

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAJA ZORE

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAJA ZORE

**UGOTAVLJANJE DELOVANJA IZBRANIH ANKSIOLITIKOV NA
ESTROGENSKE RECEPTORJE V CELICAH hER α -HeLa-9903**

DETERMINATION OF THE ACTION OF SELECTED ANXIOLYTICS ON
ESTROGEN RECEPTORS USING THE CELLS hER α -HeLa-9903

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm..

ZAHVALA

Za pomoč in usmerjanje pri pisanju magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc. Iskreno se zahvaljujem tudi mladi raziskovalki Maši Kenda za vso njeno pomoč in posredovano znanje pri izvajanju eksperimentalnega dela naloge.

Še posebej pa bi se rada zahvalila celotni moji družini, ki me je tekom študija vselej spodbujala in podpirala.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm..

Taja Zore

MAGISTRSKA KOMISIJA

Predsednik: prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Mentorica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Član: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	III
KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO ENAČB.....	VII
POVZETEK.....	VIII
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV.....	XII
1 UVOD	1
1.1 Hormonski motilci.....	1
1.2 Endokrini sistem.....	3
1.2.1 Jajčnika in estrogeni	5
1.2.1.1 Estrogen pri moških.....	6
1.2.1.2 Mehanizem delovanja.....	7
1.3 Klonazepam.....	8
1.3.1 Farmakokinetika	9
1.3.2 Farmakodinamika	9
1.3.3 Neželeni učinki in toksičnost.....	9
1.4 Lorazepam.....	10
1.4.1 Farmakokinetika	10
1.4.2 Farmakodinamika	11
1.4.3 Neželeni učinki in toksičnost.....	11
1.5 Mianserinijev klorid	12
1.5.1 Farmakokinetika	12
1.5.2 Farmakodinamika	13
1.5.3 Neželeni učinki in toksičnost.....	13
1.6 Sertralin	14
1.6.1 Farmakokinetika	14
1.6.2 Farmakodinamika	14
1.6.3 Neželeni učinki in toksičnost.....	15
2 NAČRT DELA.....	16

3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	<i>Testirane spojine</i>	18
3.1.1	Priprava vzorcev testiranih spojin	19
3.2	<i>Endocrine Disruptome</i>	20
3.3	<i>Celična linija hERα-HeLa-9903</i>	21
3.3.1	Osnove dela s celicami	21
3.3.1.1	<i>Priprava gojitvenega medija</i>	22
3.3.1.2	<i>Odmrzovanje celic</i>	22
3.3.1.3	<i>Gojenje celic</i>	23
3.3.1.4	<i>Štetje celic</i>	23
3.3.1.5	<i>Presajanje celic</i>	25
3.3.1.6	<i>Nasajanje celic</i>	26
3.3.1.7	<i>Dodajanje spojin na mikrotitrsko ploščico</i>	27
3.3.2	Določanje citotoksičnosti z resazurinom	28
3.3.3	Luciferazni test	29
3.3.4	Statistična analiza podatkov	31
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	<i>Napoved vezave s programom Endocrine Disruptome</i>	32
4.2	<i>Izbrane spojine kot potencialni hormonski motilci</i>	33
4.3	<i>Okoljske in plazemske koncentracije preiskovanih spojin</i>	35
4.4	<i>Testiranje citotoksičnosti</i>	36
4.5	<i>Določanje učinka preiskovanih spojin na estrogenski receptor α</i>	39
4.5.1	Klonazepam	41
4.5.2	Lorazepam	44
4.5.3	Mianserinijev klorid	46
4.5.4	Sertralinijev klorid	49
4.5.5	Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja	52
5	SKLEP	56
6	LITERATURA	58
7	PRILOGE	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura resazurina in roza fluorescenčnega resorufina, ki nastane zaradi redukcije resazurina v živih, metabolno aktivnih celicah.....	28
Slika 2: Reakcija, ki jo ob prisotnost Mg^{2+} , kisika in ATP katalizira nastala luciferaza po dodatku reagenta ONE-Glo™.	29
Slika 3: Rezultati testa citotoksičnosti najnižje izmerjene citotoksične koncentracije in prve necitotoksične koncentracije preiskovanih spojin.	38
Slika 4: Rezultati informativnega luciferaznega testa za CZP, določanje antagonističnega delovanja.....	41
Slika 5: Krivulja koncentracijske odvisnosti za CZP, antagonističen test.....	42
Slika 6: Rezultati informativnega luciferaznega testa za CZP, določanje agonističnega delovanja.....	43
Slika 7: Rezultati informativnega luciferaznega testa za LZP, določanje agonističnega delovanja.....	45
Slika 8: Rezultati informativnega luciferaznega testa za LZP, določanje antagonističnega delovanja.....	46
Slika 9: Rezultati informativnega luciferaznega testa za MIA, določanje agonističnega delovanja.....	47
Slika 10: Rezultati informativnega luciferaznega testa za MIA, določanje antagonističnega delovanja.....	49
Slika 11: Rezultati informativnega luciferaznega testa za SER, določanje agonističnega delovanja.....	50
Slika 12: Rezultati informativnega luciferaznega testa za SER, določanje antagonističnega delovanja.....	51
Slika 13: Rezultati luciferaznega testa, agonistično delovanje.....	53
Slika 14: Rezultati luciferaznega testa, antagonistično delovanje.	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Preiskovane spojine in kontroli.	18
Preglednica II: Koncentracije spojin, ki smo jih testirali.	20
Preglednica III: Ključni rezultati napovedi vezave, pridobljeni s programom Endocrine Disruptome.	32
Preglednica IV: Primer celotnih rezultatov napovedi vezave na človeške jedrne receptorje za vsako izmed preiskovanih spojin, pridobljenih s programom Endocrine Disruptome...32	
Preglednica V: Maksimalna izmerjena plazemska/serumska/krvna koncentracija preiskovanih spojin pri izbranem odmerku spojine.....	36

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun koncentracije celic v celični suspenziji	24
Enačba 2: Izračun potrebnega volumna celične suspenzije pri presajanju	26
Enačba 3: Izračun potrebnega volumna za pripravo celične suspenzije za nasaditev celic	27

POVZETEK

V današnjem času se pojavlja vse več dokazov, da številne spojine, ki so nekoč veljale za varne, motijo delovanje endokrinega sistema in delujejo kot hormonski motilci. Med temi spojinami so tudi zdravilne učinkovine, ki se vsakodnevno uporabljajo za zdravljenje v humani medicini ali veterini. Te zdravilne učinkovine in njihovi metaboliti pa ne predstavljajo samo problem za bolnike in živali, ki ta zdravila prejemajo, ampak tudi za vsa ostala živa bitja. Zaradi povečane uporabe farmacevtskih učinkovin se namreč povečuje tudi njihova prisotnost v okolju, kjer smo jim pa lahko izpostavljeni vsi. Zato smo se tudi odločili, da bomo preverjali možen vpliv izbranih zdravilnih učinkovin na endokrino delovanje. Na podlagi napovedi, ki smo jo pridobili s pomočjo računalniškega programa Endocrine Disruptome, smo se odločili za vrednotenje učinka štirih anksiolitikov – klonazepama, lorazepama, sertralina in mianserina – na estrogenski receptor. Program je namreč za te štiri izbrane anksiolitike napovedal veliko verjetnost vezave oz. agonističnega/antagonističnega delovanja na estrogenski receptor α (sertralinijev klorid) ali β (klonazepam, lorazepam in mianserinijev klorid). Klonazepam se uporablja za zdravljenje epilepsij, preostali trije pa se uporabljajo za zdravljenje raznih duševnih motenj, kot so depresija in anksioznost.

V raziskavi smo za ugotavljanje učinkov izbranih spojin na ER α uporabili celično linijo hER α -HeLa-9903, ki izraža funkcionalni estrogenski receptor α . V prvem delu testiranja smo za vse spojine izvedli test viabilnosti, s katerim smo določili njihovo največjo necitotoksično koncentracijo za to vrsto celic. Klonazepam in mianserinijev klorid sta se izkazala za necitotoksična že pri najvišji testirani koncentraciji (100 μ M), za lorazepam in sertralinijev klorid pa smo morali poiskati ustrezni nižji koncentraciji. Prva necitotoksična koncentracija za sertralinijev klorid je znašala 25 μ M, za lorazepam pa 10 μ M. V drugem delu testiranja spojin smo izvedli presejalni luciferazni test, s pomočjo katerega smo določali agonističen/antagonističen učinek preiskovanih spojin na ER α . Rezultati agonističnega testa so pokazali, da nobena izmed preiskovanih spojin ni agonist za ER α , saj pri nobeni nismo zaznali dovolj velikega povečanja luciferazne aktivnosti. Rezultati antagonističnega testiranja pa so pokazali, da je prišlo do statistično značilnega znižanja aktivnosti luciferaze samo pri višjih koncentracijah (50–100 μ M) klonazepama. Znižanje pri teh koncentracijah je bilo večje, kot je meja za pozitiven rezultat v protokolu izvedbe testa. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je klonazepam pri visokih koncentracijah

antagonist za ER α , a bi morali prej preveriti še možnost njegovega delovanja direktno na encim luciferazo.

Rezultati našega eksperimentalnega dela niso potrdili, da bi preiskovane spojine delovale kot modulatorji estrogenskega receptorja α . Edini, za katerega se je pokazala možnost, da modulira estrogenski receptor α , je klonazepam.

KLJUČNE BESEDE: hormonski motilci, estrogenski receptorji, klonazepam, lorazepam, mianserinijev klorid, sertralinijev klorid, celična linija hER α -HeLa-9903

ABSTRACT

Nowadays, there is growing evidence that many compounds that were once considered safe, interfere with the endocrine system and act as endocrine disruptors. Among these compounds are also active substances of drugs that are used on a daily basis for the treatment in human or veterinary medicine. These active substances and their metabolites do not only present a problem for the patients and animals, receiving them, but also for all other living creatures. Due to the increased use of pharmaceuticals, their presence in the environment, where everyone can be exposed to them, is also increasing. Therefore, we decided to check the possible effect of the selected active substances on the endocrine activity. Based on the prediction obtained with the computer program Endocrine Disruptome we decided to evaluate the effect of four anxiolytics – clonazepam, lorazepam, sertraline and mianserin – on the estrogen receptor. The program predicted a high probability of binding or agonistic/antagonistic activity on the estrogen receptor α (sertraline hydrochloride) or estrogen receptor β (clonazepam, lorazepam and mianserine hydrochloride). Clonazepam is used for the treatment of epilepsy, while the other three are used for the treatment of various mental disorders, such as depression and anxiety.

In the research, the cell line hER α -HeLa-9903 expressing the functional estrogen receptor α was used to determine the effects of the selected compounds on the ER α . First, a cell viability test was performed for all compounds to determine their maximum non-cytotoxic concentration. Clonazepam and mianserin proved to be non-cytotoxic at the highest tested concentration (100 μ M), but for lorazepam and sertraline a corresponding lower concentration had to be found. The first non-cytotoxic concentration of sertraline was 25 μ M and of lorazepam was 10 μ M. In the second part of the compound testing, a screening luciferase test was performed to determine the agonistic/antagonistic effect of the investigated compounds on ER α . The results of the agonist test showed that none of the investigated compounds was an agonist for ER α , since no significant increase in their luciferase activity was observed. The results of antagonistic testing showed a statistically significant decrease in luciferase activity only at higher concentrations (50-100 μ M) of clonazepam. The decrease at these concentrations was higher than the limit for a positive result in the test protocol. Based on that, we can conclude that clonazepam is at higher concentrations an antagonist for ER α , but we should first check the possibility of its action directly on the luciferase enzyme.

The results of our experiment did not confirm that the investigated compounds act as estrogen receptor α modulators. Only clonazepam showed a possible ability to modulate the estrogen receptor α .

KEYWORDS: endocrine disruptors, estrogen receptors, clonazepam, lorazepam, mianserine hydrochloride, sertraline hydrochloride, cell line hER α -HeLa-9903

SEZNAM OKRAJŠAV

AK	aminokislina
AUC	površina pod krivuljo
C _{max}	maksimalna plazemska koncentracija
CZP	klonazepam
CŽS	centralni živčni sistem
DMSO	dimetilsulfoksid
E2	17β-estradiol
EC	European Commission (Evropska komisija)
ECHA	European Chemicals Agency (Evropska agencija za kemikalije)
ED	Endocrine disruptome
EFSA	European Food Safety Authority (Evropska agencija za varstvo hrane)
EPA	US Environmental Protection Agency (Ameriška agencija za varstvo okolja)
ER	estrogenski receptor
ER α	estrogenski receptor α
ER β	estrogenski receptor β
ERE	na estrogene odzivni elementi
FBS	fetalni goveji serum
FDA	US Food and Drug Administration (Ameriški Urad za prehrano in zdravila)
FSH	folikle spodbujajoči hormon
GABA	γ -aminobutirna kislina
GnRH	sproščevalni hormon gonadotropinov (gonadoliberin)
hER α	človeški estrogenski receptor α
HM	hormonski motilci
LAF	laminarni pretok zraka
LBD	ligand-vezavna domena
LH	luteinizirajoči hormon
LZP	lorazepam
NHR	jedrni (nuklearni) hormonski receptor
MHRA	Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (Britanska agencija za nadzor medicinskih in zdravstvenih izdelkov)
MIA	mianserinijev klorid

NIEHS	National Institute of Environmental Health Sciences (Nacionalni inštitut za okoljske in zdravstvene vede)
OECD	The Organisation for Economic Co-operation and Development (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj)
PBS	fosfatni pufer
ROC	krivulja karakteristike delovanja sprejemnika
RTA	relativna transkripcijska aktivnost
SE	senzitivnost (občutljivost)
SER	sertralinijev klorid
SSRI	selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina
TEDX	The endocrine disruption exchange (Izmenjava endokrinih motenj)
aTG	antitiroglobulin
Tg	tiroglobulin
aTPO	antitiroidna peroksidaza
TSH	ščitnico spodbujajoči hormon

1 UVOD

1.1 *Hormonski motilci*

Kemikalije so pomemben del našega vsakdana, vendar pa prihajajo na dan dokazi, da številne med njimi (sintezno in naravno pridobljene) motijo delovanje endokrinega sistema in na ta način povzročajo škodljive učinke pri živalih in ljudeh (1,2). Za te spojine se pogosto uporablja izraz hormonski motilci (HM) (2). EPA je definirala hormonski motilec kot eksogeno snov, ki moti sintezo, sekrecijo, transport, metabolizem, vezavo ali eliminacijo endogenih hormonov v telesu, odgovornih za homeostazo, reprodukcijo in razvoj organizma. S fiziološkega vidika je torej HM naravna ali sintetična spojina, ki ob izpostavljenosti povzroči spremembe v hormonskem homeostaznem sistemu (3). Zaradi tega se v zadnjem času povečuje zanimanje za možno nevarnost, ki jo predstavljajo HM za naše zdravje (3). Kljub temu, da obstaja zelo malo znanstvenih informacij in dokazov o možnih škodljivih učinkih HM na človeško zdravje, pa zaskrbljenost zaradi njih po svetu narašča (1,2). Pokazalo se je namreč, da so v okolju prisotni endokrini motilci že v zelo majhnih količinah povzročili škodljive učinke v divjih in laboratorijskih živalih (2). Zaradi naraščajoče skrbi številne evropske in druge svetovne organizacije, kot so Evropska komisija (EC), Evropska agencija za varstvo hrane (EFSA), Evropska agencija za kemikalije (ECHA), Nacionalni inštitut za okoljske in zdravstvene vede (NIEHS), Ameriška agencija za varstvo okolja (EPA) ter Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), vedno znova predstavljajo nove smernice za ugotavljanje in zbiranje informacij o HM ter zmanjševanje njihove uporabe (1,2,4,5).

Ljudje prihajamo v stik s hormonskimi motilci vsak dan, saj se le-ti nahajajo v številnih izdelkih za vsakodnevno uporabo. Najdemo jih lahko v hrani, pijači, oblačilih, kozmetiki, zdravilih, igračah, embalaži, čistilnih sredstvih, pesticidih, elektronskih napravah, gasilnih sredstvih, gradbenih materialih itd. Ker se izločajo v okolje, se lahko nahajajo tudi v zraku in vodi, ki nas obdaja. Izpostavljeni smo jim torej povsod (npr. doma, v službi, šoli, ko se gibljemo v naravi) (2,6). V naše telo lahko prehajajo preko prebavil (predvsem s hrano in pijačo), pljuč z vdihanim zrakom in pa preko kože (2). Nekateri HM ostanejo v okolju veliko let in se lahko v našem telesu nabirajo. Drugi pa se ne nabirajo, a jih lahko kljub temu vedno najdemo v našem telesu zaradi konstantne izpostavitve. Ker imajo majhne količine hormonov pomembno vlogo pri številnih telesnih funkcijah, lahko izpostavitve

tudi zelo majhnim količinam hormonskih motilcev privede do občutnih in včasih trajnih vplivov na naše zdravje (6).

Skupina molekul, spojin, ki jih uvrščamo med HM, je zelo heterogena. Med spojine s potencialnom, da delujejo kot hormonski motilci, sodijo:

- naravni hormoni živali in tudi ljudi, ki se sproščajo v okolje in lahko povzročijo spremembe tudi pri drugi živalski vrsti,
- naravne kemikalije, kot so na primer toksini, ki jih proizvajajo rastline in nekatere glivice,
- sintetično proizvedena zdravila, katerih namen je, da so hormonsko zelo aktivna (npr. učinkovine v kontracepcijskih tabletah), in se lahko pojavijo v odpadnih vodah,
- sintezno pridobljene kemikalije in stranski produkti, ki se sproščajo v okolje (npr. nekateri pesticidi, kemikalije v potrošniških in medicinskih izdelkih (plastifikatorji, aditivi), industrijske kemikalije (npr. dioksini, polihalogenirani bifenoli, fungicidi)),
- težke kovine (3,5,7).

Hormonski motilci se med seboj zelo razlikujejo in načeloma izkazujejo zelo malo strukturnih podobnosti. Zaradi tega je težko napovedati ali bo neka spojina vplivala na delovanje endokrinega sistema ali ne. Običajno gre za majhne spojine z molekulska maso do 1000 Daltonov. V svoji strukturi lahko vsebujejo halogenske funkcionalne skupine. Dostikrat imajo fenolni del, ki posnema strukturo endogenih steroidnih hormonov in jim omogoča, da delujejo na steroidne hormonske receptorje kot analogi ali antagonisti. Na splošno so lipidotopni, zato prihaja do njihovega kopičenja v maščobnem tkivu (3,5).

Iz študij na živalih so znanstveniki pridobili veliko informacij o mehanizmi delovanja hormonskih motilcev, s katerimi le-ti vplivajo na endokrini sistem in spreminjajo funkcije hormonov (2). HM lahko izražajo svoje učinke preko jedrnih steroidnih receptorjev (npr. estrogenski, androgeni, progesteronski, tiroidni receptorji), nejedrnih steroidnih receptorjev (membranski estrogenski receptorji), nesteroidnih receptorjev (npr. serotoninški, dopaminski receptorji) in receptorjev sirot ter preko encimskih poti sinteze in metabolizma endogenih hormonov (3). Možni mehanizmi delovanja HM so sledeči:

- Lahko se vežejo na celične receptorje in posnemajo biološko aktivnost endogenega hormona. V tem primeru pride do pojava normalnega celičnega odziva na endogeni hormon ob nepravem času ali pa do prekomernega odziva (agonistično delovanje).

