroralno aplicirali ibuprofen (3-krat dnevno od 8. do 21. dne, pri čemer so bili maksimalni dnevni odmerki 25.5, 255 in 600 mg/kg) (74). Podobne rezultate so dobili tudi v študiji, kjer so mišim aplicirali 100 mg ibuprofena na kg telesne mase v različnih obdobjih brejosti in pred njo. Zbirali so podatke o vplivu na zarodek ter na jajčnike in maternico matere. V primerjavi s kontrolo je bilo opazno zmanjšano število uspešnih ugnezditev in več splavov, spremembe v telesni teži in fizičnih lastnosti zarodka, nižje koncentracije DNA in RNA v možganih zarodka ter histološke spremembe na jajčnikih in maternici matere (75).

Glede na naše pridobljene rezultate lahko potegnemo vzporednice z literaturnimi podatki in ugotovimo, da ibuprofen negativno vpliva na razvoj zarodka med samo nosečnostjo in samo reprodukcijo pri ljudeh. Oba modela programa Vega QSAR sta učinkovino z visoko zanesljivostjo označila kot reproduktivno in razvojno toksično in to znotraj območja uporabnosti modela, kar je potrdil tudi program TEST. Ker so bili rezultati študij na živalih in ljudeh pozitivni in sama učinkovina v nekaterih obdobjih nosečnosti negativno vpliva na plod, lahko zaključimo, da jemanje ibuprofena pred in med nosečnostjo ni priporočljivo. Vplivi na ovulacijo in jajčnike pri ženskah, sposobnost oploditve pri moških, reproduktivnost na splošno, razvojne spremembe in zmanjšana rast zarodka so razlogi, da omejimo njegovo uporabo oziroma se držimo predpisanih odmerkov. Še bolj priporočljivo pa je, da ljudje, ki že imajo probleme z zgoraj naštetimi stvarmi, posežejo po drugih neopioidnih analgetikih.

- *NAPROKSEN*

Podobna napoved kot pri ibuprofenu je tudi pri naproksenu. Tudi zanj sta modela programa Vega QSAR napovedala najslabši izid izmed vseh in pri tej učinkovini moramo prav tako paziti in biti pozorni. Tudi glede na razvrstitev FDA ne spada med najbolj varne zdravilne učinkovine v času nosečnosti.

Ugotovili so, da naproksen sicer prehaja placento, ampak se v krvnem obtoku zarodka pojavlja v nizkih koncentracijah. Problem te študije pri nosečnicah, ki so se odločile za sprav v prvem trimesečju, je kratkotrajna izpostavljenost (2 odmerka po 500 mg). Prav zaradi tega je jemanje naproksena v prvih mesecih, zaradi možnih teratogenih učinkov odsvetovano, kasneje pa lahko pride do drugih problemov, ki so značilni za vse NSAID (76). V eni zmed študij so proučevali vpliv jemanja naproksena (in tudi ibuprofena) med nosečnostjo na pojav blažjih srčnih anomalij pri novorojenčkih (ventrikularne in atrijske septične napake). Možnost pojava srčnih napak zaradi naproksena je 1,5 %, pri ibuprofenu pa znaša 1,3 %. Rezultat analize dodatno kaže, da je kar pet mater od šestih novorojenčkov z razcepom dlesni in ustnic med nosečnostjo jemalo naproksen (kar 95 % nevarnost), ena izmed njih pa ibuprofen. Razcep dlesni in ustnice se sicer pojavi pri 3 novorojenčkih na 100.000 rojstev, a vendar bi lahko obstajala povezava tudi z jemanjem naproksena (77). V *in vivo* študiji s samicami kuncev, ki so jim 7 ur po aplikaciji hCG intravensko aplicirali naproksen (odmerek 1 mg/kg ter 50 mg/kg), so ugotavljali vpliv naproksena na jajčnike in ovulacijo. Splošno znano je, da naj bi se koncentracija prostaglandinov znatno povečala tik pred ovulacijo, saj le-ti povzročajo krčenje maternice. Ker NSAID zavirajo encim ciklooksigenazo, ki vpliva na sintezo prostaglandinov, bi posledično lahko vplivali tudi na izločanje prostaglandinov, ki sodelujejo pri ovulaciji. Podatke so zbrali po 24 urah. Ovulacija se je pri kuncih pri nižjem odmerku iz kontrolnih 88 % zmanjšala na 40 %, pri višjem pa je bil odstotek enak 0 % (100% inhibicija pri odmerku 50 mg/kg). Naproksen po rezultatih te študije znatno zmanjša učinkovitost ovulacije in proizvodnjo prostaglandinov. Podobne rezultati so dobili tudi v primeru acetilsalicilne kisline, le da je bil odmerek 100 mg/kg, apliciran 6,5 ure po aplikaciji hCG. Pri ASA se je kontrolni odstotek učinkovitosti ovulacije znižal na 40 % (78). Prostaglandini pa lahko vplivajo tudi na reprodukcijo pri moških predstavnikih. Pri podganah moškega spola so po 35-dnevni aplikaciji naproksena v odmerku 10 mg/kg/dan opazovali in zbirali rezultate o reproduktivnih zmožnostih in vplivu učinkovine na spermo. Zmanjšala sta se število in gibljivost spermijev. Zaznali so tudi poškodbe semenskih tubulov, žilno kongestijo, prisotnega je bilo več vezivnega tkiva, kar lahko privede do nenormalne spermatogeneze in zmanjšane plodnosti samcev. Glavni vzrok za nepravilnosti v reproduktivnem sistemu je torej zmanjšanja sinteza prostaglandinov, v kombinaciji z oksidativnim stresom, ki je posledica toksičnosti (79).