- Lahko se vežejo na receptor, a pri tem ne sprožijo aktivacije receptorja, ampak s svojo vezavo samo preprečijo vezavo endogenega hormona. Ker se endogeni hormon ne more vezati, ne pride do pojava normalnega signala, zato se telo ne odzove pravilno (antagonistično delovanje).
- Lahko se vežejo na transportne proteine v krvi in s tem preprečijo vezavo endogenih hormonov, zaradi česar se spremeni njihova količina v krvnem obtoku.
- Lahko pa motijo metabolične procese v telesu in s tem vplivajo na sintezo ali razgradnjo endogenih hormonov ali na sintezo njihovih receptorjev (2,7).

Znanstveniki so mnogo hormonskih motilcev povezali s pojavom razvojnih, reproduktivnih, živčnih, imunskih in drugih težav pri divjih in laboratorijskih živalih. Nekatere raziskave nakazujejo, da na podoben način negativno vplivajo tudi na zdravje ljudi (2). Odgovorni naj bi bili za očitne spremembe v zdravju ljudi v zadnjih desetletjih (8). Posledice njihovega delovanja se kažejo v nenormalnostih v reproduktivnem sistemu, upadu števila spermijev v semenski tekočini, vedenjskih spremembah, napakah ob rojstvu, povečani incidenci nekaterih bolezni, kot so na primer debelost, diabetes, nekatere vrste raka (2,8,9). Pojavila so se tudi namigovanja, da so povezani s prizadetostjo v živčnem razvoju in spolnem vedenju (8).

Kakšne bodo posledice delovanja hormonski motilcev na zdravje ljudi, ni odvisno samo od lastnosti HM, ampak tudi od drugih dejavnikov. Najpomembnejša dejavnika sta posameznikova genetska dovzetnost in življenjsko obdobje, v katerem pride do izpostavitve HM (10). Dosedanje raziskave so pokazale, da največje tveganje predstavlja izpostavljenost HM v prenatalnem in zgodnjem postnatalnem razvoju, ko poteka razvoj organov in živčnega sistema (2). Do pojava posledic lahko pride takoj oziroma zelo kmalu po izpostavitvi HM ali pa se te izrazijo šele kasneje v življenju. Na to, kakšne bodo posledice, pomembno vpliva tudi trajanje izpostavljenosti HM. Lahko namreč pride do enkratne izpostavitve, dostikrat pa gre za ponavljajočo vsakodnevno izpostavljenost. Težavo pri ocenjevanju učinkov HM predstavlja tudi dejstvo, da smo ljudje po navadi izpostavljeni več hormonskim motilcem hkrati (2,3,5).

1.2 Endokrini sistem

Endokrini sistem, ki ga drugače imenujemo tudi hormonski sistem, je organski sistem, ki pomaga pri vzdrževanju in regulaciji številnih telesnih funkcij, npr. regulacija rasti in razvoja, krvnega pritiska, ravni ionov in drugih substanc v krvi, kontrola reproduktivne

funkcije, koordinacija telesnega odziva na stres ter regulacija energijskega ravnovesja. Sestavljajo ga žleze z notranjim izločanjem oziroma endokrine žleze, ki se nahajajo v različnih delih telesa in med seboj niso anatomsko povezane. Mednje sodijo hipotalamus, hipofiza, jajčniki, testisi, nadledvična žleza, trebušna slinavka, ščitnica, obščitnice in priželjc. Vsaka izmed endokrinih žlez ima določene tipe celic, ki proizvajajo in izločajo za endokrino žlezo specifične snovi, imenovane hormoni. Nastali hormoni se izločajo direktno v krvni obtok ali intersticijski prostor in povzročajo zanje značilne učinke na bližnje ali daljne tarčne organe (11–13). Ločimo tri mehanizme delovanja hormonov: endokrino, parakrino in avtokrino delovanje. Pri endokrinem delovanju hormoni vstopijo v krvni obtok in delujejo na oddaljene organe, pri parakrinem se po nastanku sprostijo v intersticijski prostor in delujejo na bližnje celice, pri avtokrinem pa delujejo na celice, ki so jih proizvedle (12). Glede na njihovo biosintetsko pot delimo hormone v tri razrede:

- peptidi in proteini,
- steroidi,
- derivati aminokislina tirozin (14).

Hormoni učinkujejo na celice tarčnih organov z vezavo na zanje specifične receptorje na tarčnih celicah (12). Hormonski receptorji so velike proteinske molekule, ki jih glede na mesto nahajanja delimo na: znotrajcelične receptorje (nahajajo se v celični citoplazmi ali jedru) in površinske receptorje (nahajajo se na površini celic) (12,14). Proteinski in peptidni hormoni so preveliki za prehod skozi celično membrano, zato se vežejo na membranske receptorje. Ob njihovi vezavi na receptor se tvori kompleks hormon-receptor, ki povzroči kaskado znotrajceličnih dogodkov, katerih posledica je specifičen biološki odziv. Steroidni in ščitnični hormoni so veliko manjši, zato lahko prehajajo preko membrane v celico, kjer se vežejo na znotrajcelične receptorje. Tvori se kompleks hormon-receptor, ki prehaja v jedro, kjer se veže na DNA in povzroči aktivacijo ali represijo izražanja gena, kar vodi v specifičen biološki odziv (12). Tarčna celica izraža 2000 – 100000 receptorjev z visoko afiniteto za specifičen hormon, ki jo stimulira, zato za transdukcijo signala zadostujejo zelo nizke koncentracije hormona (10^{-6} – 10^{-12} mol/L). Vsak receptor je načeloma visoko specifičen za en sam hormon. Tarčne celice lahko izražajo več različnih receptorjev za različne hormone, lahko pa izražajo tudi več različnih receptorjev za isti hormon. Celice, ki nimajo receptorjev za določen hormon, se nanj ne odzovejo (14,15).

Hormoni se v krvnem obtoku nahajajo v zelo majhnih koncentracijah in morajo običajno ostati znotraj ozkega koncentracijskega intervala. Njihov nastanek in izločanje regulirata živčni sistem preko hipotalamusa in hormonski sistem s svojimi povratnimi zvezami (pozitivna in negativna povratna zanka). Pri negativni povratni zanki povečana koncentracija določenega hormona v krvi vpliva na zmanjšano izločanje hormonov hipotalamusa/hipofize, kar vodi do inhibicije izločanja tega hormona iz endokrine žleze. Pri pozitivni povratni zanki pa povečana koncentracija hormona v krvi dodatno spodbudi izločanje hormonov hipotalamusa/hipofize, kar povzroči povečano sproščanje tega hormona (12,13,15).

1.2.1 Jajčnika in estrogeni

Jajčnika sta spolni žlezi in sta del ženskega reproduktivnega sistema. Ležita levo in desno od maternice, na lateralni medenični steni. Do pubertete sta majhna, neaktivna in ne proizvajata spolnih hormonov. Sodita tako med eksokrine (tvorita jajčeca) kot endokrine žleze (16). Izločata dve skupini spolnih hormonov, progesterone in estrogene, na katere se bomo osredotočili v nadaljevanju (14). Estrogeni so ženski spolni hormoni, ki jih glede na njihovo kemijsko strukturo uvrščamo med steroidne hormone. Primarno se sintetizirajo iz androgena androstenediona, lahko pa tudi iz testosterona. Reakcijo pretvorbe androgenov v estrogene katalizira encim aromataza (15). Estrogeni normalno nastajajo v znatnih količinah pri ženski, ki ni noseča, le v granuloznih in teka celicah jajčnikov. V zelo majhnih količinah jih sintetizirajo tudi celice skorje nadledvične žleze. Med nosečnostjo pa veliko količino estrogenov sintetizira tudi placenta (14). Jajčniki so torej primarno mesto sinteze estrogenov.

V plazmi žensk so v signifikantnih količinah prisotni trije estrogeni: 17β -estradiol (E2), estron in estriol. Iz jajčnikov se v glavnem izloča E2, ki je daleč najpomembnejši izmed estrogenov v krvnem obtoku, saj je njegov estrogenski učinek veliko večji od učinka preostalih dveh estrogenov (14). E2 je vključen v številne pomembne fiziološke funkcije. Sodeluje pri regulaciji rasti, razvoja in fiziologije reproduktivnih organov ter pri uravnavanju kardiovaskularnega, mišično-skeletnega, imunskega in centralnega živčnega sistema. Prispeva tudi k nastanku in razvoju malignih tumorjev (17). Estron se iz jajčnikov izloča v zelo majhnih količinah in večinoma nastaja v perifernih tkivih iz androgenov. Estriol pa je zelo šibek estrogen in je oksidativni produkt pretvorbe estradiola in estrona v

jetrih. Estrogeni se po krvi prenašajo vezani na albumine. Vezava med estrogeni in plazemskimi proteini je dovolj šibka, da omogoča njihovo hitro sprostitve v tkiva (14).

Na izločanje estrogenov iz jajčnikov vplivata dva hormona adenohipofize, folikle stimulirajoči hormon (FSH) in luteinizirajoči hormon (LH), ki sta pod vplivom gonadoliberina (GnRH). GnRH se izloča iz hipotalamusa in spodbudi izločanje LH in FSH iz adenohipofize. LH in FSH nato naprej spodbudita izločanje estrogenov iz jajčnikov. Hormoni adenohipofize in jajčnikov se ne izločajo konstantno skozi celoten ženski mesečni spolni cikel, ampak njihovo izločanje skozi cikel zelo niha (Priloga 1). Mesečni cikel traja približno 28 dni. V prvi polovici cikla (folikularna faza) koncentracija estradiola v plazmi narašča in doseže vrh malo pred ovulacijo (14. dan cikla). Takoj po ovulaciji njegova koncentracija zelo upade. V drugi polovici cikla (luteinska faza) njegova koncentracija ponovno narašča do 20. dne. Nato začne počasi upadati do najnižje koncentracije, katero doseže v času menstruacije, pred začetkom novega cikla (14). Izločanje estrogenov je uravnavano s sistemom povratnih zank. Tik pred ovulacijo povečana koncentracija estrogenov spodbudi izločanje LH, kar se odraža v povečanem nastajanju androgenov in estrogenov (pozitivna povratna zanka). V luteinski fazi pa povečana koncentracija estrogenov in progesterona inhibira izločanje FSH in LH, kar se odraža v njihovem zmanjšanem izločanju iz jajčnikov (negativna povratna zanka) (15).

1.2.1.1 Estrogen pri moških

Čeprav estrogen tradicionalno velja za ženski spolni hormon, pa ima njegova prevladujoča oblika 17β -estradiol ključno vlogo tudi pri spolni funkciji moških (18). Količina estrogenov pri moških je bistveno nižja kot pri ženskah in predstavlja približno petino količine estrogenov pri ženskah, ki niso noseče (14). Estradiol je pri moških bistven za uravnavanje libida, erektilne funkcije in spermatogeneze, vendar je njegovo točno vlogo pri vsem tem težko določiti. Veliko število estrogenskih receptorjev in tudi encima aromataze, ki pretvarja testosteron v estrogen, najdemo v možganih, testisih in penisu – organih, pomembnih za spolno delovanje. V možganih je povečana sinteza estradiola v področjih, ki so povezana s spolnim vzburjenjem. V testisih, kjer ga sintetizirajo Leydigove, Sertolijeve in germinalne celice, modulira spermatogenezo. Znano pa je tudi, da zvišane vrednosti estrogena povečajo incidenco za erektilno disfunkcijo (18). V drugih tkivih v telesu, zlasti v jetrih, nastajajo precej večje količine estrogenov kot v testisih in verjetno predstavljajo okoli 80 % celotne proizvodnje estrogena pri moških (14).

1.2.1.2 Mehanizem delovanja

Estrogeni izražajo svoje številne učinke preko vezave na estrogenske receptorje (ER), ki spadajo v skupino jedrnih hormonskih receptorjev (NHR). NHR so del velike skupine jedrnih receptorjev, ki delujejo kot transkripcijski dejavniki (17). Obstajata 2 podtipa ER ($ER\alpha$ in $ER\beta$), ki se delita naprej na več izooblik (19). $ER\alpha$ in $ER\beta$ sta kodirana z različnima genoma. $ER\alpha$ izraža gen *ESR1*, ki se nahaja na kromosomu 6, $ER\beta$ pa gen *ESR2*, ki se nahaja na kromosomu 14. Večina ugotovitev glede z ER posredovanega E2 signaliziranja (E2-ER signaliziranje) v tarčnih tkivih izhaja iz raziskav na "knock-out" živalskih modelih. Kljub vrstno specifičnim razlikam v tkivni porazdelitvi estrogenskih receptorjev se zdi, da $ER\alpha$ prevladuje v maternici, mlečnih žlezah, hipofizi, skeletnih mišicah, maščobnem tkivu in kosteh. $ER\beta$ pa naj bi bil ključen pri posredovanju E2 signaliziranja v jajčnikih, prostati, pljučih, kardiovaskularnem in centralnem živčnem sistemu. Ekspresija obeh ER ni samo tkivno specifična, ampak je znotraj posameznega tkiva tudi celično specifična. Na primer, v jajčnikih je $ER\beta$ bolj izražen v granuloznih celicah, $ER\alpha$ pa v teka celicah (17). Glede na ravnotežje med aktivnostma $ER\alpha$ in $ER\beta$ v tarčnih organih prihaja do selektivne stimulacije ali inhibicije signalnih poti estrogena (20).

Estrogenski receptorji so tako kot drugi člani skupine NHR razdeljeni v 6 funkcionalno različnih domen: A/B, C, D, E in F (Priloga 2). Domeni A/B sta najbolj variabilni in predstavljata N-terminalni del receptorja. Vsebujeta od liganda-neodvisen aktivacijski segment (AF-1). Domena C ali DNA vezavna domena je mesto, s katerim se receptor veže na DNA. Je najbolj ohranjena in je skoraj identična pri obeh ER. Domena D vsebuje jedrni lokacijski signal in ima povezovalno funkcijo, saj povezuje C in multifunkcijsko domeno E. Domena E predstavlja C-terminalni del receptorja. Imenuje se tudi ligand-vezavna domena (LBD). Vsebuje vezavno mesto za hormon in od liganda odvisen aktivacijski segment (aktivacijska funkcija, AF-2) ter sodeluje pri homo- in heterodimerizaciji. F domena predstavlja skrajni C-terminalni del receptorja (17,19).

Ključen korak v celičnem delovanju estrogenskih receptorjev in izražanju učinkov estrogenov je vezava estrogenov na ER. Estrogenski receptorji so prisotni na perimembrani, mitohondrijih in v jedru (17). Estrogeni delujejo tako kot vsi ostali steroidni hormoni na dva načina (21):

- »klasično« genomsko delovanje,

Estrogen se veže na ER v citoplazmi. Nastane kompleks estrogen-ER, ki se premakne v jedro celice, kjer deluje kot transkripcijski dejavnik in na ta način uravnava izražanje svojih tarčnih genov. Izražanje gena lahko uravnava neposredno z vezavo na zaporedje DNA v genu, ki se imenuje na estrogen odzivni element (ERE). S svojo vezavo na ERE povzroči aktivacijo ali represijo izražanja genov. Pri genih, ki nimajo ERE, pa je vpliv kompleksa estrogen-ER na njihovo transkripcijo posreden. V tem primeru kompleks interagira z različnimi transkripcijskimi dejavniki, ki se nato vežejo na svoja vezavna mesta na DNA v genih (19,21).

- negenomsko delovanje.

Pri tem načinu delovanja vezava estrogena na ER sproži hitre učinke, ki so pogosto povezani z aktivacijo različnih protein-kinaznih kaskad. Za te učinke estrogenov so najverjetneje odgovorni estrogenski receptorji, ki se nahajajo na celični membrani, (membranski estrogenski receptorji) in ne v citoplazmi (21).

Do sedaj smo spoznali, da lahko tudi eksogene snovi podobno kot endogeni hormoni, modulirajo delovanje hormonskih receptorjev. V primerjavi z endogenimi hormoni lahko eksogene snovi izzovejo enak (agonističen) ali pa nasproten (antagonističen) učinek. Spoznali smo tudi mehanizem, preko katerega estrogeni izvajajo svoje učinke. V nadaljevanju so predstavljene lastnosti in neželeni/toksični učinki spojin, ki smo jih preiskovali.

1.3 Klonazepam

Klonazepam je učinkovina, ki spada med anksiolitike in antikonvulzive. Uporablja se predvsem za zdravljenje epilepsij. Njegova uporaba v zdravstvu, režim odmerjanja in farmacevtske oblike so navedene v Prilogi 3. Prodaja se pod različnimi lastniškimi imeni različnih proizvajalcev. V Sloveniji je na voljo pod lastniškim imenom Rivotril (22,23). Ameriški Urad za prehrano in zdravila (Food and Drug Administration – FDA) je prvič odobril uporabo klonazepama leta 1976, in sicer za zdravljenje paničnih motenj in napadov (24). Kemijsko gledano ga uvrščamo med benzodiazepine (22). Benzodiazepini so triciklične spojine, ki so v osnovi sestavljeni iz dveh benzenskih obročev in enega 1-4-diazepinskega obroča (22). Kemijska struktura klonazepama je prikazana v Preglednici I v poglavju »Materiali in metode - Testiranje spojine«, osnovne fizikalno kemijske lastnosti pa so podane v Prilogi 4.

1.3.1 Farmakokinetika

Klonazepam se po peroralni administraciji tablet hitro in skoraj popolnoma absorbira. Absolutna biološka razpoložljivost znaša okoli 90 %. Razpolovni čas absorpcije je približno 25 minut. Maksimalno plazemsko koncentracijo (C_{max}) doseže 1–4 urah po peroralni administraciji (23,25). *Crevoisier et al.* (26) so v svoji študiji farmakokinetike enkratnega odmerka klonazepama na 12 zdravih prostovoljcih objavili, da znaša C_{max} po enkratnem peroralnem odmerku 2 mg klonazepama 14,9 ng/mL (47,2 nmol/L). Pri zdravljenju so ciljne antikonvulzivne plazemske koncentracije klonazepama v razponu od 20 do 70 ng/ml (63,3–221,1 nmol/L) (23). Klonazepam se hitro porazdeli v različne organe in tkiva, predvsem pa v možganske strukture. Približno 85 % ga je vezanega na plazemske beljakovine. Se zelo dobro presnavlja. Njegova biotransformacija poteka v jetrih predvsem z redukcijo 7-nitro skupine v 4-amino derivat, ki se lahko nato acetilira, hidroksilira in glukuronidira. Razpolovni čas izločanja klonazepama običajno znaša od 30 do 40 ur. Manj kot 2 % se ga izloči v urin nespremenjenega. 50–70 % odmerka se v obliki presnovkov izloči z urinom, 10–30 % pa z blatom. Klonazepam v majhnih količinah prehaja v mleko, zato matere, ki jemljejo klonazepam, ne smejo dojiti (23,25).

1.3.2 Farmakodinamika

Najmočnejši učinek klonazepama je antikonvulzivni, poleg tega pa deluje še sedativno hipnotično, anksiolitično in mišično relaksantno (23). Deluje v centralnem živčnem sistemu (CŽS). Natančen mehanizem njegovega delovanja, s katerim povzroča svoje učinke, ni znan. Domneva se, da je povezan z njegovo spodobnostjo povečanja aktivnosti γ -aminomaslene kisline (GABA), ki je glavni inhibitorni nevrottransmitter v CŽS (25). Klonazepam, tako kot ostali benzodiazepini, poveča učinke GABA z modulacijo GABA A receptorja – pentamerični ionotropni receptor v CŽS. Veže se na alosterično (benzodiazepinsko) vezavno mesto na GABA A receptorju in deluje kot agonist. S svojo vezavo namreč poveča sposobnost vezave GABA na GABA A receptor in na ta način potencira njen inhibitorni učinek (27,28).

1.3.3 Neželeni učinki in toksičnost

Pri zdravljenju s klonazepamom lahko pride do pojava različnih neželenih učinkov. Najbolj pogosto se pojavijo utrujenost, mišična hipotonija, mišična oslabelost, omotica, ataksija, upočasnjene reakcije in reverzibilne motnje vida (dvojni vid). Običajno so ti učinki prehodni/reverzibilni in izginejo spontano ali po zmanjšanju terapevtskega odmerka.

Zdravljenje s klonazepamom lahko vodi v fizično in psihično odvisnost. Tveganje za pojav odvisnosti narašča s povečevanjem terapevtskega odmerka in s podaljševanjem zdravljenja. Večjemu tveganju za pojav odvisnosti so podvrženi bolniki z zgodovino zlorabe alkohola in/ali nedovoljenih drog. Po prenehanju zdravljenja lahko pride do pojava odtegnitvenega sindroma. Le-ta se lahko pojavi že po nekaj urah po prenehanju zdravljenja ali pa šele po enem oz. več tednih. Pri prevelikem odmerjanju lahko pride do pojava arefleksije, apneje, hipotenzije, kardiorespiratorne depresije in kome. V primeru samostojnega jemanja so ta stanja le redko življenjsko ogrožajoča (23).

Dveletne študije kancerogenosti s klonazepamom niso bile izvedene. Študija kancerogenosti na podganah in testiranja genotoksičnosti z bakterijskimi sistemi niso pokazala, da bi bil klonazepam kancerogen in genotoksičen (23). So pa študije, v katerih so ocenjevali vpliv klonazepama na plodnost in sposobnost razmnoževanja pri podganah, pokazale zmanjšan delež nosečnosti in zmanjšano preživetje mladičev pri odmerkih 10 in 100 mg/kg/dan (23,25).

1.4 Lorazepam

Lorazepam je učinkovina, ki spada med anksiolitike. Uporablja se predvsem za zdravljenje anksioznosti in nespečnosti. Poleg tega ima tudi hipnotične, antikonvulzivne in sedativne lastnosti. Njegova uporaba v zdravstvu, režim odmerjanja in farmacevtske oblike so navedene v Prilogi 5. V Sloveniji ga najdemo na tržišču pod lastniškim imenom Lorsilan (29,30). FDA je prvič odobrila njegovo uporabo leta 1977, in sicer za zdravljenje anksioznosti, epileptičnega statusa, nespečnosti, ki je povezana z anksioznostjo in situacijskim stresom, ter za premedikacijo pri anestetičnih postopkih (24). Kemijsko gledano ga uvrščamo med benzodiazepine (29). Njegova kemijska struktura je prikazana v Preglednici I v poglavju »Materiali in metode - Testirane spojine«, osnovne fizikalno kemijske lastnosti pa so podane v Prilogi 6.

1.4.1 Farmakokinetika

Lorazepam se po peroralni aplikaciji hitro absorbira. Absolutna biološka uporabnost znaša okoli 90 %. C_{max} doseže 2 uri po administraciji. C_{max} pri peroralnem odmerku velikosti 2 mg znaša okoli 20 ng/mL (62,27 nmol/L). Učinek lorazepama nastopi zelo hitro, v 20–30 minutah, najbolj pa je izražen 60–90 minut po administraciji. Po absorpciji se hitro porazdeli v različne organe in tkiva. Približno 85 % se ga veže na plazemske beljakovine. Koncentracije v cerebrospinalni tekočini dosežejo med 5 in 28 % koncentracije v serumu.

Večina lorazepana se presnavlja v jetrih, kjer se v veliki meri konjugira v svoj glavni metabolit lorazepam glukuronid, ki je neaktiven in se izloča z urinom. Večina lorazepama se izloča z urinom (65–80 %), nekaj malega pa tudi z blatom. Povprečni razpolovni čas nekonjugiranega lorazepama je približno 12 ur, njegovega glavnega metabolita, lorazepam glukuronida, pa približno 18 ur (29–31).

1.4.2 Farmakodinamika

Lorazepam deluje v CŽS, kjer poveča učinke inhibitornega nevrottransmitterja GABA. Njegov natančen mehanizem delovanja ni poznan. Podoben je mehanizmu delovanja klonazepama in ostalih benzodiazepinov. Veže se na benzodiazepinsko vezavno mesto na GABA A receptorjih, s čimer se poveča afiniteta GABA A receptorja za njegov endogeni ligand GABA. Vezava GABA na GABA A receptor povzroči aktivacijo receptorja in s tem odprtje kloridnega kanala, ki omogoči prehod kloridnih ionov skozi celično membrano. To vodi do hiperpolarizacije postsinaptičnega nevrona in zmanjšane vzdraženosti živčnih celic. Intenzivnost delovanja je neposredno povezana s stopnjo zasedenosti benzodiazepinskih receptorjev (29,30,32).

1.4.3 Neželeni učinki in toksičnost

Pogosti neželeni učinki, ki se lahko pojavijo, so zmedenost, depresija, sedacija, zaspanost, ataksija, omotica, utrujenost in astenija. Do pojava neželenih učinkov pride pogosteje na začetku zdravljenja in v odvisnosti od velikosti odmerka. Ti učinki kasneje ob kontinuirani uporabi ali ob zmanjšanju odmerka izzvenijo. Zdravljenje z lorazepamom lahko vodi v fizično in psihično odvisnost. Tveganje za pojav odvisnosti je večje pri večjem odmerku in daljšem času jemanja. Večjemu tveganju za pojav odvisnosti so podvrženi bolniki z zgodovino zlorabe alkohola in/ali nedovoljenih drog. V primeru razvoja fizične odvisnosti se lahko po prenehanju zdravljenja pojavijo odtegnitveni simptomi. Zastrupitev z lorazepamom ob prekomernem odmerjanju se kaže z različnimi stopnjami depresije CŽS, od zaspanosti do kome. Huda zastrupitev v kombinaciji z alkoholom ali drugimi zdravili, ki zavirajo delovanje CŽS, lahko izjemoma vodi tudi v smrt (30).

V študijah toksičnosti na živalih po enkratnem odmerjanju se je za lorazepam izkazalo, da ima razmeroma nizko toksičnost. V študijah toksičnosti po dolgotrajnem jemanju lorazepama, ki so jih izvedli na podganah in psih, na koncu ni bilo opaznih sprememb, ki bi jih lahko povezali z jemanjem lorazepama (30). Reproaktivne študije na živalih so bile opravljene na miših, podganah in dveh sevih kuncev. V kuncih, ki so prejeli lorazepam,

so opazili občasne anomalije, ki pa niso bile povezane z velikostjo odmerka. Pri odmerkih 40 in več mg/kg so se pri kuncih pojavili dokazi o povečani izgubi fetusa (31). V študijah kancerogenosti na podganah in miših, se lorazepam ni izkazal za kancerogenega. Študije mutageneze niso bile izvedene (30,32).

1.5 Mianserinijev klorid

Mianserinijev klorid je hidrokloridna sol mianserina (33). Je aktivna učinkovina zdravila Mianserin (34). Primarno spada med učinkovine z antidepresivnim učinkom, poleg tega pa deluje tudi anksiolitično (34,35). Njegova uporaba v zdravstvu, režim odmerjanja in farmacevtske oblike so navedene v Prilogi 7. Na trgu je na voljo pod različnimi lastniškimi imeni (33). V preteklosti je bil na voljo na mednarodni ravni, a ga je na večini trgov zamenjala učinkovina mirtazapin (35). V Sloveniji trenutno ni registrirano nobeno zdravilo z zdravilno učinkovino mianserinijev klorid (36). Njegova kemijska struktura je prikazana v Preglednici I v poglavju »Materiali in metode - Testirane spojine«, osnovne fizikalno kemijske lastnosti pa so podane v Prilogi 8.

1.5.1 Farmakokinetika

Mianserin se po peroralni administraciji hitro in dobro absorbira iz gastrointestinalnega trakta (34,37). Pri prvem prehodu skozi jetra se obsežno metabolizira preko različnih presnovnih poti, ki vključujejo aromatsko hidroksilacijo, N-oksidacijo in N-demetilacijo (34). Njegova biološka uporabnost znaša okoli 20 %. Svojo C_{max} doseže 3 ure po administraciji odmerka (37). *Maguire et al.* (38) so v svoji študiji ovrednotili kinetiko mianserina pri 8 zdravih moških prostovoljcih, ki so prejeli enkratno peroralno odmerko 60 mg mianserinijevega klorida (terapevtski odmerek). V študiji so zapisali, da je bila maksimalna krvna koncentracija dosežena 3 ure po administraciji odmerka in je znašala 65 $\mu\text{g/L}$ (216,1 mol/L). Pri vseh preiskovancih so bile krvne koncentracije mianserina nižje od plazemskih, razmerje koncentraciji kri/plazma pa je med posamezniki variiralo 0.50–0.74 (38). Plazemske koncentracije mianserina se med posamezniki zelo razlikujejo, a obstajajo indikacije, ki kažejo na korelacijo s terapevtskim odzivom. Mianserin se obširno distribuira po celotnem telesu in se močno veže na plazemske beljakovine (34). V krvi ga je približno 95 % vezanega na plazemske beljakovine (37). Prehaja krvno-možgansko bariero (34). Njegova razpolovna doba izločanja znaša 21–61 ur, zato zadostuje enkratno dnevno odmerjanje zdravila. Plazemske koncentracije dinamičnega ravnovesja doseže v 6 dnevih po začetku zdravljenja (37). Mianserin se obsežno presnavlja. Iz telesa se izloči v 7 do 9

dneh, večina z urinom v obliki prostih ali konjugiranih metabolitov, nekaj pa tudi z blatom (34,37). *In vitro* študije in študije na živalih so pokazale, da le majhna količina mianserina prehaja placento in se izloča v materino mleko. Farmakokinetične študije mianserina pri starejših bolnikih pa so pokazale, da ima pri njih daljšo razpolovno dobo in počasnejši metabolni očistek, zaradi tega je lahko za zagotovitev ustreznega kliničnega odziva zadosten že nižji dnevni odmerek od običajnega (34).

1.5.2 Farmakodinamika

Mianserinijev klorid povzroča antidepresivne učinke. Njegov mehanizem terapevtskega delovanja ni v celoti razumljen. Znano je, da blokira α -adrenergične, histaminske receptorje H1 in nekatere vrste serotoninskih receptorjev (33). V ČŽS povzroča blokado α 2-avtorceptorjev in zavira ponovni prevzem noradrenalina ter na ta način poveča prenašanje živčnih impulzov prek noradrenalina (37). Ima izrazito sedativno delovanje, ki naj bi bilo posledica njegovega antagonističnega delovanja na receptorje α 1 in histaminske receptorje H1 (34,37). Ima majhen učinek na absorpcijo serotonina v ČŽS, se je pa pokazalo, da pri depresivnih osebah povečuje absorpcijo serotonina na periferiji (34).

1.5.3 Neželeni učinki in toksičnost

Pri zdravljenju z mianserinom se lahko pojavijo različni neželeni učinki. V redkih primerih so poročali o depresiji kostnega mozga, ki pa je načeloma reverzibilna po prekinitvi zdravljenja. V nekaterih primerih je prišlo do pojava blage zlatenice, hipomanije in konvulzij. Drugi možni neželeni učinki so še motnje v delovanju jeter, omotica, edem, artritis, kožni izpuščaji, potenje, tremor. Med antidepresivno terapijo lahko pride do poslabšanja psihotičnih manifestacij. Opaženi so bili tudi primeri, ko je bolnik med zdravljenjem ali kmalu po prenehanju zdravljenja razmišljal o samomoru in se samomorilno obnašal (34). V primeru prevelikega odmerjanja običajno pri bolniku pride do daljše sedacije. V redkih primerih lahko pride tudi do pojava motenj srčnega ritma, depresije dihanja, hudih hipotenzij in konvulzij (37).

Izvedene študije farmakološke varnosti, toksičnosti pri ponavljajočih odmerkih, genotoksičnosti in kancerogenosti niso pokazale posebnega tveganja za človeka. Prav tako se v študijah ni pokazalo, da bi mianserinijev klorid vplival na sposobnost razmnoževanja (37). Študije na živalih niso pokazale nevarnosti v času nosečnosti, vendar pa prav tako ni podatkov, da je zdravilo varno za uporabo v nosečnosti (34).

1.6 Sertralin

Sertralin se v farmacevtskih izdelkih nahaja v obliki sertralinijevega klorida (39). Sertralinijev klorid je hidrokloridna sol sertralina, ki je sintetični derivat naftalenamina (40). Spada v skupino antidepresivov, znanih kot selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina (SSRI) (41). Primarno se uporablja kot antidepresiv, zaradi anksiolitičnega delovanja pa občasno tudi kot anksiolitik. Njegova uporaba v zdravstvu, režim odmerjanja in farmacevtske oblike so navedene v Prilogi 9. Na tržišču je na voljo pod številnimi lastniškimi imeni. FDA ga je prvič odobrila za uporabo leta 1991 (41). Kemijska struktura sertralinijevega klorida je prikazana v Preglednici I v poglavju »Materiali in metode - Testirane spojine«, osnovne fizikalno kemijske lastnosti pa so podane v Prilogi 10.

1.6.1 Farmakokinetika

Sertralin se po peroralni administraciji počasi absorbira (42). Pri prvem prehodu skozi jetra se obsežno oksidira do svojega glavnega presnovka N-dezmetilsertralina, ki ima zanemarljivo farmakološko aktivnost (39,42,43). Sertralin doseže C_{\max} 6 – 8 ur po administraciji terapevtskega odmerka. C_{\max} sertralina po več enkratnih dnevni 200 mg odmerkih znaša 0,19 $\mu\text{g/mL}$ (620,45 nmol/L) (43). V krvnem obtoku ga je približno 98 % vezanega na plazemske beljakovine. Razpolovni čas sertralina znaša povprečno okoli 26 ur (22–36 ur), njegovega metabolita N-dezmetilsertralina pa 62–104 ure. Po približno 1 tednu odmerjanja enkrat na dan se doseže koncentracija sertralina v stanju dinamičnega ravnovesja. Tako sertralin kot N-dezmetilsertralin se izdatno presnavljata (39). V prvi stopnji njune presnove poteka oksidativna deaminacija, ki ji nato sledijo redukcija, hidroksilacija in glukoronidna konjugacija (43). Njuni presnovki se iz telesa izločajo v enakih količinah z blatom in urinom. Manj kot 1 % sertralina se v urin izloči nespremenjenega (39).

1.6.2 Farmakodinamika

Vse spojine znotraj skupine SSRI imajo kljub jasnim strukturnim razlikam podobno farmakološko aktivnost (44). SSRI selektivno in močno blokirajo ponoven privzem serotonina v centralnih sinapsah. Ker je ponovni privzem primarni mehanizem inaktivacije serotonina, zaviranje le-tega dvigne raven živčnega prenašalca serotonina v sinapsi. Kratkoročno vodi povečana koncentracija serotonina, ki je na voljo za delovanje na presinaptične avtoreceptorje, do zmanjšanja serotoninske nevrottransmisije. Približno 14 dni po začetku zdravljenja se zmanjša občutljivost presinaptičnih serotoninskih

avtorreceptorjev, poveča se sproščanje serotonina iz živčnih končičev in posledično pride do potenciranja serotoninergične nevrottransmisije (45). Študije pri klinično relevantnih odmerkih so pokazale, da sertralin blokira privzem serotonina v človeške trombocite. *In vitro* študije na živalih so pokazale, da je močan in selektiven zaviralec ponovnega nevronskega privzema serotonina in da ima zelo šibke učinke na ponovni prevzem norepinefrina in dopamina. V *in vitro* študijah se je prav tako pokazalo, da sertralin nima signifikantne afinitete za adrenergične, holinergične, GABA, dopaminergične, histaminergične, serotonergične ali benzodiazepinske receptorje (46).

1.6.3 Neželeni učinki in toksičnost

Pri zdravljenju s sertralinom je najpogostejši neželeni učinek slabost (39). Drugi pogosto opaženi neželeni učinki v kliničnih raziskavah, nadzorovanih s placebom, so bili driska, tremor, dispepsija, zmanjšan apetit, hiperhidroza, nezmožnost ejakulacije in zmanjšan libido (46). Neželeni učinki so odvisni od odmerka. V nadaljevanju zdravljenja se lahko izrazitost in pogostost nekaterih izmed neželenih učinkov zmanjša. Po prekinitvi zdravljenja se lahko pojavijo odtegnitveni simptomi, kot so omotica, senzorične motnje, motnje spanja, anksioznost, slabost, tremor, glavobol, zato je potrebno ob prekinitvi zdravljenja odmerek zmanjšati postopoma (39). Pri zdravljenju s sertralinom lahko pride do predoziranja. Na možnost predoziranja poleg velikosti odmerka vplivata tudi populacija in sočasno zdravljenje z drugimi zdravili, zato je ta dva dejavnika potrebno upoštevati pri določanju maksimalnih terapevtskih odmerkov (47). Najpogostejši znaki in simptomi predoziranja so tahikardija, zaspanost, slabost, bruhanje, vrtoglavica, vznemirjenje, tresenje (46). Obstajajo tudi primeri, čeprav so redki, ko je zaradi predoziranja s samim sertralinom ali v kombinaciji z alkoholom in drugimi zdravili prišlo do letalnih izidov (47).

Izvedene študije farmakološke varnosti, toksičnosti pri ponavljajočih odmerkih, genotoksičnosti in kancerogenosti niso pokazale posebnega tveganja za človeka. Obsežni podatki, ki so jih pridobili v študijah, niso pokazali, da bi sertralin povzročal prirojene malformacije. Reproductivne študije na živalih niso pokazale teratogenega delovanja ali neželenih učinkov na plodnost samcev. Se je pa v teh študijah pokazal učinek na sposobnost razmnoževanja, ki naj bi bil posledica toksičnih učinkov pri samicah-materah (39,46).