Podatki kažejo na to, da preveliko in kronično jemanje naproksena v reproduktivni dobi ni priporočljivo, saj lahko vpliva na ovulacijo pri ženskah in na spermatogenezo pri moških. Pri novorojenčkih lahko povzroča kardiovaskularne motnje ter druge fizične anomalije. Bolje je, da se mu nosečnice izognejo in v nujnih primerih, ko so potrebni analgetiki, uporabijo druge, bolj varne učinkovine za lajšanje bolečin.

- *ACETILSALICILNA KISLINA*

Acetilsalicilna kislina je problematična predvsem v zadnjih mesecih nosečnosti, saj lahko preloži porod, zaradi zaviranja agregacije trombocitov pa lahko povzroči poporodne krvavitve. Pri novorojenčku lahko povzročijo zavirano delovanje trombocitov nekaj dni po porodu, večji odmerki pa možganske krvavitve pri nedonošenčkih (30). Gre za znano in pogosto analgetično učinkovino, ki jo bolj poznamo pod imenom aspirin. Zanj velja, da naj bi se po kriterijih varnosti uvrstila tik za paracetamolom, saj so jo modeli programov Derek Nexus in Vega QSAR označili kot reproduktivno in razvojno netoksično ter neteratogeno. Vendar je ob tem potrebno vedeti, da rezultati kažejo na nizko zanesljivost, ki se nahaja zunaj območja uporabnosti modela. Program TEST je tudi acetilsalicilno kislino uvrstil med toksične učinkovine, a je vrednost ravno nad mejo, zato lahko predvidevamo, da je rezultat manj zanesljiv.

Pri študiji na brejih podganah, ki so jim 10 dni aplicirali acetilsalicilno kislino v odmerkih 125 mg/kg, 250 mg/kg in 500 mg/kg, so opazili spremembe pri zarodkih. Pri višjih odmerkih so bile prisotne spremembe skeleta zarodkov, kar je bilo predvsem vidno na rebrih in hrbtenici (80). Zaradi sumov vpliva toplote na prostaglandine in posledično teratogenost so na brejih miših izvedli študijo, v kateri so jim prvi dan brejosti aplicirali odmerek 200 mg/kg in jih po eni uri za 10 minut izpostavili termostatični kopeli s temperaturami med 38 in 43 °C. Po 18 dneh so zbrali rezultate in ugotovili, da sam aspirin ni teratogen, vendar je zaradi hipertermije prišlo do več malformacij skeleta pri zarodkih, kar potrjuje tezo, da naj bi prostaglandini zaščitno delovali pri teratogenezi, povzročeni s hipertermijo. Za dokončno potrditev teh učinkov in oceno tveganja ali se ti učinki izražajo tudi na ljudeh, bi bilo potrebnih več obsežnih študij (81). Prav tako bi bile potrebne razširjene študije, da bi lahko prenesli rezultate študije embriotoksičnosti na brejih podganah, ki so jim aplicirali odmerek podoben terapevtskemu pri ljudeh (50 mg/kg/dan, intravensko). Razen dilatacije sečevoda pri

nekaterih zarodkih do toksičnih učinkov ni prišlo, vendar se moramo izogibati večjim odmerkom, ki so lahko nevarni za plod v nosečnosti (82). Po drugi strani so pri podganjih zarodkih, ki so jih izpostavili acetilsalicilni kislini, opazili znižan srčni utrip, malformacije obraza in repa (83). Pri brejih podganah so prav tako preizkušali vpliv acetilsalicilne kisline na možgane in videli, da pri odmerku 37,5 mg/kg/dan pride do spremenjene teže in dimenzij možganov (84). Poleg brejih podgan so bili preiskovani subjekti tudi podganji samci, pri katerih so 30 oziroma 60 dni aplicirali acetilsalicilno kislino v odmerku 12,5 mg/kg. Opažena je bila sprememba testisov, znižana gostota semenske tekočine, število in mobilnost spermijev ter spremenjena spermatogeneza, kar je najbrž povezano predvsem z androgenim delovanjem ter posledično z nenavadno hormonsko aktivnostjo (85, 86). Odmerek 100 mg/kg (15 oziroma 30 dni) pri samicah albino podgane je povzročil višjo koncentracijo kislih in alkalnih fosfatov (ACP = Acid Phosphatase, ALP = Alkaline Phosphatase) v reproduktivnih tkivih ter morfološke spremembe na jajčnikih in maternici (87). Kljub zaviranju trombocitov in možnih krvavitvah ter možnostmi za žilne motnje lahko nizki odmerki tudi pozitivno vplivajo na samo reprodukcijo in razvoj, saj zmanjšujejo nastanek tromboze ter zmanjšajo tveganje za spontani splav, vendar je za potrditev teh tez premalo dokazov (88).

Acetilsalicilna kislina ne povzroča težav, ki bi se precej razlikovale od ostalih izbranih analgetikov. Tudi pri tej učinkovini lahko najpogosteje pride do fizičnih malformacij zarodka, sprememb v kvaliteti semenske tekočine, opaznih nepravilnosti na reproduktivnih organih. Problematično je jemanje aspirina v določenih obdobjih nosečnosti, a zmeren odmerek v izjemnih primerih ne naredi nepopravljive škode. Zavedati se moramo posledic in po posvetu s strokovnjaki pretehtati koristi in škodo, ki jo lahko storimo.

Vse učinkovine so torej v določenem odmerku škodljive za reprodukcijo in lahko povzročijo določene težave. Zavedati se moramo posledic in po posvetu s strokovnjaki pretehtati koristi in škodo, ki jo lahko storimo, če vzamemo določen odmerek analgetika. Naši izbrani neopioidni analgetiki veljajo za precej varne zdravilne učinkovine. Obstajajo določene študije in raziskave, ki kažejo na potencialno nevarnost v času reprodukcije in samega razvoja. Nekateri trditve smo z našimi podatki, ki smo jih pridobili z *in silico* metodami ovrgli, druge delno potrdili. Problematično je lahko hkratno jemanje kombinacij analgetikov, saj za slednje niso izvedli študij toksičnosti, zato lahko privedejo do situacij,

ki so nepredvidljive ter zdravju škodljive. Zavedati se moramo, da je večina literaturnih podatkov rezultat *in vitro* in *in vivo* študij na živalih ter da teh rezultatov ne moremo direktno prenesti na delovanje pri ljudeh. Zaradi etičnih vidikov so te študije edine možne in jih moramo jemati resno, saj lahko predstavljajo dobro osnovo za študije na ljudeh v prihodnje.

4.3 Ocena varnosti izbranih analgetikov

Po analizi vseh zbranih podatkov lahko zaključimo, da do negativnih učinkov izbranih neopioidnih analgetikov prihaja, v nekaterih primerih, že pri terapevtskih koncentracijah. V preglednici IX so zbrani odmerki/koncentracije, pri katerih so v študijah opazili toksične učinke.

Preglednica IX: Povzetek terapevtskih plazemskih koncentracij pri ljudeh ter toksičnih učinkov in odmerkov/koncentracij pri katerih so v študijah opazili le-te