2 NAČRT DELA

Živimo v času, v katerem se vedno bolj zavedamo posledic sodobnega načina življenja na okolje okoli nas. Ena izmed teh posledic je onesnaženost okolja s snovmi, ki v njem naravno niso prisotne in za katere obstaja možnost, da povzročajo škodljive učinke na zdravje ljudi in živali, ki pridejo v stik z njimi. Nekatero izmed teh spojin imajo potencial, da delujejo kot hormonski motilci in na ta način povzročajo motnje endokrinega sistema, ki so lahko vzrok za pojav številnih bolezni. Zaradi tega znanstveniki v okviru svojega raziskovanja čedalje več pozornosti posvečajo tem snovem. Med spojine, ki imajo potencial, da učinkujejo kot HM, spadajo tudi določene zdravilne učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje različnih bolezenskih stanj. Da ne bi z uporabo takšnih zdravilnih učinkovin povzročili več škode kot koristi, je zelo pomembno ugotoviti, ali le-te dejansko delujejo kot HM ali ne. Zato smo se odločili, da bomo v magistrski nalogi poskusili ovrednotiti učinke 4 izbranih anksiolitikov (klonazepam, lorazepam, mianserinijev klorid in sertralinijev klorid) na estrogenski receptor α . Zanje smo se odločili na podlagi rezultatov napovedi vezave, ki smo jih pridobili s pomočjo računalniškega programa Endocrine Disruptome. Program je namreč napovedal visoko verjetnost (»rdeč« razred) tako agonističnega kot antagonističnega delovanja teh štirih anksiolitikov na estrogenski receptor α ali β . Pridobljeni rezultati napovedi so predstavljeni v poglavju »Rezultati in razprava«.

Potencialno estrogensko delovanje izbranih 4 zdravilnih učinkovin bomo določali z *in vitro* presejalnim luciferaznim testom. Za testiranje njihovega estrogenskega delovanja bomo uporabili celično linijo hER α -HeLa-9903, ki izraža estrogenske receptorje α . V okviru našega eksperimentalnega dela bomo najprej določali toksičnost preiskovanih učinkovin za celice celične linije hER α -HeLa-9903. Za določanje citotoksičnosti spojin bomo uporabili test citotoksičnosti z resazurinom, s katerim bomo merili celično viabilnost. Testiranje citotoksičnosti spojin bomo začeli pri koncentraciji 100 μ M. Če se bo spojina pri tej koncentraciji izkazala za citotoksično, bomo nato zanjo poiskali najvišjo necitotoksično koncentracijo, ki jo bomo v nadaljevanju uporabili pri določanju estrogenskega delovanja. V drugem delu eksperimentalnega dela bomo z uporabo luciferaznega testa določali agonistično in antagonistično delovanje izbranih učinkovin na ER α . Vsako izmed izbranih učinkovin bomo testirali pri več različnih koncentracijah, tako da bomo dobili pregled čez širše koncentracijsko območje. Zgornjo mejo testiranega koncentracijskega območja bo

predstavljala najvišja necitotoksična koncentracija učinkovine, spodnjo pa koncentracija, ki je v območju oziroma je še nižja od najdenih okoljskih koncentracij, navedenih na začetku razprave. Agonističen učinek testiranih spojin na ER α bomo določali z neposrednim merjenjem aktivnosti luciferaze. Antagonistični učinek spojin bomo določali posredno, preko zmanjšanja aktivnosti luciferaze ob dodatku agonista ER α . V agonističnem testu bomo za pozitivno kontrolo uporabili znani agonist ER α , E2, v antagonističnem testu pa znani antagonist ER α , 4-hidroksitamoksifen (H-TAM).

Z luciferaznim testom bomo poskušali potrditi ali zavrniti sledeče napovedi, ki smo jih pridobil s pomočjo programa Endocrine Disruptome:

1. Izbrane učinkovine se vežejo in modulirajo ER.
2. V primeru, da učinkovine modulirajo ER, je učinek takšen, kot je bila napoved.

V primeru, da bodo učinkovine delovale agonistično ali antagonistično na ER, nas bo zanimalo tudi, kako močan je učinek, ki ga izražajo.

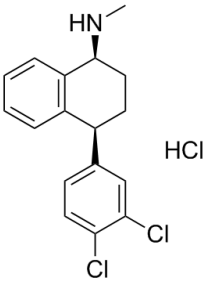
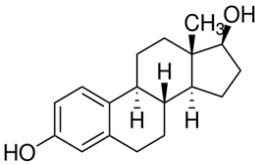
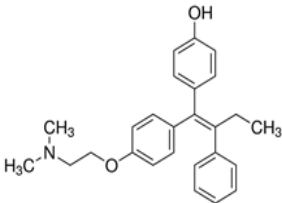
3 MATERIALI IN METODE

3.1 Testirane spojine

Na ER α smo v okviru raziskave preiskovali učinke naslednjih 4 spojin: klonazepam (CZP), lorazepam (LZP), mianserinijev klorid (MIA) in sertralinijev klorid (SER). V luciferaznem testu smo za testiranje agonističnega delovanja kot kontrolno spojino uporabljali β -estradiol (E2), ki je agonist na ER α , za testiranje antagonističnega delovanja pa 4-hidroksitamoksifen (H-TAM), ki je antagonist na ER α . Preiskovane spojine in kontroli so predstavljene v Preglednici I. V prilogi so navedeni še podatki za referenčne standarde (Priloga 11) in reagente (Priloga 12), ki smo jih uporabili v času raziskave.

Preglednica I: *Preiskovane spojine in kontroli. Za vsako izmed spojin je navedena njena oznaka, molska masa, CAS številka, oznaka produkta (Cat. (catalogue number)) in kemijska struktura. Ležeče ime pod imenom spojine predstavlja njeno IUPAC kemijsko ime, v oklepaju je naveden njen proizvajalec, navedeni delež pa se nanaša na čistost izbrane spojine.*

Ime spojine	Oznaka	MM [g/mol]	CAS	Cat. #	Kemijska struktura
Klonazepam <i>5-(2-klorofenil)-7-nitro-3H-1,4-benzodiazepin-2(1H)-ol</i> (Sigma-Aldrich, MO, ZDA) $\geq 98,0\%$	CZP	315,713	1622-61-3	C1277	
(\pm)-Lorazepam <i>7-kloro-5-(2-klorofenil)-1,3-dihidro-3-hidroksi-2H-1,4-benzodiazepin-2-ol</i> (Sigma-Aldrich, MO, ZDA) $\geq 98,0\%$	LZP	321,16	846-49-1	L1764	
Mianserin HCl <i>1,2,3,4,10,14b-heksahidro-2-metildibenzo[c,f]pirazino [1,2-a]azepin hidroklorid</i> (TCI, Japonska) $> 98,0\%$	MIA	300,83	21535-47-7	M2623	

Ime spojine	Oznaka	MM [g/mol]	CAS	Cat. #	Kemijska struktura
Sertralin HCl <i>(1S,4S)-1-(3,4-diklorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-4-(metilamino)naftalen hidroklorid</i> (TCI, Japonska) > 98,0 %	SER	342,69	79559-97-0	S0507	
β-estradiol <i>17β-estradiol</i> (Sigma, MO, ZDA) ≥ 98,0 %	E2	272,38	50-28-2	E8875	
(Z)-4-Hidroksitamoksifen <i>trans-4-hidroksitamoksifen</i> (Sigma, MO, ZDA) ≥ 98,0 %	H-TAM	387,51	68047-06-3	H7904	

3.1.1 Priprava vzorcev testiranih spojin

Raztopine testiranih spojin smo pripravljali v mikrocentrifugirkah. Najprej smo v mikrocentrifugirke s pomočjo analitske tehtnice (Mettler Toledo, Greifensee, Švica) natehtali 2–3 g testiranih spojin. Natehtane spojine smo raztopili v ustreznem volumnu 99,9-% DMSO (Sigma, MO, ZDA) in jih nato naprej serijsko redčili z DMSO do ustreznih izhodiščnih koncentracij. Izhodiščne koncentracije tako pripravljenih raztopin so bile 1000-krat višje od končnih testiranih.

Pripravljene izhodiščne raztopine smo nato v nadaljevanju redčili z gojitvenim medijem, katerega sestava je opisana v nadaljevanju v podpoglavju »Osnove dela s celicami – Priprava gojitvenega medija«. Pri pripravi raztopin za testiranje antagonističnega delovanja smo uporabljali gojitveni medij, ki je vseboval dodatek E2, s koncentracijo 75 pM (končna koncentracija 25 pM). 1,5 μL vsake izmed izhodiščnih raztopin smo dodali v 500 μL medija. Po dodatku raztopine v medij smo vsebino mikrocentrifugirke dobro premešali na vibracijskem mešalu (Tehtnica, Železniki, Slovenija). Končna koncentracija testiranih spojin v pripravljenih vzorcih za nanos na ploščico je bila 3-krat višja od dejansko

testirane. V Preglednici II so prikazane vse koncentracije spojin, ki smo jih testirali. Končna koncentracija DMSO-ja na testni ploščici je znašala 0,1 % (v/v). Tako nizko koncentracijo DMSO-ja je potrebno ohranjati, ker je DMSO citotoksičen.

Preglednica II: *Koncentracije spojin, ki smo jih testirali.*

Vzorec	Koncentracija spojine
1	100 μ M
2	10 μ M
3	1 μ M
4	100 nM
5	10 nM
6	1 nM
7	100 pM
8	10 pM
9	75 μ M
10	50 μ M
11	25 μ M
12	5 μ M
13	2,5 μ M

Izbrane koncentracije so bile pridobljene po postopku redčenja opisanem v prejšnjih dveh odstavkih. Vse spojine smo testirali na agonizem in antagonizem pri koncentracijah vzorcev od 1 – 8. Pri koncentracijah vzorcev 9 – 13 smo testirali le izbrane spojine, ki so kazale pri vzorcih s koncentracijami 1 – 8 toksične ali možne agonistične oziroma antagonistične učinke.

3.2 *Endocrine Disruptome*

Endocrine Disruptome (ED) je odprtokodno spletno orodje za napovedovanje vezave spojin na človeške jedrne receptorje, ki je prosto dostopno na spletni strani <http://endocrinedisruptome.ki.si/>. Za napovedovanje vezave uporablja molekulsko sidranje. ED napoveduje vezavo spojin na 12 različnih človeških jedrnih receptorjev: androgeni receptor, estrogenska receptorja α in β , glukokortikoidni receptor, jetrna X receptorja α in β , s peroksisomskimi proliferatorji aktivirani receptorji $\alpha, \beta/\delta$ in γ , retinoidni X receptor α ter tiroidna receptorja α in β (48).

ED deluje na platformi imenovani »Docking interface for Target Systems«, ki omogoča sidranje ene molekule v več različnih tarč. Za izvedbo sidranja uporablja program AutoDock Vina. AUC (površina pod ROC krivuljo, katere ordinata je občutljivost in

abscisa 1 minus specifičnost) je posebej podana za vsak receptor in omogoča oceno točnosti celotnega postopka sidranja. Dobljeni rezultati so barvno kodirani in razvrščeni v 4 razrede. Za vsako strukturo so bili določeni 3 pragovi, ki omogočajo razdelitev na 4 razrede verjetnosti vezave: rdeča, oranžna, rumena in zelena. Za pridobitev pripadajočih rezultatov sidranja je bila za izračune pragov uporabljena občutljivost (SE). Razred »rdeč« ustreza $SE < 0,25$ in označuje visoko verjetnost vezave. Dva vmesna razreda, »oranžna« ($0,25 < SE < 0,5$) in »rumena« ($0,5 < SE < 0,75$), predstavljata srednjo verjetnost vezave spojine na receptor. Razred »zelen« s $SE > 0,75$ pa ustreza majhni verjetnosti vezave (48,49).

3.3 Celična linija hER α -HeLa-9903

V študiji smo za testiranje uporabljali celično linijo hER α -HeLa-9903 (National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, JCRB Cell Bank, Japonska). HeLa celice so nesmrtno človeške epiteljske celice raka materničnega vratu. Izvirajo iz rakastega tkiva adenokarcinoma materničnega vratu Henriette Lacks, po kateri so tudi dobile ime. Celice biopsijskega vzorca Henriette Lacks so nasadili v kulturo. V njej so celice robustno rastle in postale prva človeška rakava celična linija, ki je bila nesmrtna v obliki celičnih kultur (50,51).

Celična linija hER α -HeLa-9903 je podklon celične linije HeLa. Vsebuje gen za hER α (človeški estrogenski receptor α) in luciferazni reporterski gen. Pridobili so jo s postopkom stabilne transfekcije, v sklopu katerega so vanjo vnesli oba gena (50).

3.3.1 Osnove dela s celicami

Za delo s celicami so potrebni sterilni pogoji, zato je delo potekalo v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka – LAF komori (Iskra, Šentjernej, Slovenija). LAF komora s svojo zgradbo in stalnim pretokom filtriranega zraka v smeri od zgoraj navzdol onemogoča dostop mikroorganizmov na delovno površino. Komora se nahaja v posebnem prostoru (ločeno od pripravljalnega laboratorija), v katerem veljajo posebna pravila za aseptično delo, ki zagotavljajo sterilne pogoje. Pravila vključujejo obvezno uporabo 70-% etanola za razkuževanje rok, površin in pripomočkov, ki jih med delom uporabljamo. Z uporabo 70-% etanola preprečimo prenos in razmnoževanje mikroorganizmov na površine in materiale, s katerimi delamo in tako preprečimo kontaminacijo celic.

V komori smo pred pričetkom dela najprej za pol ure prižgali UV lučko in na ta način z UV sevanjem razkužili zrak in delovno površino v komori. Po obsevanju smo celotno delovno površino komore prebrisali s 70-% etanolom. Z njim smo, pred vnosom v LAF komoro, razkužili tudi ves pribor in zunanost vsebnikov reagentov, ki smo jih potrebovali za svoje delo. 70-% etanol smo uporabljali tudi za razkuževanje rokavic, ki smo jih uporabljali med samim delom. Po vsakem končanem delu smo zopet s 70-% etanolom razkužili ves pribor in reagente, preden smo jih pospravili. Nato smo najprej z detergentom in nato še s 70-% etanolom očistili tudi celotno komoro.

3.3.1.1 Priprava gojitvenega medija

Za gojenje celic smo morali pripraviti ustrezen gojitveni medij, ki je vseboval vse potrebne sestavine za njihovo preživetje in uspešno nadaljnjo razmnoževanje. Gojitveni medij za celično linijo hER α -HeLa-9903 je bil sestavljen iz (50):

- 500 mL medija MEM (Gibco, ZDA),
(Osnovni medij, sestavljen iz aminokislin, vitaminov, anorganskih soli in D-glukoze. Ne vsebuje beljakovin, lipidov ali rastnih dejavnikov, zato ga je potrebno dopolniti, običajno z 10-% FBS. Vsebuje NaHCO₃ puferski sistem, zato zahteva okolje s 5–10-% CO₂, da vzdržuje fiziološki pH (52)).
- 50 mL fetalnega govejega seruma – FBS (Sigma, MO, ZDA),
- 3 mL raztopine kanamicina iz *Streptomyces kanamyceticus* s koncentracijo 10 mg/mL (Sigma, MO, ZDA),
- 5 mL L-glutamina s koncentracijo 200 mM (Gibco, ZDA).

Gojitveni medij smo pripravili tako, da smo FBS, kanamicin in L-glutamin dodali v originalno flaško z osnovnim medijem (MEM medij) in ga nato premešali z obračanjem flaške. Pripravljen gojitveni medij smo hranili v hladilniku, saj ga je potrebno skladiščiti pri temperaturi 2 – 8 °C. Pred vsako uporabo smo ga v vodni kopeli segreti na 37 °C. Isti gojitveni medij smo uporabljali tudi za testiranje celic.

3.3.1.2 Odmrzovanje celic

Pred pričetkom dela s celicami smo morali le-te najprej odmrzniti. Celice so bile shranjene v obliki suspenzije v krioviali z volumnom 1 mL in zamrznjene pri –80 °C. V 1 mL celične suspenzije je bilo shranjenih približno 2×10^6 celic. Vialo s celicami smo vzeli iz zamrzovalnika in jo postavili v vodno kopel s temperaturo okoli 37 °C. V kopeli smo jo pustili nekaj minut, toliko da se je vsebina viala odtajala. Vsebino vialo smo nato prenesli v

15 mL centrifugirko, ki je že vsebovala 9 mL gojitvenega medija. Vse skupaj smo centrifugirali v centrifugi (Tehtnica, Železniki, Slovenija) 4 minute pri 1000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo s pomočjo aspiratorja odstranili supernatant. Celicam, ki so ostale v sedimentu, smo dodali 10 mL svežega gojitvenega medija in premešali na vibracijskem mešalu. S tem smo celice ponovno dispergirali v mediju. Nato smo celotno vsebino centrifugirke prenesli v novo sterilno gojitveno posodo s površino 75 cm² (VWR, ZDA). Pred postavitvijo v inkubator smo celice preverili še pod invertnim svetlobnim mikroskopom Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japonska). Inkubirali smo jih v specializiranem inkubatorju MCO-18AIC(UV) (Sanyo, ZDA) pri temperaturi 37 °C v atmosferi s 5-% CO₂. Za ohranitev odziva celic je potrebno pred prvim testiranjem izvesti vsaj 2 pasaži celic po odmrzovanju le-teh.

3.3.1.3 Gojenje celic

Celice smo shranjevali v gojitvenem mediju v sterilnih gojitvenih posodah v specializiranem inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5-% CO₂. S tem smo zagotovili kontrolirano okolje z ustreznimi pogoji za preživetje, rast in uspešno razmnoževanje celic. Sterilne gojitvene posode so prozorne posode pravokotne oblike z vratom in perforiranim zamaškom. Za optimalno rast celic je rastna površina gojitvene posode opto-mehansko obdelana. Na ta način se poveča adhezija in rast celic. Vrat posode je oblikovan tako, da zagotavlja popoln dostop s pipeto, kar omogoča enostavno odzemanje in dodajanje medija. Gojitvena posoda nima mrtvih robov, kar omogoča 100-% dostop do celic (53).

Celicam smo za učinkovito rast menjali medij takoj naslednji dan po presaditvi le-teh v novo gojitveno posodo, nato pa na vsak drugi dan. Pred vsako menjavo medija smo najprej pod mikroskopom preverili morfologijo celic. Z aspiratorjem smo odstranili star medij, nato pa s pipetorjem (INTEGRA Biosciences AG, Švica) dodali 7-12 mL novega medija. Po dodatku medija smo posodo nežno premešali v smeri sever-jug-vzhod-zahod (S-J-V-Z). Na ta način smo zagotovili enakomerno razporeditev celic znotraj posode. Pred postavitvijo celic v inkubator smo celice še enkrat preverili pod mikroskopom.

3.3.1.4 Štetje celic

Štetje celic je postopek, s katerim smo določili koncentracijo celic v celični suspenziji, ki smo jo dobili po tripsinizaciji le-teh. Na podlagi določene koncentracije smo nato izračunali volumen celične suspenzije, ki je vseboval priporočeno število celic za

presaditev oz. nasaditev. Celoten potek tripsinizacije, presajanja in nasajanja je opisan v nadaljevanju, v naslednjih dveh podpoglavjih.

Pri šteju celic smo si pomagali z barvilom tripan modro, ki ni toksično za celice. To barvilo prehaja samo v mrtve celice in jih obarva modro. Žive celice ostanejo neobarvane, ker barvilo v njih ne more preiti. Na ta način lahko pod mikroskopom enostavno ločimo med živimi in mrtvimi celicami, kar nam olajša štetje živih celic.