SPOJINA	TERAPEVTSKA PLAZEMSKA KONC.	ODMEREK/KONC. PRI KATERI SO OPAZILI TOKSIČNE UČINKE	TOKSIČNI UČINEK
<i>paracetamol</i>	povp. 2,1 µg/ml	- 150 mg/kg/dan - ustreza prb. trikratnemu dnevnu odmerku pri ljudeh (podgane)	- kriporhizem, hipospadija, problemi s prostato
		- 50 mg/kg/dan (miši)	- ↓ plodnost, ↓št. foliklov samic
		- 1 g (in vitro)	- ↓ sinteza PG in testosterona
		- 400 mg/kg (miši)	- ↓ sinteza DNA v testisih
		- 1430 mg/kg (miši)	- ↓ plodnost, ↓teža mladičev
		- 1500 mg/kg (podgane)	- nekroza jeter, ledvic
		- 350 mg/kg (miši)	- ↓ sinteza testosterona
		- 60 mg/kg - ustreza odmerku pri ljudeh, povp. plazemska konc 0,74-0,94 µg/ml (miši)	- ↓ konc. testosterona
<i>indometacin</i>	0,8-2,5 µg/ml	- 1-2,5 mg/dan (podgane)	- ↓ konc. testosterona
		- 100 mg (in vitro)	- ↓ sinteza PG in testosterona
		- 4 mg/kg/dan (podgane)	- ↓ osifikacija plodu

<i>ibuprofen</i>	39,4-63,7 µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> - 600 mg, povp. plazemska konc. 25-35 µg/ml (moški) - 600 mg (in vitro) - 100 µM = 20,6 µg/ml (glodavci) - 0,56, 1,12 ali 1,68 mg/100 g na dan (miši) - 25,5, 255 in 600 mg/kg (podgane) - 100 mg/kg (miši) 	<ul style="list-style-type: none"> - antiandrogeno delovanje - ↓ sinteza PG in testosterona - ↓ zarodnih celic, foliklov - spremembe v ovulaciji, ↓ sposobnost <i>in vitro</i> oploditve - zastoj v rasti, spremembe zarodka - ↑ št. splavov, spremembe zarodka, histološke spremembe jajčnikov, maternice matere
<i>naproksen</i>	62-96 µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> - 1 mg/kg ter 50 mg/kg (kunci) - 10 mg/kg/dan (miši) 	<ul style="list-style-type: none"> - spremembe v ovulaciji, sintezi PG - ↓ št. in gibljivost spermijev
<i>acetilsalicilna kislina</i>	4,9-8,9 µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> - 5 mg/100 g telesne mase (podgane) - 100 mg/kg (kunci) - 125 mg/kg, 250 mg/kg in 500 mg/kg (podgane) - 50 mg/kg/dan – podobno terapevtskemu pri ljudeh (podgane) - 37,5 mg/kg/dan (podgane) - 12,5 mg/kg/dan (podgane) - odmerek 100 mg/kg (podgane) 	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ konc. testosterona - spremembe v ovulaciji, sintezi PG - spremembe v skeletu zarodka - dilatacija sečevoda pri zarodku - spremembe možganov - spremembe testisov, sperme - ↑ konc. fosfataz, spremembe jajčnikov, maternice

Rezultati delovanja na ER se po podatkih programov Endocrine disruptome in Vega QSAR razlikujejo, saj rezultati niso usklajeni. Pri tem se lahko opremo na dejstvo o nahajanju podatkov Vega QSAR izven območja uporabnosti modela in zaključimo, da se izbrane zdravilne učinkovine malo verjetno vežejo na ER. Večji problem je vezava na AR, ki je podprta tudi z literaturnimi podatki študij.

Pri ljudeh naj bi ibuprofen in ASA vplivala na pojav hipospadije, paracetamol in že prej omenjeni učinkovini pa na pojav kriptorhizma, kar je posledica manjše izpostavljenosti androgenom. Naproksen in ibuprofen lahko igrata pomembno vlogo pri povečanju števila spontanih splavov, ibuprofen pa lahko izzove hipogonadizem. Splošno NSAID vplivajo na spremenjeno hormonsko ravnovesje. Pri živalih je bilo opaženo pomanjkanje androgenov po jemanju ASA, indometacina in paracetamola, ki je povzročil tudi zmanjšano plodnost samic. Prav te učinkovine v *in vitro* študijah izkazujejo vpliv na sintezo testosterona, ibuprofen naj bi deloval antiestrogeno, naproksen pa antiandrogeno. O vezavi na ostale receptorje ni konkretnih literaturnih podatkov, razen za PPAR γ , na katerega se lahko veže indometacin in vpliva na razvoj testisov zarodka.

Na podlagi rezultatov, pridobljenih z računalniškimi programi, paracetamol ne predstavlja velike nevarnosti za razvoj in reprodukcijo. Kljub vsemu so pri moških živalskih predstavnikih v študijah opazili spremembe testisov, kakovosti sperme, zmanjšano plodnost in nivo testosterona. Višji odmerki lahko negativno vplivajo na plod.

Indometacin so programi označili kot nenevarnega za reprodukcijo in razvoj, podatki študij pa namigujejo na vpliv na žensko reprodukcijo prihodnih generacij pri živalih.

Negativen vpliv na razvoj zarodka in reprodukcijo ima ibuprofen, ki so ga tudi *in silico* metode uvrstile med manj varne. Vpliva lahko na reproduktivno zmožnost in organe pri ženskah, sposobnost reprodukcije pri moških, zarodek lahko počasneje raste ali pride do sprememb v razvoju.

Naproksen je najbolj problematičen izmed vseh izbranih neopioidnih analgetikov. Tudi rezultati analize z računalniškimi programi to potrjujejo. Študije kažejo na povezavo med jemanjem naproksena in vplivom na ovulacijo, spermatogenezo, pri zarodku pa povzroča motnje kardiovaskularnega sistema in fizične nepravilnosti.

Acetilsalicilna kislina spada med varnejša zdravila in to smo ugotovili tudi sami. Tudi pri tej učinkovini pa prihaja do neželenih učinkov, ki so podobni kot pri prej omenjenih analgetikih – fizične nepravilnosti, problemi z reproduktivnimi organi, manj kvalitetna semenska tekočina, hkrati pa lahko vpliva na trombocite in povzroči krvavitve med in po porodu.

5 Sklep

Nevarnost endokrinega delovanja in reproduktivne ter razvojne toksičnosti za izbrane neopioidne analgetike obstaja, kar lahko povzamemo in zaključimo na podlagi napovedi s pomočjo računalniških programov. Program Endocrine disruptome je napovedal verjetnost vezave analgetikov na nekatere jedrne receptorje, pri čemer so v razpravi v ospredju estrogenski in androgeni receptorji. V povezavi z njimi je možna tudi reproduktivna in razvojna toksičnost analgetikov, saj na to kažejo rezultati, pridobljeni s programi Vega QSAR, Derek Nexus in TEST. Rezultati, pridobljeni z *in silico* metodami, v nekaterih primerih kažejo na podobne izsledke rezultatom *in vitro*, *in vivo* in nekaterih epidemioloških študij.

- Izbrani neopioidni analgetiki se v večini primerov le malo verjetno vežejo na jedrne receptorje. Za estrogenski receptor sicer obstaja največ podatkov iz *in vitro/in vivo* študij, a večjih vplivov v smislu vezave in/ali aktivacije ni bilo opaziti, problematična pa je vezava na androgenske receptorje. Vezava ibuprofena, ASA in paracetamola lahko namreč privede do pojava hipospadije in kriptohizma. Splošno lahko NSAID porušijo hormonsko ravnovesje, naproksen in ibuprofen pa povečata možnost za spontani splav. Podatki o preostalih receptorjih so pomanjkljivi.
- Rezultati kažejo in potrjujejo, da je paracetamol manj nevaren, prav tako acetilsalicilna kislina. Kljub vsemu lahko povzročita negativne spremembe pri moških predstavnikih - vplivata na testise, kakovost sperme, plodnost. Škodljiva sta lahko tudi za zarodek.
- Ibuprofen in indometacin sta označena kot bolj nevarna, saj lahko vplivata na reproduktivno zmožnost in organe pri ženskah, ibuprofen pa tudi na sposobnost reprodukcije pri moških ter razvoj in rast zarodka.
- Naproksen je izmed vseh najbolj problematičen, saj ga rezultati povezujejo s spremembami ovulacije, spermatogeneze in vplivom na zarodek.

Uživanje kakršnih koli zdravilnih učinkovin je lahko v določenih življenjskih obdobjih težavno in predstavlja tveganje. Večji problem predstavljajo zdravila, dostopna brez recepta, saj je jemanje le-teh nenadzorovano. Analgetiki spadajo med tiste zdravilne učinkovine, po katerih ljudje največkrat posegajo. Zaključimo lahko, da neopioidni analgetiki v splošnem in v predpisanih odmerkih ne predstavljajo velike nevarnosti za

endokrini sistem, reproduktivne organe in razvoj zarodkov. Jemanje skozi daljše časovno obdobje, uživanje večjih odmerkov, kot so priporočeni in zloraba pa lahko privedejo do težav, ki se lahko pokažejo čez čas in tudi ne nujno pri posamezniku, ki je zdravilo vzelo, ampak šele pri njegovih potomcih. Pametno moramo pretehtati razmerje tveganj in koristi. Literaturni podatki in posamezni rezultati, ki smo jih pridobili z *in silico* metodami, kažejo na potencialne nevarnosti. V prihodnosti obstaja še velika možnost za nadaljnje raziskave, predvsem v smislu vpliva na ljudi ter povezovanja rezultatov pridobljenih v *in vitro* in *in vivo* študijah ter rezultatov epidemioloških študij na ljudeh.