Za štetje smo si v mikrocentrifugirki pripravili mešanico celične suspenzije in barvila tripan modro v razmerju 1:1, kakor je opisano v podpoglavju »Presajanje celic«. 10–20 µL pripravljene mešanice smo s pomočjo pipete nanegli na hemocitometer (Brand, Wertheim, Nemčija), pokrit s krovnim stekelcem. Hemocitometer je kvadratna komora, izrezana v kos debelega stekla s specifično debelino. Uporablja se za izračun gostote celic v suspenzijah. Kapilarni vlek je povzročil napolnitev komore z mešanico, ki smo jo nanegli na rob hemocitometra. Hemocitometer smo nato postavili pod invertni svetlobni mikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japonska), kjer smo lahko videli 4 kvadrante, v vsakem kotu enega. Vsak izmed kvadrantov ima 16 kvadratov (4x4), kar nam olajša štetje, saj lažje sledimo, katere celice smo že prešteli. V primeru enakomerne razporeditve celic po celotni komori smo prešteli celice v dveh diagonalno si nasprotnih kvadrantih (npr. levi zgoraj in desni spodaj). Če je bila razporeditev celic po komori neenakomerna, smo prešteli celice v vseh štirih kvadrantih. Temu je sledil izračun koncentracije celic v celični suspenziji (Enačba 1).

Enačba 1: Izračun koncentracije celic v celični suspenziji

$$\frac{(A + B + C + D)}{N} \times 2 \times 10^4 \text{ celic/mL}$$

A, B, C, D ... število celic v posameznem preštetem kvadrantu

N ... število kvadrantov, ki smo jih prešteli (2 ali 4)

x 2 ... zaradi redčitve z barvilom tripan modro v razmerju 1:1

Po določitvi koncentracije celic v celični suspenziji smo nato izračunali potreben volumen pripravljene celične suspenzije za presajanje in nasajanje celic. Enačbi za izračun ustreznega volumna sta predstavljeni v podpoglavjih »Presajanje celic« in »Nasajanje celic«.

3.3.1.5 Presajanje celic

Pred vsakim presajanjem in nasajanjem celic je bilo najprej potrebno izvesti postopek tripsinizacije, v katerem smo celice obdelali s tripsinom. Tripsin je encim, ki povzroči, da se celice odlepijo od dna gojitvene posode. Celice so bile primerne za presaditev ali nasaditev, ko so dosegle 75–90-% razraščanost (pokritost gojitvene posode) (50). Ali je razraščanost celic za presaditev že dovolj visoka, smo preverili pod svetlobnim invertnim mikroskopom. V primeru dovolj visoke razraščanosti celic, smo izvedli njihovo tripsinizacijo. Za tripsinizacijo smo potrebovali:

- gojitveni medij,
- fosfatni pufer – PBS (Gibco, ZDA),
- 0,5-% tripsin-EDTA, brez fenol rdečega (Gibco, ZDA),
- barvilo tripan modro (Sigma, ZDA).

Pred pričetkom dela smo gojitveni medij segreli v vodni kopeli na približno 37 °C. V laminarju smo si pripravili vse potrebne reagente in pribor za delo. Pod mikroskopom smo pregledali morfologijo in preverili razraščanost celic.

Iz gojitvene posode smo najprej s pomočjo aspiratorja odstranili izrabljen gojitveni medij. Celice smo sprali z dodatkom 5 mL PBS, ki smo ga nato odstranili s pomočjo aspiratorja. Na ta način smo odstranili ves medij. S pipeto smo dodali 1 mL tripsina in premešali gojitveno posodo v smeri S-J-V-Z. Nato smo celice inkubirali 3–4 minute pri 37 °C v atmosferi s 5-% CO₂. Po inkubaciji smo pod mikroskopom preverili, če so se celice odlepile od dna gojitvene posode. Odlepljenim celicam smo dodali 5 mL svežega gojitvenega medija. S pipetiranjem smo dno gojitvene posode nekajkrat sprali z dodanim gojitvenim medijem. S tem smo zagotovili odstranitev večine celic iz dna posode. Po spiranju smo celotno celično suspenzijo iz gojitvene posode prenesli v 15 mL centrifugirko. Celično suspenzijo smo centrifugirali v centrifugi 4 minute pri 1000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo z aspiratorjem odstranili supernatant. V centrifugirko smo dodali 2 mL medija in z nekajkratnim pipetiranjem gor in dol razbili pelet iz celic. Nato smo dodali še dodatne 3–4 mL gojitvenega medija in vse skupaj premešali na vibracijskem mešalu. 80 µL tako pripravljene celične suspenzije smo predstavili v mikrocentrifugirko, ki smo ji dodali 80 µL barvila tripan modro. Vsebinsko mikrocentrifugirke smo premešali na vibracijskem mešalu. Tako pripravljeno mešanico smo uporabili za štetje celic na hemocitometru. Iz števila prešteti celic smo določili

koncentracijo celic v celični suspenziji. Postopek štetja celic in določitev koncentracije celic v celični suspenziji sta opisana v podpoglavju »Štetje celic«.

Na podlagi določene koncentracije smo nato izračunali volumen celične suspenzije, potreben za presaditev priporočenega števila celic (Enačba 2). Pri presajanju je bilo priporočeno presaditi $0,6\text{--}0,8 \times 10^6$ celic v novo gojitveno posodo.

Enačba 2: Izračun potrebnega volumna celične suspenzije pri presajanju

$$V = \frac{N}{c}$$

V ... volumen celične suspenzije, ki ga iščemo

N ... priporočeno število celic za presaditev ($0,6\text{--}0,8 \times 10^6$ celic)

c ... izračunana koncentracija celic v celični suspenziji po štetju le-teh

Novo gojitveno posodo smo najprej označili z vsemi potrebnimi informacijami: ime celične linije, pasaža in datum. V označeno gojitveno posodo smo s pomočjo serološke pipete in pipetorja vnesli 6–7 mL gojitvenega medija. Nato smo dodali še izračunan volumen celične suspenzije, da smo zagotovili ustrezno število celic (6×10^6). Po dodatku celic smo gojitveno posodo na rahlo premešali v smeri S-J-V-Z. Celice smo pred postavitvijo v inkubator preverili še pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Gojitvene posode s celicami smo hranili v inkubatorju pri temperaturi 37°C v atmosferi s 5-% CO_2 . Celična linija hER α -HeLa-9903 je zelo aktivna celična linija, zato smo morali celice ponovno tripsinizirati in presajati na 3–4 dni.

3.3.1.6 Nasajanje celic

Za izvedbo testa smo celice nasajali na bele mikrotitrne plošče NUNC s 96 vdolbinicami. Celice so bile primerne za izpostavitve preiskovanim spojinam in izvedbo testiranja, ko so v gojitveni posodi presegle 85-% razraščanost. Začetni del nasajanja celic je bil enak kot pri presajanju celic. Najprej smo celice preverili pod mikroskopom. Če sta bili morfologija in razraščanost celic ustrezni, smo izvedli tripsinizacijo celic, po postopku opisanem v podpoglavju »Presajanje celic«. Po tripsinizaciji smo zopet izvedli postopek štetja celic in določili koncentracijo celic v celični suspenziji. Nato smo izračunali potreben volumen začetne celične suspenzije za pripravo zadostne količine končne celične suspenzije za nasaditev na testno ploščico (Enačba 3). Koncentracija celic v končni celični suspenziji je bila 3×10^5 celic/mL.

Enačba 3: Izračun potrebnega volumna za pripravo celične suspenzije za nasaditev celic

$$V_z = \frac{V_k \times c_k}{c_z}$$

V_z ... volumen začetne celične suspenzije, dobljene po tripsinizaciji celic

c_z ... koncentracija celic v začetni celični suspenziji

V_k ... volumen končne celične suspenzije, potreben za nanos celic v vse vdolbinice na mikrotitrski ploščici (dobili smo ga tako, da smo število vdolbinic pomnožili s 100 μL (volumen celične suspenzije v eni vdolbinici) in prišteli dodatne 3 mL za rezervo zaradi izgub)

c_k ... koncentracija celic v končni celični suspenziji (3×10^5 celic/mL), ki smo jo nasajali na ploščico

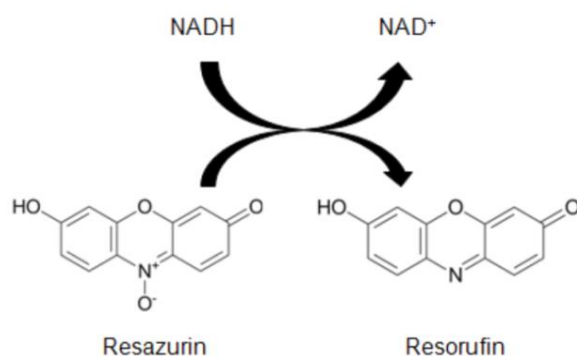
Izračunan volumen celične suspenzije smo prenesli v novo centrifugirko. Zraven smo dodali ustrezno količino gojitvenega medija. Na ta način smo celično suspenzijo razredčili do zelenega končnega volumna s koncentracijo celic 3×10^5 celic/mL. Celično suspenzijo smo pred nanosom na ploščico na hitro premešali na vibracijskem mešalniku. S pomočjo avtomatske multikanalne pipete (Biohit, Helsinki, Finska) smo v vsako izmed vdolbinic na mikrotitrski ploščici prenesli 100 μL homogene celične suspenzije. Gostota nasajenih celic na ploščici je bila 3×10^4 celic/(100 μL x vdolbinica). Nasajene celice smo inkubirali 3 ure pri temperaturi 37°C v atmosferi s 5-% CO_2 . Po tem času smo k celicam na ploščici dodali pripravljene raztopine testiranih spojin in kontrol.

3.3.1.7 Dodajanje spojin na mikrotitrsko ploščico

Testirane spojine smo na mikrotitrsko ploščico nanašali v izbranih koncentracijah (Preglednica II), ki smo jih pripravili v času inkubacije nasajenih celic. Postopek priprave vzorcev testiranih spojin za nanos na ploščico je opisan v podpoglavju »Priprava vzorcev testiranih spojin«. Spojine smo na testno ploščico nanašali s pomočjo avtomatske multikanalne pipete. Vedno smo za vsako kontrolo in vzorec testirane spojine naredili 3 paralelke (tehnične replikate). To pomeni, da smo isti vzorec nanесли v 3 vdolbinice na testni ploščici. Na ta način smo lažje spremljali ponovljivost rezultatov. Mikrotitrške ploščice z dodanimi spojinami smo inkubirali 24 ur pri 37°C v atmosferi s 5-% CO_2 . Po inkubaciji smo naredili test citotoksičnosti in luciferazni test.

3.3.2 Določanje citotoksičnosti z resazurinom

Citotoksičnost testiranih spojin, s katerimi smo tretirali celice, smo določali z merjenjem celične viabilnosti (število metabolno aktivnih celic). Gre za fluorimetrični test, v katerem se kot reagent uporablja resazurin (Resazurin sodium salt (Sigma, ZDA)). Resazurin je barvilo za določanje živosti celic in služi kot substrat v reakciji, ki nam pokaže, ali je metabolna aktivnost celic ohranjena ali ne. Preživele celice ostanejo metabolno aktivne in povzročijo redukcijo barvila resazurin do resorufina, ki fluorescira pri 590 nm (Slika 1). Mrtve celice te sposobnosti nimajo, saj niso metabolno aktivne. Intenziteta izmerjene fluorescence pri 590 nm nam pove količino nastalega produkta, le ta pa je sorazmerna številu metabolno aktivnih celic. Pri določanju citotoksičnosti smo upoštevali pravilo, ki pravi, da je spojina citotoksična takrat, kadar je celična viabilnost <80 % (54).



Slika 1: *Struktura resazurina in roza fluorescenčnega resorufina, ki nastane zaradi redukcije resazurina v živih, metabolno aktivnih celicah (54).*

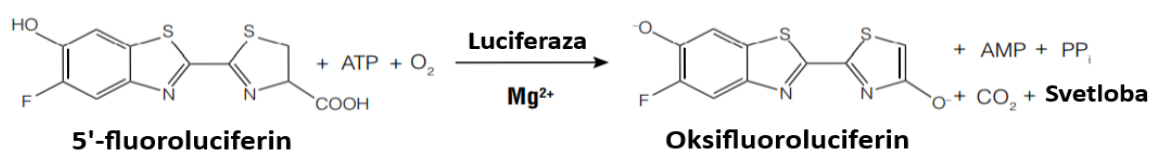
Uporabljali smo resazurin v obliki natrijeve soli, zato smo ga morali pred testom raztopiti v PBS. Najprej smo v mikrocentrifugirki pripravili raztopino resazurina s koncentracijo 40 mM, ki smo jo nato naprej s PBS razredčili do koncentracije 400 μ M. Barvilo resazurin je občutljivo na svetlobo, zato smo mikrocentrifugirko s pripravljeno raztopino resazurina zavili v aluminijasto folijo, pri delu pa v LAF komori nismo prižgali luči. Po 21,5 urni inkubaciji celic s testiranimi spojinami ali brez njih smo s pomočjo avtomatske multikanalne pipete v vsako izmed luknjic dodali 10 μ L 400 μ M raztopine resazurina. Takoj po dodatku resazurina smo s čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader (Bio Tek, USA) izmerili fluorescenco ozadja pri $\lambda_{ex}=530$ nm in $\lambda_{em}=590$ nm. Na ta način smo preverili, če katera uporabljena spojina oziroma reagent že sam po sebi fluorescira. Po izmerjeni fluorescenci ozadja smo mikrotitrške ploščice zavili v aluminijasto folijo in jih inkubirali 2,5 ure pri temperaturi 37 °C v atmosferi s 5-% CO₂. Po

koncu inkubacije (24 ur po tretiranju s spojinami) smo vzeli mikrotitrne ploščice iz inkubatorja in ponovno izmerili fluorescenco pri $\lambda_{ex}=530$ nm in $\lambda_{em}=590$ nm. Pri izračunavanju celične viabilnosti smo od dobljenih vrednosti odšteli slepi vzorec (samo gojitveni medij, brez celic), ki je predstavljal fluorescenco ozadja. Vse vrednosti smo nato normalizirali glede na 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju pri agonističnem testiranju oziroma glede na 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju z dodanim 25 pM E2 pri antagonističnem testiranju. Po merjenju fluorescence smo naredili lizo celic in nato še luciferazni test.

3.3.3 Luciferazni test

24 ur po tretiranju celic s testiranimi spojinami smo najprej naredili njihovo lizo. Liza celic je potrebna, da v nadaljevanju v luciferaznem testu omogočimo dostop substrata luciferina do nastalega encima luciferaze v notranjosti celic. Za lizo celic smo potrebovali lizirni puffer Luciferase Cell Culture Lysis 5x Reagent (CCLR (Promega, ZDA)). Najprej smo s pomočjo aspiratorja odstranili ves medij iz luknjic mikrotitrne ploščice. Nato smo luknjice sprali s PBS, tako da smo v vsako izmed luknjic s pomočjo multikanalne pipete dodali 100 μ L PBS. Dodan PBS smo odstranili s pomočjo aspiratorja. Po spiranju s PBS smo s pomočjo multikanalne pipete v vsako izmed luknjic s celicami dodali po 20 μ L lizirnega pufra in inkubirali 5 min. Po končani inkubaciji smo lahko izvedli luciferazni test.

S pomočjo luciferaznega testa smo določali agonistično oz. antagonistično delovanje preiskovanih spojin na človeški estrogenski receptor α (ER α). Merili smo jakost nastale luminiscence, s čimer smo zaznali z ER α posredovano transkripcijsko aktivnost. V primeru vezave liganda (preiskovana spojina) na ER α se tvori kompleks receptor-ligand, ki preide v jedro celice. Tam se veže na specifičen odzivni element DNA in s tem povzroči transaktivacijo reporterskega gena za kresničkino luciferazo. To se odraža v povečani celični ekspresiji encima luciferaze. Luciferaza je encim, ki pretvarja substrat luciferin v bioluminiscenčni produkt, ki ga lahko kvantitativno izmerimo s pomočjo luminometra (50). Reakcija pretvorbe je predstavljena na Sliki 2.



Slika 2: Reakcija, ki jo ob prisotnost Mg^{2+} , kisika in ATP katalizira nastala luciferaza po dodatku reagenta ONE-GloTM. V reakciji pride do pretvorbe substrata 5'-fluoroluciferina

do oksifluoroluciferina. Pri tem se tvori svetloba (luminiscenca), katere jakost izmerimo. Večja kot je aktivnost luciferaze več produkta bo nastalo in večja bo jakost luminiscence. Jakost luminiscence torej odraža aktivnost luciferaze.

Za izvedbo luciferaznega testa smo uporabljali reagent ONE-Glo™, ki smo ga pripravili s pomočjo vsebine kompleta ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, ZDA). Komplet vsebuje stekleničko z luciferaznim analiznim pufrom ONE-Glo™ in stekleničko z luciferaznim analiznim substratom ONE-Glo™ (5'-fluoroluciferin). Reagent ONE-Glo™ smo pripravili tako, da smo pufer dodali v stekleničko s substratom in z obračanjem dobro premešali, tako da se je ves substrat stopil. Pripravljen reagent smo hranili v več 15 mL centrifugirkah pri -80°C , s čimer smo preprečili izgubo luminiscence in ohranili njegovo funkcionalnost.

Dve uri pred luciferaznim testom smo vzeli potrebno količino One-Glo™ reagenta iz zamrzovalnika, ga zavili v aluminijasto folijo (zaščita pred svetlobo in s tem izgubo luminiscence) in ga postavili na sobno T, da se je do izvedbe testa odtajal. Po izvedeni lizi celic smo s pomočjo multikanalne pipete v vsako zmed luknjic na mikrotitrski plošči, kjer smo predhodno izmerili viabilnost nad 80 %, dodali 25 μL reagenta ONE-Glo™. Takoj po dodatku reagenta smo s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic BioTek Synergy HT izmerili nastalo luminiscenco.

Vse preiskovane spojine smo v izhodišču testirali pri njihovi najvišji necitotoksični koncentraciji in pri koncentracijah 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM in 10 pM. Na ta način smo na začetku dobili nek pregled učinka preiskovanih spojin skozi širše koncentracijsko območje. Po potrebi smo v nadaljevanju dodatno testirali še vmesne koncentracije, zaradi lažje in bolj natančne interpretacije rezultatov. Pri izvedbi testiranja smo uporabljali tudi kontrole, ki so služile za potrditev pravilne izvedbe našega dela. Kot kontrolo topila smo uporabljali 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju. Kot pozitivni kontroli smo uporabljali 1 nM E2, ki poveča aktivnost luciferaze (agonist na $\text{ER}\alpha$), ter 1 μM H-TAM, ki zniža aktivnost luciferaze (antagonist na $\text{ER}\alpha$). Pri antagonističnem testu smo uporabljali tudi »spike-in« kontrolo (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju z dodatkom 25 pM E2), ki je predstavljala povečanje aktivnost luciferaze po dodatku agonista E2 s koncentracijo 25 pM in je služila za interpretacijo rezultatov.