6 Literatura

- 1 Pavšar H, Pustoslemšek P, Hohler A: O pravilni in varni uporabi zdravil - Zdravila in bolečina, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2016: 2-17.
- 2 Kerec Kos M: Zdravila za zdravljenje bolečine. Farmaceutski vestnik 2012; 63(1): 6-9.
- 3 Kumar M, Shete A, Akbar Z: A Review on Analgesic: From Natural Sources. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives 2010; 1(2): 95-100.
- 4 Toni J: Patofiziološki vidiki bolečine. Farmaceutski vestnik 2012; 63(1): 3-5.
- 5 Ribarič S: Temelji patofiziološke fiziologije, 3. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2014: 251-257.
- 6 Locatelli I, Tršinar M, Stepanovič A: NSAR in paracetamol: izzivi in pasti?. Farmaceutski vestnik 2009; 60(2): 98-104.
- 7 Dolinar T, Mrhar A: Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo?. Farmaceutski vestnik 2005; 56(4): 229-240.
- 8 Sharma CV, Long JH, Shah S, et al.: First evidence of the conversion of paracetamol to AM404 in human cerebrospinal fluid. Journal of Pain Research 2017; 10: 2703-2709.
- 9 [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/CC18250038223E4AC12579C2003F557B/\\$File/s-017584.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/CC18250038223E4AC12579C2003F557B/$File/s-017584.pdf) (dostop: januar 2018).
- 10 Craig CR, Stitzel RE: Modern pharmacology with clinical applications, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004: 310-329.
- 11 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1983> (dostop: januar 2018).
- 12 Matanović MS: Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika. Medicus 2014; 23(1): 31-46.
- 13 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3715> (dostop: januar 2018).
- 14 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672> (dostop: januar 2018).
- 15 Janssen GM, Venema JF: Ibuprofen: plasma concentrations in man. Journal of International Medical Research 1985; 13(1): 68-73.
- 16 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156391> (dostop: januar 2018).
- 17 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2244> (dostop: januar 2018).

- 18 Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: *Interna medicina*, 4. izdaja, Littera Picta, Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 851-856.
- 19 Costanzo LS: *Physiology - Fourth Edition*, Saunders, Philadelphia, 2009: 379-443.
- 20 <https://www.endocrineweb.com/endocrinology/about-endocrine-system> (dostop: januar 2018).
- 21 Kramer IM: *Signal Transduction 3rd Edition*, Academic Press, Cambridge, 2015: 477-527.
- 22 <http://endocrinedisruptome.ki.si/> (dostop: februar 2018).
- 23 <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/endocrine-toxicity> (dostop: februar 2018).
- 24 Rahman Kabir E, Sharfin Rahman M, Rahman I: A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2015; 40: 241-258.
- 25 Hampl R, Kubátová J, Stárka L: Steroids and endocrine disruptors - History, recent state of art and open questions. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2016; 155: 217-223.
- 26 Sifakisa S, Vasilis P, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA: Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2017; 51: 56-70.
- 27 http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/03e_part3.pdf (dostop: februar 2018).
- 28 Cassano A, Manganaro A, Martin T, et al.: CAESAR models for developmental toxicity. *Chemistry Central Journal*. 2010; 4(Suppl 1): S4. doi:10.1186/1752-153X-4-S1-S4.
- 29 http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf (dostop: marec 2018).
- 30 Močnik Rožnik S: Analgezija v nosečnosti, med porodom in v času dojenja. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63(1): 15-20.
- 31 Roncaglioni A, Toropov AA, Toropova AP, Benfenati E: In silico methods to predict drug toxicity. *Current Opinion in Pharmacology* 2013; 13(5): 802-806.