Pri testiranju agonističnega delovanja smo celice izpostavili samo preiskovanim spojinam. V primeru, da se je preiskovana spojina vezala na $\text{ER}\alpha$ in spodbudila transkripcijsko

aktivnost, smo zaznali povečanje aktivnosti luciferaze. Morebiten agonističen učinek smo tako določali posredno z neposrednim merjenjem aktivnosti luciferaze. Pri testiranju antagonističnega delovanja pa smo celice izpostavili preiskovanim spojinam z dodanim 25 pM E2. Preiskovana spojina in 25 pM E2 sta med seboj tekmovala za vezavo na ER α . Če smo zaznali znižanje aktivnosti luciferaze glede na »spike-in« kontrolo, potem je to pomenilo, da je prišlo do vezave preiskovane spojine, ki je delovala antagonistično. Antagonističen učinek preiskovanih spojin smo torej določali posredno preko zmanjšanja agonističnega učinka 25 pM E2 na aktivnost luciferaze.

3.3.4 Statistična analiza podatkov

Rezultate meritev smo prenesli v računalniški program Microsoft Excel, kjer smo jih statistično obdelali. Obdelane rezultate smo prenesli v računalniški program GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, CA, ZDA), kjer smo jih grafično prikazali in izračunali statistično značilnost. Rezultate prve meritve (pregledni graf) smo na grafu prikazali kot povprečno vrednost treh tehničnih replikatov, končne rezultate celotnega testiranja pa kot povprečno vrednost najmanj dveh ponovljivih neodvisnih meritev – bioloških ponovitev. Meritvi sta bili ponovljivi, če je relativna standardna deviacija (RSD) znašala <20 %. Vsako novo meritev smo izvedli na novi pasaži celic.

Dobljene rezultate meritev smo najprej normalizirali glede na izmerjeno viabilnost. Pri agonističnem testiranju smo jih nato normalizirali glede na kontrolo topila (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju) in glede na pozitivno kontrolo (1 nM E2), pri antagonističnem testiranju pa glede na »spike-in« kontrolo (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju s 25 pM E2). Pri tem smo izbrali, da vrednost kontrole, glede na katero smo normalizirali rezultate, predstavlja 100 %. Po normalizaciji smo izračunali povprečno vrednost, standardno deviacijo (SD) in RSD tehničnih replikatov. RSD med tehničnimi replikati ni smela presežati 20 %. Po zaključku celotnega testiranja smo za vsako testirano koncentracijo preiskovanih spojin izračunali še povprečno vrednost, SD in RSD vseh bioloških ponovitev. Obdelane rezultate preiskovanih spojin in kontrole smo primerjali s pomočjo enostranske ANOVE in Dunnetovega več primerjalnega testa. Odstopanja od kontrole so bila statistično značilna, kadar je bila verjetnost, da sta vzorec in kontrola enaka, manjša od 5 % (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Povprečne vrednosti tehničnih replikatov in več bioloških ponovitev smo na grafu prikazali skupaj z njihovo SD in zraven označili tudi statistično značilnost.

4 REZULATI IN RAZPRAVA

4.1 Napoved vezave s programom Endocrine Disruptome

Pred samo izvedbo raziskave smo s pomočjo spletnega programa Endocrine Disruptome za posamezne farmacevtske učinkovine pridobili rezultate napovedi njihove vezave na estrogenski receptor. Za vsako izmed spojin smo napoved večkrat ponovili, saj program ne da vedno identičnih rezultatov za isto spojino, ampak lahko pride do majhnih razlik v napovedi. Za klonazepam, lorazepam, mianserinijev klorid in sertralinijev klorid je program napovedal visoko verjetnost vezave in agonističnega ali antagonističnega delovanja na ER α ali ER β . V Preglednici III so povzeti ključni rezultati napovedi vezave, ki smo jih pridobili s programom Endocrine Disruptome. V Preglednici IV je za vsako izmed preiskovanih spojin prikazan primer celotnih rezultatov napovedi, pridobljenih s programom Endocrine Disruptome.

Preglednica III: Ključni rezultati napovedi vezave, pridobljeni s programom Endocrine Disruptome. Za vsako izmed izbranih učinkovin je naveden receptor, na katerega je bila napovedana visoka verjetnost vezave in pa napovedan učinek, ki ga bi naj nanj imela (AGO - agonizem, ANT - antagonizem).

Anksiolitik	Napoved visoke verjetnosti vezave (»rdeč« razred) na	Napoved učinka na receptor
Mianserin	ER β	AGO
Klonazepam	ER β	ANT
Lorazepam	ER β	AGO
Sertralin	ER α	AGO

Preglednica IV: Primer celotnih rezultatov napovedi vezave na človeške jedrne receptorje za vsako izmed preiskovanih spojin, pridobljenih s programom Endocrine Disruptome. Rdeča - visoka verjetnost vezave, oranžna in rumena - srednja verjetnost vezave, zelena - majhna verjetnost vezave. AR - androgeni receptor, ER α - estrogenski receptor α , ER β - estrogenski receptor β , GR - glukokortikoidni receptor, LXR α - jetrni receptor X α , LXR β - jetrni receptor X β , PPAR α - receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov α , PPAR β - receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov β , PPAR γ - receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov γ , RXR α - retinoidni receptor X α , TR α - receptor tiroidnega hormona α , TR β - receptor tiroidnega hormona β (48).

ENDOKRINI RECEPTOR	PREISKOVANE UČINKOVINE			
	Mianserin	Klonazepam	Lorazepam	Sertralin
AR	-7.0	-2.3	-4.1	-6.3
AR - ant.	-8.1	-6.8	-8.0	-7.6
ER α	-9.3	-8.6	-9.0	-9.5
ER α - ant.	-8.4	-8.7	-8.5	-8.7
ER β	-9.5	-8.9	-9.4	-9.0
ER β - ant.	-8.7	-9.3	-8.8	-8.5
GR	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2
GR - ant.	-7.9	-8.5	-8.5	-8.5
LXR α	-9.4	-9.4	-10.1	-9.6
LXR β	-9.4	-8.4	-8.4	-9.6
PPAR α	-7.9	-8.6	-8.7	-8.5
PPAR β	-7.9	-8.1	-8.3	-9.0
PPAR γ	-9.3	-7.7	-7.3	-7.8
RXR α	-9.4	-8.6	-8.4	-9.5
TR α	-7.8	-6.5	-7.9	-8.3
TR β	-7.7	-8.1	-8.0	-9.5

Na podlagi teh rezultatov napovedi smo se odločili, da ovrednotimo učinek klonazepama, lorazepama, mianserinijevega klorida in sertralinijevega klorida na estrogenski receptor. V raziskavi smo vrednotili učinek izbranih spojin samo na estrogenski receptor α , ne pa tudi na estrogenski receptor β , saj nam to uporabljena celična linija ni omogočala.

4.2 Izbrane spojine kot potencialni hormonski motilci

Nobene izmed izbranih preiskovanih spojin, ki smo jih testirali, ne najdemo na TEDX (The endocrine disruption exchange) seznamu potencialnih hormonskih motilcev in na seznamih hormonskih motilcev ali potencialnih hormonskih motilcev Evropske komisije za okolje (55,56). Kljub temu pa so bile tekom let opravljene različne raziskave, v katerih so preverjali njihov vpliv na delovanje endokrinega sistema.

Khadem-Ansari et al. (57) so v svoji študiji na podganah preverjali vpliv klonazepama in lorazepama na tiroglobulin (Tg), antitiroglobulin (aTg), antitiroidno peroksidazo (aTPO) in ščitnico spodbujajoči hormon (TSH). 18 samcev podgan so naključno razdelili v 3 skupine: kontrolna skupina, z lorazepamom tretirana skupina in s klonazepamom tretirana skupina. Po 4 tednih so primerjali spremembe v ravni Tg, aTg, aTPO in TSH. Raven Tg in aTg se je pri podganah, ki so bile tretirane s klonazepamom in lorazepamom, signifikantno povežala v primerjavi s kontrolno skupino. V ravni TSH in aTPO ni bilo signifikantnih razlik med

skupinami. Na podlagi teh rezultatov so sklepali, da lorazepam in klonazepam vplivata na ščitnico (57).

Chevassus et al. (58) so v svoji študiji na zdravih prostovoljcih preiskovali učinke diazepam in klonazepam na delovanje β celic, občutljivost na inzulin in učinkovitost glukoze. Dobljeni rezultati so pokazali, da lahko benzodiazepini, zlasti klonazepam, spremenijo sekrecijo inzulina in občutljivost za inzulin v zdravih prostovoljcih po enkratni administraciji (58).

Männistö et al. (59) so v svoji študiji določali učinke centralnih in perifernih benzodiazepinov na rastni hormon in sekrecijo gonadotropina v samcih podgan. Rezultati raziskave so pokazali, da so bili akutni učinki benzodiazepinskih ligandov na raven rastnega hormona, luteinizirajočega hormona in folikle stimulirajočega hormona v serumu samcev podgan majhni in bi zato težko napovedali kakršne koli večje klinične posledice. Klonazepam je v zmernih odmerkih povečal raven rastnega hormona, medtem ko ta učinek pri višjih odmerkih ni bil opažen. Prav tako je pri nižjih odmerkih povzročil povečanje koncentracij luteinizirajočega hormona, pri višjih pa ne. Na koncentracijo folikle stimulirajočega hormona ni vplival (59).

Van der Ven et al. (60) so v svoji študiji preiskovali učinke mianserina v zebričah in sicer so določali molekulske markerje endokrine disrupcije. Ugotovitve študije so jasno pokazale estrogensko aktivnost mianserina v vodnem okolju. Analiza ekspresije genov v možganskih in gonadnih tkivih je na podlagi indukcij molekulskih biomarkerjev estrogenosti pokazala estrogensko aktivnost mianserina in njegov učinek, da zmoti normalno endokrino (estrogensko) signaliziranje (60).

Pop et al. (61) so v svoji študiji preučevali agonističen/antagonističen učinek izbranih SSRI (fluvoksamina, sertralina in paroksetina) na estrogensko delovanje. *In vitro* (anti)estrogensko aktivnost so ocenili z uporabo konstrukta reporterja kresničkine luciferaze v T47D-KBluc celični liniji raka dojke. Te celice izražajo jedrne ER, ki lahko, v primeru vezave agonista na ER, aktivirajo transkripcijo luciferaznega reporterskega gena. Za vse tri spojine je bilo ugotovljeno, da se vežejo na ER. Sertralin je pri nižjih koncentracijah (0,1 μ M) izražal šibek estrogenski učinek, pri višjih (10 μ M) pa antiestrogenski učinek. Povečal je tudi z estradiolom posredovano transkripcijsko aktivnost. Rezultati študije so torej pokazali, da obstaja možnost interakcije sertralina in ostalih SSRI z ER (61).

4.3 Okoljske in plazemske koncentracije preiskovanih spojin

Zdravila, ki se uporabljajo v humani medicini in veterini, se na koncu pogosto - v nespremenjeni obliki ali v obliki aktivnih/neaktivnih metabolitov - znajdejo v okolju. Ker se njihova uporaba povečuje, se povečuje tudi njihova prisotnost v okolju. Obstajajo trije glavni načini pojava zdravil v okolju. Največ se jih znajde v okolju z izločanjem z urinom ali blatom iz ljudi oziroma živali, ki so le-ta zaužili. Drugi način je njihovo napačno odstranjevanje, s tem ko ljudje neporabljena in pretečena zdravila odvržejo v odtok ali stranišče. V obeh primerih se zdravila znajdejo v odpadni vodi, iz katere pa jih čistilne naprave nato ne odstranijo. Izkazalo se je tudi, da nekateri proizvodnji obrati sproščajo aktivne substance v bližnje vodne poti, zaradi česar pride do lokaliziranih farmacevtski onesnaženj (62). Po vstopu zdravilnih učinkovin ali njihovih metabolitov v okolje so lahko njihovim učinkom izpostavljena vsa živa bitja, ki v tem okolju živijo in imajo identične ali podobne tarčne celice in organe (5).

V zadnjem desetletju so bile izvedene in objavljene številne raziskave, v katerih so poročali o zaznavni prisotnosti zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov v okolju. Sledove zdravil so našli v površinskih vodah, odpadnih vodah, podtalnicah in v manjši meri celo v pitni vodi. V večini primerov so bile zaznane spojine prisotne v ng do nizkem µg območju na liter (5,63). *Ferreira* (64) je v svoji študiji ocenjeval prisotnost farmacevtskih učinkovin v vodi, namenjeni za javno oskrbo v občinski regiji Rio de Janeiro, Brazilija. Študija je razkrila prisotnost derivatov benzodiazepina v vseh vzorcih površinske vode reke Guandu. Koncentracija klonazepama je znašala 198 ng/L (6,27 nmol/L) (64). *Valcárcel et al.* (65) so preiskovali prisotnost zdravil, ki se zlorabljajo, in njihovih presnovkov v površinskih vodah iz reke Tagus na poti skozi provinco Toledo ter v pitnih vodah dveh bližnjih mest. Koncentracija lorazepama v različnih vzorcih površinske vode je znašala od 21,9 ng/L do 39,8 ng/L (68,2 – 123,9 pmol/L). V vzorcih pitne vode ga niso zaznali (65). *Giebułtowicz et al.* (66) so v svoji študiji ugotavljali prisotnost različnih antidepresivov v glavni poljski reki Visli, reki Utrati in tudi v vzorcih vode iz pipe v Varšavi. Ob prvi meritvi v vzorcu vode iz pipe niso zaznali mianserina in sertralina, ob drugi meritvi pa so. Izmerjena koncentracija mianserina v drugi meritvi je znašala do 0,9 ng/L, sertralina pa <3,1 ng/L (meja kvantifikacije za sertralin) (66).

Kot je že omenjeno v opisu farmakokinetike preiskovanih spojin v poglavju »Uvod«, se plazemske koncentracije klonazepama, lorazepama in mianserinijevega klorida ob

terapevtski uporabi nahajajo v območju 100–200 nM, sertralina pa v območju okoli 500 nM. V Preglednici V so navedene C_{\max} preiskovanih spojin pri izbranem odmerku, ki so bile določene v študijah njihove farmakokinetike.

Preglednica V: *Maksimalna izmerjena plazemska/serumska/krvna koncentracija preiskovanih spojin pri izbranem odmerku spojine. Pri vseh spojinah, razen sertralinijevega kloridu, so izvedli meritev maksimalne koncentracije po enem odmerku. V primeru sertralinijevega klorida so meritev maksimalne plazemske koncentracije izvedli po več 1x dnevnih odmerkih.*

Zdravilna učinkovina	C_{\max} [nmol/L]	Odmerek
Mianserinijev klorid (38)	216,1 (kri)	60 mg (1x p.o.)
Klonazepam (26)	47,2 (plazma)	2 mg (1x p.o.)
Lorazepam (29)	149,5 (serum)	4 mg (1x i.m.)
Sertralin (43)	620,45 (plazma)	200 mg v obliki 223,8 mg sertralinijevega klorida (1x p.o.)

Na podlagi najdenih podatkov o plazemskih in okoljskih koncentracijah preiskovanih spojin smo izbrali ustrezno območje koncentracij za testiranje. Vse izbrane spojine smo testirali v koncentracijskem območju od 10 pM (najnižja testirana koncentracija) do 100 μ M oziroma njihove najvišje necitotoksične koncentracije.

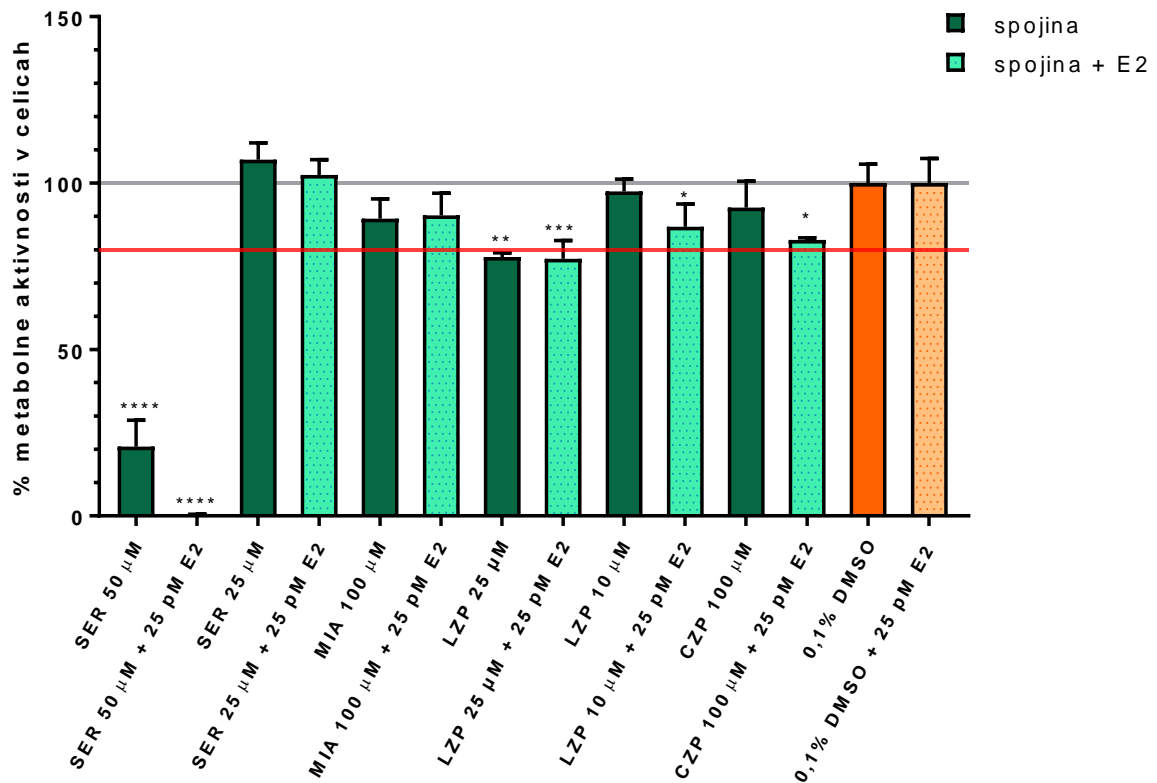
4.4 Testiranje citotoksičnosti

Z merjenjem celične viabilnosti smo želeli določiti, pri katerih koncentracijah testirane spojine na celice ne delujejo toksično. Test smo izvedli po postopku opisanem v poglavju »Materiali in metode - Test citotoksičnosti z resazurinom«. Vse spojine smo najprej testirali pri osmih koncentracijah, in sicer 100 μ M (najvišja testirana koncentracija), 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM in 10 pM (najnižja testirana koncentracija). Ustrezne koncentracije preiskovanih spojin smo pripravili po postopku opisanem v poglavju »Materiali in metode - Priprava vzorcev testiranih spojin«. Koncentracij višjih od 100 μ M zaradi obarjanja v mediju nismo mogli testirati in jih niti ne bi bilo smiselno testirati, saj bi bile to nerealne izpostavitve za človeka. Pri spojinah, ki so se pri višjih koncentracijah izkazale za toksične, smo testirali tudi vmesne koncentracije 75 μ M, 50 μ M in 25 μ M. Na ta način smo bolj natančno določili najnižjo citotoksično in najvišjo necitotoksično koncentracijo.

Citotoksično delovanje spojin na celično linijo hER α -HeLa-9903 smo preverjali na dva načina. Najprej smo testirali toksičnost samih preiskovanih spojin, nato pa smo testirali še toksičnost preiskovanih spojin, ki smo jim dodali 25 pM E2. S tem smo preverili, ali prisotnost β -estradiola (E2), ki se ga dodaja k spojinam pri antagonističnem testiranju, vpliva na celično viabilnost.

Citotoksičnost preiskovanih spojin smo določili tako, da smo dobljene vrednosti normalizirali glede na kontrolo. Kontrolo za agonistično ploščico je predstavljal 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju, kontrolo za antagonistično ploščico pa 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju z dodanim 25 pM E2. Pri določanju citotoksičnosti smo se držali pravila, ki pravi, da je spojina citotoksična takrat, kadar metabolna aktivnost celic, tretiranih z izbrano spojino, pade pod 80 %. Če se je spojina pri določeni koncentraciji izkazala za citotoksično, potem pri tej koncentraciji ni bila primerna za nadaljnjo testiranje. Naš namen je bil torej določiti najvišjo koncentracijo, pri kateri spojina na celice ni delovala toksično. Določena najvišja necitotoksična koncentracija je v nadaljevanju pri luciferaznem testu predstavljala zgornjo mejo testiranega koncentracijskega območja za izbrano spojino. Določena celična viabilnost pri najnižji citotoksični koncentraciji in najvišji necitotoksični koncentraciji za spojine brez in z dodanim E2 so prikazane na Sliki 3.

Test citotoksičnosti



Slika 3: Rezultati testa citotoksičnosti najnižje izmerjene citotoksične koncentracije in prve necitotoksične koncentracije preiskovanih spojin. Za mianserin HCl in klonazepam je prikazana samo prva necitotoksična koncentracija (100 µM), ker je bila le-ta enaka najvišji merjeni koncentraciji. Podane so povprečne vrednosti metabolne aktivnosti celic glede na kontrolo, ki je označena s sivo črto. Kontrolo za same spojine (agonistično testiranje) je predstavljal 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju (% ± SD), za spojine z dodanim 25 pM E2 (antagonistično testiranje) pa 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju z dodanim 25 pM E2 (% ± SD). Rdeča črta označuje spodnjo mejo (80 %) metabolne aktivnosti celic, ki je še primerna za nadaljnje testiranje. Statistična značilnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

V našem primeru sta se na podlagi rezultatov testiranja za citotoksični spojin izkazala LZP in SER. LZP se je izkazal za citotoksičnega pri koncentracijah 100 µM, 75 µM, 50 µM in 25 µM. Celična viabilnost je bila pri teh koncentracijah same spojine (brez dodanega E2) zmanjšana na 53 %, 58 %, 77 % in 78 %. Iz rezultatov je razvidno, da višja kot je bila koncentracija spojine, bolj je bila le-ta toksična za celice. Pri testiranju 25 µM LZP z dodanim E2 je bila celična viabilnost 77 %, kar je približno enako kot pri testiranju 25 µM

LZP brez dodanega E2. Prva necitotoksična in s tem za nadaljnje testiranje primerna koncentracija je bila v obeh primerih (brez in z dodanim E2) šele 10 μM . Pri koncentraciji 10 μM je celična viabilnost za sam LZP znašala 98 %, za LZP z dodanim E2 pa 87 %.

SER se je izkazal za citotoksičnega pri koncentracijah 100 μM , 75 μM in 50 μM . Celična viabilnost je pri teh koncentracijah spojine (brez dodanega E2) znašala 0 %, 0,3 % in 20 %. Iz rezultatov je razvidno, da je pri koncentracijah 100 μM in 75 μM SER zelo toksičen, saj praktično ne preživi nobena celica. Pri testiranju 50 μM SER z dodanim E2 je bila celična viabilnost 0,4 %, kar je nižje kot pri 50 μM SER brez dodanega E2. Za prvo necitotoksično koncentracijo, ki je bila primerna za nadaljnje testiranje, se je v obeh primerih (brez in z dodanim E2) izkazala koncentracija 25 μM . Pri tej koncentraciji je celična viabilnost za sam SER znašala 107 %, za SER z dodanim E2 pa 102 %. Pri tej koncentraciji se je izkazalo, da je bila celična viabilnost celo malenkost višja od kontrole (0,1-% DMSO oz. 0,1-% DMSO z dodanim E2).

Za CZP in MIA se je iz pridobljenih rezultatov testiranja celične citotoksičnosti izkazalo, da že pri najvišji testirani koncentraciji (100 μM) nista toksična za celice celične linije hER α -HeLa-9903. Iz rezultatov je tudi razvidno, da dodatek 25 pM E2 k preiskovanim spojinam ne vpliva bistveno na viabilnost celic omenjene celične linije. Rezultati se v obeh primerih sicer med seboj malo razlikujejo, a ta razlika ni tolikšna, da bi vplivala na določitev najvišje necitotoksične koncentracije preiskovane spojine.

4.5 Določanje učinka preiskovanih spojin na estrogenski receptor α

Učinek preiskovanih spojin CZP, LZP, MIA in SER na estrogenski receptor α smo določali s pomočjo luciferaznega testa. Postopek izvedbe testa je opisan v poglavju »Materiali in metode - Luciferazni test«. Pozitivna kontrola za agonistično testiranje je bila raztopina 1 nM E2, kontrola za antagonistično testiranje pa raztopina 1 μM H-TAM. Za vse spojine smo najprej izvedli informativni luciferazni test za agonistično in antagonistično delovanje skozi širše koncentracijsko območje. Na podlagi rezultatov informativnega testa smo se nato odločili, pri katerih koncentracijah spojin je smiselno izvesti več bioloških ponovitev in ali je potrebno kje testirati še vmesne koncentracije, ki jih prvotno nismo.

Agonističen učinek preiskovanih spojin na celični liniji hER α -HeLa-9903 smo določali posredno z neposrednim merjenjem povečanja aktivnosti luciferaze, ki je odražala relativno transkripcijsko aktivnost (RTA) luciferaznega reporterskega gena v celicah. Zanimalo nas je, ali sploh pride do povečanja aktivnosti luciferaze v celicah in kolikšno je

to povečanje. Dobljene rezultate testiranja smo zaradi dveh različnih načinov interpretacije normalizirali na dva načia, in sicer glede na pozitivno kontrolo (1 nM E2) in glede na 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju. Rezultate za agonistični test smo interpretirali po naslednjih dveh kriterijih:

1. poseben kriterij iz smernic OECD 445 za celično linijo hER α -HeLa-9903

Dobljene rezultate testiranja za interpretacijo po tem kriteriju smo normalizirali glede na pozitivno kontrolo (1 nM E2). Ta kriterij pravi, da spojina izraža pri določeni koncentraciji agonističen učinek, če je maksimalen odziv, ki ga sproži pri tej koncentraciji, ≥ 10 % odziva pozitivne kontrole (1 nM E2) v vsaj 2/2 oz. 2/3 bioloških ponovitvah. Mejna vrednost za pozitiven rezultat je torej 10 %, kar predstavlja 10 % odziva pozitivne kontrole (50).

2. splošen kriterij za celične linije

Dobljene rezultate testiranja za interpretacijo po splošnem kriteriju smo normalizirali glede na 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju. Ta kriterij pravi, da spojina izraža pri določeni koncentraciji agonističen učinek, če je odziv pri tej koncentraciji za ≥ 30 % večji od odziva kontrole topila (100 % odziv) v vsaj 2/2 oz. 2/3 bioloških ponovitvah. Mejna vrednost za pozitiven rezultat je torej 130 %.

Kontrolo topila je v našem primeru predstavljal 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju.

Zaradi lažje in bolj pregledne ponazoritve rezultatov na grafu so v nadaljevanju predstavljeni rezultati agonističnega testiranja interpretirani na podlagi splošnega kriterija za celične linije. Ugotovitve, do katerih smo prišli na podlagi 1. in 2. kriterija, se, razen v primeru 25 μ M SER, med seboj niso razlikovale. Zaradi različnega izida interpretacije je pri rezultatih agonističnega testa za 25 μ M SER predstavljen tudi rezultat pridobljen na podlagi kriterija, ki je zapisan v smernicah OECD 445.

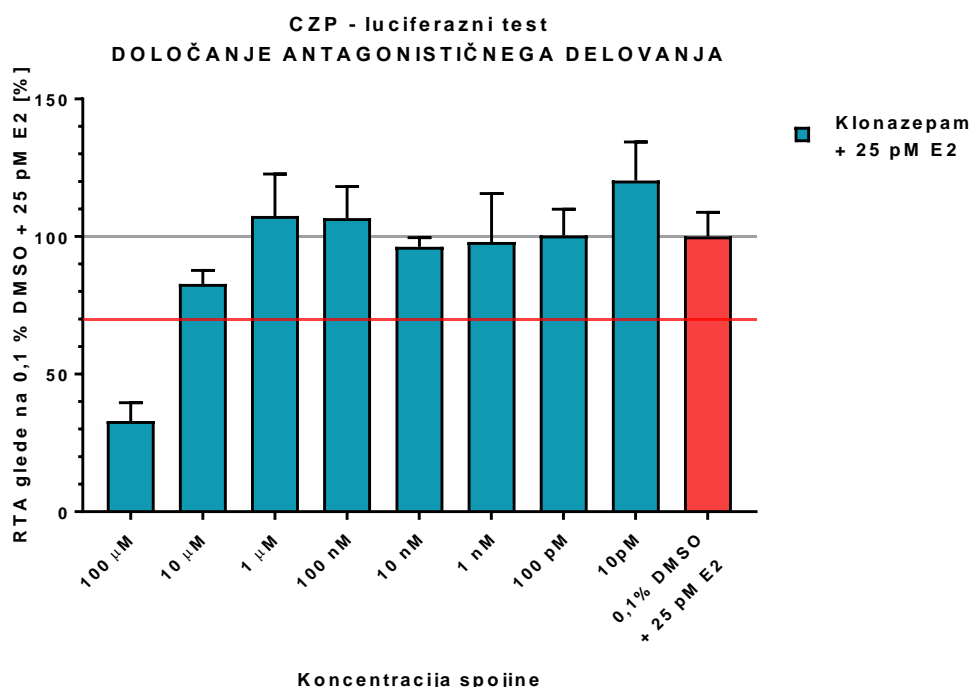
Antagonistični učinek preiskovanih spojin pa smo določali posredno, preko zmanjšanja aktivnosti luciferaze (posledica zmanjšanja RTA luciferaznega reporterskega gena) ob dodatku agonista E2 (25 pM). Dobljene rezultate testiranja smo normalizirali glede na 0,1-% DMSO v gojitvenem mediju z dodanim 25 pM E2 (»spike-in« kontrola). Rezultate smo interpretirali glede na kriterij iz smernic OECD 445 za celično linijo hER α -HeLa-9903. Spojina deluje pri določeni koncentraciji antagonistično, če povzroči ≥ 30 % nižji odziv od odziva »spike-in« kontrole (100 % odziv) v vsaj 2/2 oz. 2/3 bioloških ponovitvah. Spojina je torej antagonist, če lahko zanjo v vsaj 2/2 oz. 2/3 bioloških ponovitvah izračunamo IC₃₀

(inhibitorna koncentracija, pri kateri preiskovana spojina povzroči za 30 % nižji odziv od kontrole).

4.5.1 Klonazepam

CZP se je v naših testiranjih izkazal kot mogoč antagonist. Bil je edini izmed vseh štirih preiskovanih spojin, ki je pri določenih koncentracijah povzročil znižanje luciferazne aktivnosti za več kot 30 %. Zanj smo lahko izračunali tudi inhibitorno koncentracijo IC_{50} , ki je znašala 58,51 μM .

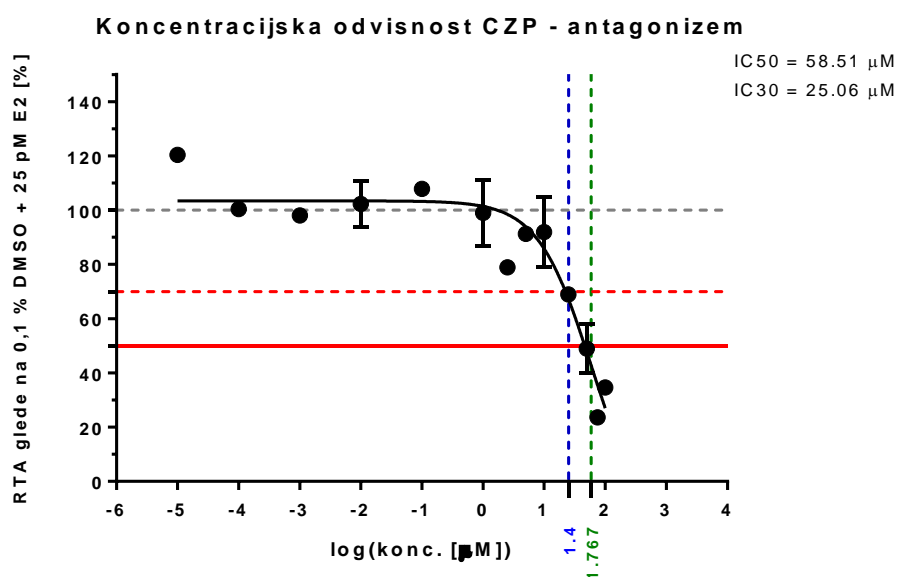
Rezultati informativnega luciferaznega testa za antagonizem (Slika 4) so pokazali, da je CZP občutno znižal (>30 %) aktivnost luciferaze pri koncentraciji 100 μM . Pri ostalih koncentracijah do znižanja ni prišlo ali pa je bilo le-to manjše od 30 %.



Slika 4: Rezultati informativnega luciferaznega testa za CZP, določanje antagonističnega delovanja. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm \text{SD}$). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO z dodatkom 25 pM E2, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (≤ 70 -% aktivnost luciferaze). Iz rezultatov je razvidno, da je prišlo pri koncentraciji 100 μL do občutnega znižanja luciferazne aktivnosti glede na kontrolo.

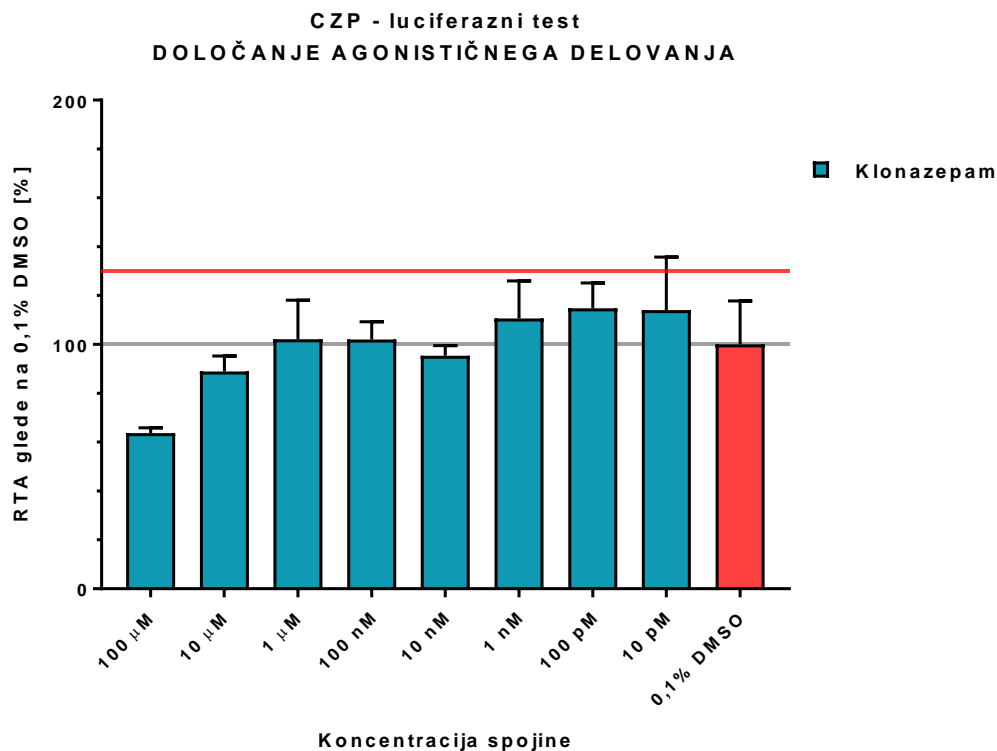
Na podlagi rezultatov informativnega testa za antagonizem smo se odločili, da testiramo še vmesne koncentracije med 100 in 10 μM (75 μM , 50 μM in 25 μM). Končni rezultati po

več bioloških ponovitev so pokazali, da je prišlo do znižanja luciferazne aktivnosti za >30 % (meja za pozitiven rezultat) pri koncentracijah 100 μ M, 75 μ M, 50 μ M in 25 μ M. Pri teh koncentracijah je bila aktivnost luciferaze 34,64 %, 23,63 %, 48,94 % in 68,97 %. Iz rezultatov je razvidno, da višja kot je koncentracija CZP, večji je njegov antagonistični (inhibitorni) učinek na aktivnost luciferaze. Koncentracijsko odvisnost za CZP ponazarja krivulja na Sliki 5. Rezultati več bioloških meritev za koncentracije z antagonističnim učinkom in koncentracije v območju maksimalne plazemske koncentracije (Preglednica V) so prikazani na sliki 14 v podpoglavju »Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja«.



Slika 5: Krivulja koncentracijske odvisnosti za CZP, antagonističen test. Krivulja prikazuje odvisnost relativne transkripcijske aktivnosti od logaritma koncentracije CZP. Rdeča črta prikazuje 50-% inhibicijo aktivnosti luciferaze, ki jo povzroči IC₅₀. Rdeča črtkana črta ponazarja 30-% inhibicijo aktivnosti luciferaze, ki je meja za pozitiven rezultat in jo povzroči IC₃₀. Siva črtkana črta ponazarja vrednost »spike-in« kontrole. Modra črtkana črta označuje logIC₃₀ (1,4), zelena črtkana črta pa označuje logIC₅₀ (1,767).

Rezultati informativnega luciferaznega testa pri agonističnem testiranju (Slika 6) niso pokazali agonističnega učinka pri nobeni izmed testiranih koncentracij. Nekoliko večjo luciferazno aktivnost glede na kontrolo (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju) smo zaznali le pri najnižjih koncentracijah, vendar pa to povečanje ni bilo statistično značilno in ni preseglo meje za pozitiven rezultat (130-% aktivnost luciferaze).



Slika 6: Rezultati informativnega luciferaznega testa za CZP, določanje agonističnega delovanja. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti (RTA) glede na kontrolo (% \pm SD). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (\geq 130-% aktivnost luciferaze).

Na podlagi rezultatov informativnega testa smo izvedli več bioloških ponovitev le pri maksimalni necitotoksični koncentraciji (100 μ M) in pri koncentracijah 100 nM in 10 nM, ki odražata območje, v katerem se nahaja maksimalna plazemska koncentracija CZP (Preglednica V). Pri nobeni izmed teh koncentracij rezultati po več bioloških ponovitvah niso pokazali agonističnega učinka. Statistično značilen je bil samo rezultat meritev pri koncentraciji 100 μ M, vendar pa je v tem primeru prišlo do statistično značilnega znižanja aktivnosti luciferaze in ne povišanja. Rezultati več bioloških meritev pri najvišji necitotoksični koncentraciji in v območju maksimalne plazemske koncentracije so prikazani na Sliki 13 v podpoglavju »Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja«.