- 32 Valerio Jr. LG: In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; 241(3): 356-370.
- 33 Raunio H: In Silico Toxicology – Non-Testing Methods. *Frontiers in Pharmacology* 2011; 2: Article 33.
- 34 http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_qsars_sl.pdf (dostop: marec 2018).
- 35 Long A: Drug metabolism in silico – the knowledge-based expert system approach. Historical perspectives and current strategies. *Drug discovery today. Technologies* 2013; 10: 147-153.
- 36 <https://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EndocrineDisruptorKnowledgebase/default.htm> (dostop: marec 2018).
- 37 <http://ctdbase.org/> (dostop: marec 2018).
- 38 <http://edcs.unicartagena.edu.co/> (dostop: marec 2018).
- 39 https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/databases/eas_database (dostop: marec 2018).
- 40 <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecaster-toxcasttm-data> (dostop: marec 2018).
- 41 <https://www.cdc.gov/niosh/rtecs/> (dostop: marec 2018).
- 42 http://www.leadscope.com/toxicity_databases/regulatory_databases/ (dostop: marec 2018).
- 43 <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/dart.htm> (dostop: marec 2018).
- 44 <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm> (dostop: marec 2018).
- 45 Rubin BS: Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 127(1-2): 27-34.
- 46 <http://www.preberite.si/bisfenol-a/> (dostop: februar 2018).
- 47 <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927623> (dostop: marec 2018).
- 48 <https://www.federalregister.gov/documents/2009/03/25/E9-6262/thymol-exemption-from-the-requirement-of-a-tolerance#h-21> (dostop: marec 2018).
- 49 <https://www.vegahub.eu/download/vega-interpretation/> (dostop: marec 2018).

- 50 VegaQSAR User's guide, navodila dostopna znotraj programa, ki je prosto dostopen na strani <https://www.vegahub.eu/portfolio-item/vega-qsar/> (dostop marec 2018)
- 51 <https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm> (dostop: marec 2018).
- 52 <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (dostop: marec 2018).
- 53 Gates MA, Araujo AB, Hall SA, Wittert GA, McKinlay JB: Non steroidal anti-inflammatory drug use and levels of oestrogens and androgens in men. *Clinical Endocrinology* 2012; 76(2): 272-280.
- 54 Kristensen DM1, Hass U, Lesné L, Lottrup G, Jacobsen PR, et al.: Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Human Reproduction* 2011; 26(1): 235-244.
- 55 Van den Driesche S, Macdonald J, Anderson RA, et al.: Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. *Science translational medicine* 2015; 7(288): 288ra80.
- 56 Kristensen DM, Mazaud-Guittot S, Gaudriault P, Lesné L, Serrano T, Main KM, Jégou B: Analgesic use - prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nature Reviews Endocrinology* 2016; 12(7): 381-393.
- 57 Høyer BB, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, Larsen SB, Toft G: Use of non-prescription analgesics and male reproductive function. *Reproductive Toxicology* 2017; 74: 70-76.
- 58 <https://www.hormone.org/hormones-and-health/hormones/luteinizing-hormone> (dostop: april 2018).
- 59 Chong YH, Dennis NA, Connolly MJ, Teh R, Jones GT, van Rij AM, Farrand S, Campbell AJ, McLennan IS: Elderly men have low levels of anti-Müllerian hormone and inhibin B, but with high interpersonal variation: a cross-sectional study of the sertoli cell hormones in 615 community-dwelling men. *PLoS One* 2013; 8(8): e70967
- 60 Kristensen DM, Desdoits-Lethimonier C, Mackey AL, et al.: Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018; 115(4): E715-E724

- 61 Albert O, Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Legrand A, Guillé F, Bensalah K, Dejuq-Rainsford N, Jégou B: Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Human Reproduction* 2013; 28(7): 1890-1898.
- 62 Ezechiáš M, Janochová J, Filipová A, Křesinová Z, Cajthaml T. Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as in vitro antagonists for human estrogen and androgen receptors. *Chemosphere* 2016; 152: 284-291.
- 63 Mazaud-Guittot S, Nicolas Nicolaz C, Desdoits-Lethimonier C, Coiffec I, Ben Maamar M, Balaguer P, Kristensen DM, Chevrier C, Lavoué V, Poulain P, Dejuq-Rainsford N, Jégou B: Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013; 98(11): E1757–E1767.
- 64 Liu L-L, Xian H, Cao J-C, et al.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in human sperm physiology. *Asian Journal of Andrology* 2015; 17(6): 942-947.
- 65 Wiger R, Hongslo JK, Evenson DP, De Angelis P, Schwarze PE, Holme JA: Effects of acetaminophen and hydroxyurea on spermatogenesis and sperm chromatin structure in laboratory mice. *Reproductive Toxicology* 1995; 9(1): 21-33.
- 66 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015516.pdf (dostop: april 2018).
- 67 Neto JA, Oliveira-Filho RM, Simões MJ, Soares JM Jr, Kulay L Jr: Long-term acetaminophen (paracetamol) treatment causes liver and kidney ultra-structural changes during rat pregnancy. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology* 2004; 31(3): 221-224.
- 68 Dean A, Van Den Driesche S, Wang Y, Mckinnell C, Macpherson S, Eddie SL, et al.: Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. *Scientific Reports* 2016; 6: 19789.
- 69 <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3101> (dostop: marec 2018).
- 70 <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=6422d983-a063-41ae-aa96-7ae2284cb123> (dostop: marec 2018).

- 71 Leverrier-Penna S, Mitchell RT, Becker E, Lecante L, Ben Maamar M, Homer N, Lavoué V, Kristensen DM, Dejuq-Rainsford N, Jégou B, Mazaud-Guittot S: Ibuprofen is deleterious for the development of first trimester human fetal ovary ex vivo. *Human Reproduction* 2018; 33(3): 482–493.
- 72 Uhler ML, Hsu JW, Fisher SG, Zinaman MJ: The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on ovulation: a prospective, randomized clinical trial. *Fertility and Sterility* 2001; 76(5): 957-961.
- 73 Martini AC, Vincenti LM, Santillán ME, Stutz G, Kaplan R, Ruiz RD, de Cuneo MF: Chronic administration of nonsteroidal-antiinflammatory drugs (NSAIDS): effects upon mouse reproductive functions. *Revista De La Facultad De Ciencias Medicas* 2008; 65(2): 47-59.
- 74 Burdan F: Developmental toxicity evaluation of ibuprofen and tolmetin administered in triple daily doses to Wistar CRL:(WI)WUBR rats. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 2004; 71(5): 321-330.
- 75 Sahu CR: Developmental toxicity of ibuprofen treated mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2009; 1(1): 92-102.
- 76 Siu SS, Yeung JH, Lau TK: An in-vivo study on placental transfer of naproxen in early human pregnancy. *Human reproduction* 2002; 17(4): 1056-1059.
- 77 Ericson A, Källén BA: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in early pregnancy. *Reproductive Toxicology* 2001; 15(4): 371-375.
- 78 Zanagnolo V, Dharmarajan AM, Endo K, Wallach EE: Effects of acetylsalicylic acid (aspirin) and naproxen sodium (naproxen) on ovulation, prostaglandin, and progesterone production in the rabbit. *Fertility and sterility* 1996 May; 65(5): 1036-1043.
- 79 Uzun B, Atli O, Perk B1, Burukoglu D, Ilgin S: Evaluation of the reproductive toxicity of naproxen sodium and meloxicam in male rats. *Human & Experimental Toxicology* 2015; 34(4): 415-429.
- 80 Dodo T, Fukuta T, Uchida K, Mineshima H, Okuda Y, Okada F, Katsutani N, Hirano K, Aoki T: A comparative investigation of fetal skeletal anomalies in rats induced by acetylsalicylic acid with single- and double-staining techniques. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2009; 54(3): 308-313.

- 81 Tiboni GM, Iammarrone E, Piccirillo G, Liberati M, Bellati U: Aspirin pretreatment potentiates hyperthermia-induced teratogenesis in the mouse. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1998; 178(2): 270-279.
- 82 Damasceno DC, Volpato GT, Person OC, Yoshida A, Rudge MV, Calderon Ide M: Effect of acetylsalicylic acid on the reproductive performance and on offspring from wistar rats. *Revista Da Associacao Medica Brasileira* 2002; 48(4): 312-316.
- 83 Yokoyama A, Takakubo F, Eto K, Ueno K, Igarashi T, Satoh T, Kitagawa H: Teratogenicity of aspirin and its metabolite, salicylic acid, in cultured rat embryos. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1984; 46(1): 77-91.
- 84 Elkarmi A, Abu-Samak M, Al-Qaisi K: Modeling the effects of prenatal exposure to aspirin on the postnatal development of rat brain. *Growth, Development and Aging* 2007; 70(1): 13-24.
- 85 Vyas A, Ram H, Purohit A, Jatwa R: Adverse Effects of Subchronic Dose of Aspirin on Reproductive Profile of Male Rats. *Journal of Pharmaceutics* 2016; article 6585430: 1-9.
- 86 Ibtisham F, Chen J, Niu Y, Wang Z, Wu J, Xiao M, An L: Effect of Aspirin on Reproductive Profile of Male Rat an-overview. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences* 2016; 5(4): 5-12.
- 87 Jain N, Shrivastava R, Raghuwanshi AK, Shrivastava VK: The effect of aspirin on reproductive organs of female albino rat. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2012; 3(8): 2644-2647.
- 88 James AH, Brancazio LR, Price T: Aspirin and reproductive outcomes. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2008; 63(1): 49-57.