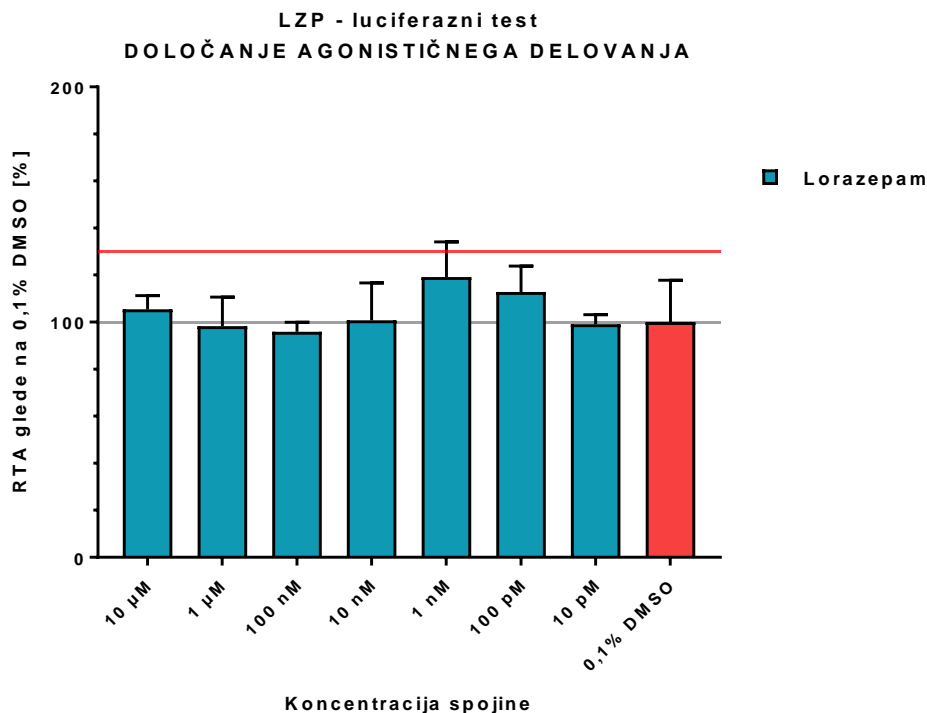
Iz rezultatov, pridobljenih v naši raziskavi, bi lahko sklepali, da je CZP antagonist za ER α . Vendar pa tega ne moremo trditi s 100-% gotovostjo. Znižana aktivnost luciferaze bi bila lahko namreč tudi posledica inhibitornega učinka CZP na luciferazo. V tem primeru bi

prav tako izmerili znižano aktivnost luciferaze, ki pa ne bi bila posledica zmanjšane transkripcijske aktivnosti luciferaznega gena zaradi vezave CZP na ER α , ampak posledica inhibitornega učinka CZP na samo delovanje luciferaze. Lažno pozitiven rezultat za antagonizem bi lahko dobili tudi zaradi citotoksičnosti spojine, a smo luciferazni signal normalizirali glede na število živih celic in se tako temu izognili. Iz končnih rezultatov agonističnega testiranja (Slika 13) je razvidno, da smo tudi pri agonističnem testiranju 100 μ M CZP zaznali bistveno nižjo aktivnost luciferaze (okoli 60 %) kot pri kontroli topila (100 %). Izmerjena aktivnost luciferaze pri kontroli topila odraža osnovno količino luciferaze, ki bi naj v teh celicah nastala ne glede na učinek preiskovane spojine na ER α . Za to znižanje sta možna dva vzroka. Prvi je, da CZP res na nek način direktno vpliva na aktivnost luciferaze, druga možnost pa je, da CZP kot antagonist zniža tudi osnovno (bazalno) produkcijo luciferaze v teh celicah. Da bi ugotovili, kaj je dejansko vzrok za znižanje luciferazne aktivnosti v antagonističnem testiranju, bi morali izvesti nadaljnja testiranja; npr. testiranje učinka CZP na aktivnost luciferaze v *in vitro* encimskem luciferaznem testu. Šele na podlagi rezultatov dodatnih testiranj bi lahko popolnoma zanesljivo potrdili, da je CZP antagonist za ER α in ne le inhibitor luciferaze.

4.5.2 Lorazepam

Za LZP se je v naših testiranjih izkazalo, da ni ne agonist in ne antagonist za estrogenski receptor α . Pri nobeni izmed testiranih koncentracij namreč nismo zaznali statistično značilnega povišanja oz. znižanja aktivnosti luciferaze preko meje za pozitiven rezultat, kar bi pomenilo možnost agonističnega oz. antagonističnega delovanja.

Rezultati informativnega luciferaznega testa pri agonističnem testiranju (Slika 7) niso pokazali agonističnega učinka pri nobeni izmed testiranih koncentracij. Pri nekaterih koncentracijah je sicer prišlo do rahlega povečanja aktivnosti luciferaze glede na kontrolo (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju), vendar pa to povečanje ni bilo statistično značilno in ni preseglo meje za pozitiven rezultat (130-% aktivnost luciferaze).

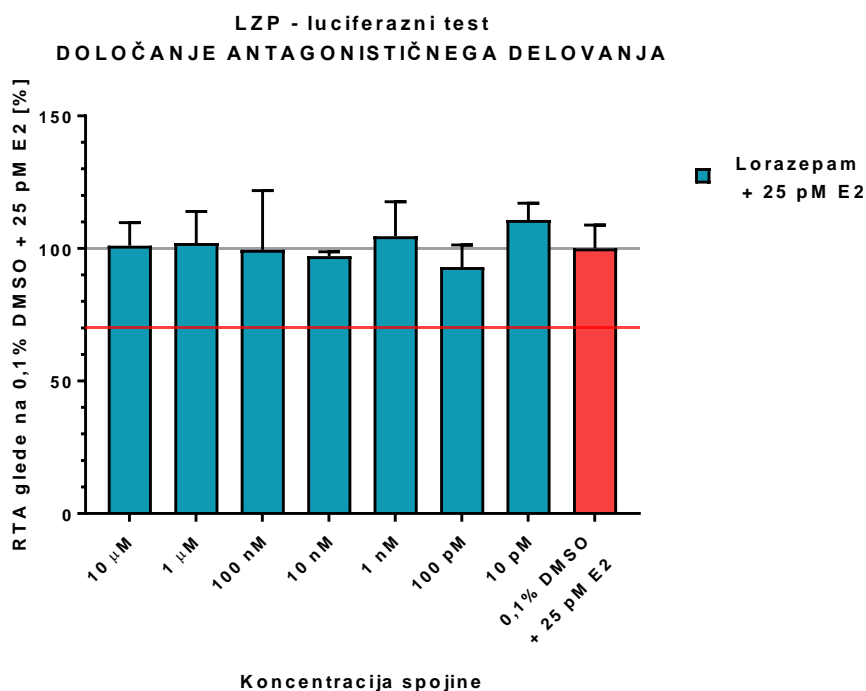


Slika 7: Rezultati informativnega luciferaznega testa za LZP, določanje agonističnega delovanja. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti (RTA) glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (≥ 130 -% aktivnost luciferaze).

Na podlagi rezultatov informativnega testa smo izvedli več bioloških ponovitev le pri maksimalni necitotoksični koncentraciji (10 µM) in pri koncentracijah 100 nM in 10 nM, ki odražata območje, v katerem se nahaja maksimalna serumska koncentracija LZP (Preglednica V). Pri nobeni izmed teh koncentracij tudi rezultati po več bioloških ponovitvah niso pokazali agonističnega učinka. Rezultati več bioloških meritev pri najvišji necitotoksični koncentraciji in v območju maksimalne serumske koncentracije so prikazani na Sliki 13 v podpoglavju »Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja«.

Rezultati informativnega luciferaznega testa za antagonistično delovanje (Slika 8) pri nobeni izmed testiranih koncentracij niso pokazali znižanja aktivnosti luciferaze za ≥ 30 %, kar bi pomenilo možnost antagonističnega delovanja LZP. Pri večini testiranih koncentracij je bila aktivnost luciferaze v območju luciferazne aktivnosti kontrole (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju s 25 pM E2). Do rahlega znižanja luciferazne aktivnosti je

prišlo samo pri dveh koncentracijah (10 nM in 100 pM), vendar pa to znižanje ni bilo statistično značilno in ni preseglo meje za pozitiven rezultat (70-% aktivnost luciferaze).



Slika 8: Rezultati informativnega luciferaznega testa za LZP, določanje antagonističnega delovanja. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO z dodatkom 25 pM E2, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (≤ 70 -% aktivnost luciferaze).

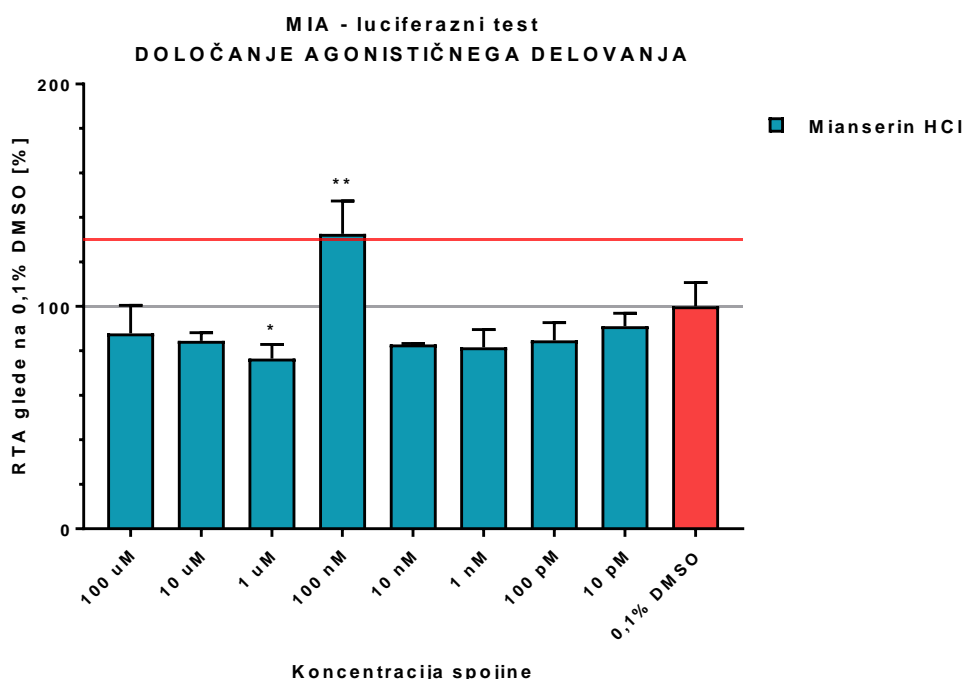
Na podlagi rezultatov informativnega luciferaznega testa za antagonizem smo izvedli več bioloških ponovitev le pri maksimalni necitotoksični koncentraciji (10 µM) in pri koncentracijah 100 nM in 10 nM, ki odražata območje, v katerem se nahaja maksimalna serumska koncentracija LZP (Preglednica V). Pri nobeni izmed teh koncentracij tudi rezultati po več bioloških ponovitvah niso pokazali antagonističnega učinka. Rezultati več bioloških meritev pri najvišji necitotoksični koncentraciji in v območju maksimalne serumske koncentracije so prikazani na Sliki 14 v podpoglavju »Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja«.

4.5.3 Mianserinijev klorid

Za MIA se je v naših testiranjih izkazalo, da ni ne agonist in ne antagonist za estrogenski receptor α . Pri nobeni izmed testiranih koncentracij namreč nismo zaznali povišanja oz.

znižanja aktivnosti luciferaze preko meje za pozitiven rezultat, kar bi pomenilo možnost agonističnega oz. antagonističnega delovanja.

Rezultati informativnega luciferaznega testa za agonizem (Slika 9) so pokazali, da je pri 100 nM koncentraciji MIA prišlo do povečanja aktivnosti luciferaze. Izmerjena aktivnost luciferaze pri tej koncentraciji je bila statistično značilna in je znašala 132,65 %, kar je nad mejo za pozitiven rezultat (130-% aktivnost luciferaze). Pri ostalih koncentracijah ni prišlo do povečanja aktivnosti luciferaze, ampak je bila njena aktivnost glede na kontrolo (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju) celo znižana.

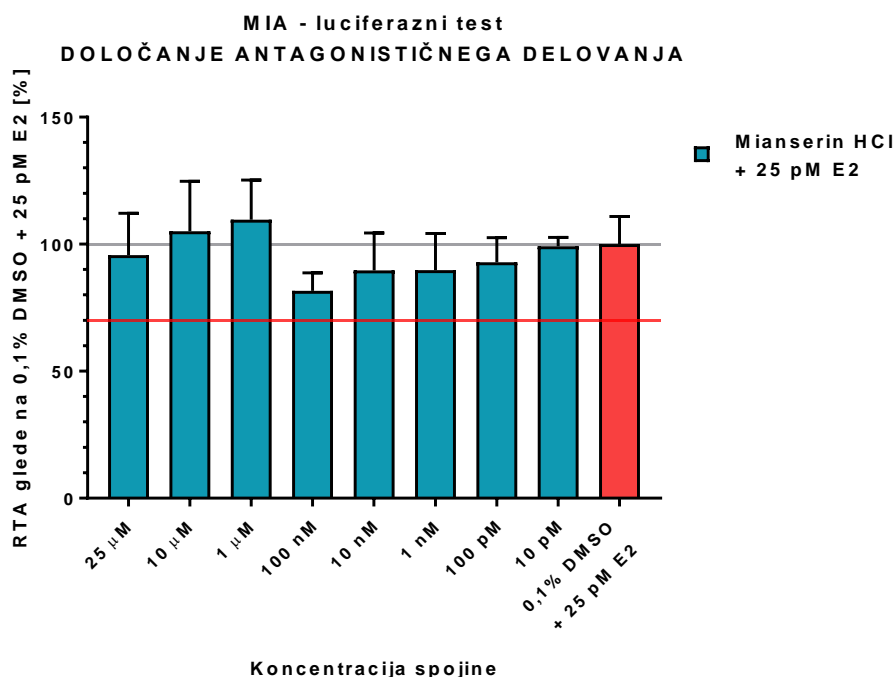


Slika 9: Rezultati informativnega luciferaznega testa za MIA, določanje agonističnega delovanja. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti (RTA) glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (≥ 130 -% aktivnost luciferaze). Statistična značilnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Na podlagi rezultatov informativnega luciferaznega testa za agonizem smo se odločili, da ponovimo meritve pri najvišji necitotoksični koncentraciji (100 μ M) in pri koncentracijah 100 nM in 10 nM, ki odražata območje koncentracij MIA v krvi (Preglednica V). Predvsem nas je zanimalo, kakšni bodo rezultati meritev pri koncentraciji 100 nM; ali bo aktivnost luciferaze še vedno povečana nad mejo za pozitiven rezultat ali ne. Rezultati po

več bioloških ponovitev pri koncentraciji 100 nM so sicer še vedno pokazali povečanje luciferazne aktivnosti glede na kontrolo (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju), vendar pa to povečanje, čeprav statistično značilno, ni presegalo meje za pozitiven rezultat. Povprečna vrednost aktivnosti luciferaze pri 100 nM je po več bioloških meritvah znašala 124,6 %. Na podlagi tega lahko trdimo, da pri koncentraciji 100 nM sicer pride do povečanja aktivnosti luciferaze, a to povečanje ni tolikšno, da bi lahko trdili, da MIA deluje agonistično na ER α . Pri koncentracijah 100 μ M in 10 nM so bili rezultati po več bioloških ponovitvah podobni kot pri prvi meritvi in niso bili statistično značilni. Rezultati več bioloških meritev pri koncentracijah 100 μ M, 100 nM in 10 nM so prikazani na Sliki 13 v podpoglavju »Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja«. Naši rezultati za agonistično delovanje mianserina se razlikujejo od rezultatov študije, ki so jo izvedli *van der Ven et al.* (60). Ti so v svoji študiji preiskovali učinke mianserina v zebričah. Ugotovitve njihove študije so jasno pokazale estrogensko aktivnost mianserina v vodnem okolju (60).

Rezultati informativnega luciferaznega testa pri antagonističnem testiranju (Slika 10) niso pokazali antagonističnega učinka pri nobeni izmed testiranih koncentracij. Pri večini testiranih koncentracij smo sicer zaznali znižano aktivnost luciferaze, vendar pa to znižanje v nobenem primeru ni bilo statistično značilno in ni presegalo meje za pozitiven rezultat (70-% aktivnost luciferaze).



Slika 10: Rezultati informativnega luciferaznega testa za MIA, določanje antagonističnega delovanja. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO z dodatkom 25 pM E2, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (≤ 70 -% aktivnost luciferaze).

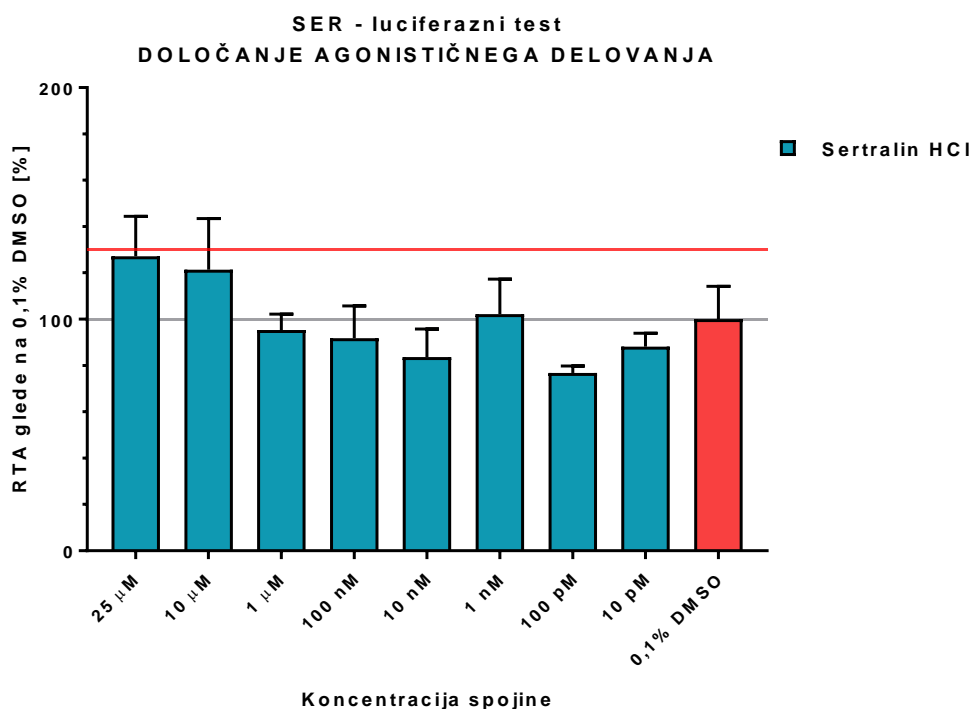
Na podlagi rezultatov informativnega luciferaznega testa smo ponovili meritve samo pri najvišjih koncentracijah in pri 100 nM ter 10 nM (območje koncentracij MIA v krvi, Preglednica V). Tudi rezultati po več bioloških ponovitvah so pokazali, da pride do majhnega znižanja aktivnosti luciferaze, vendar pa to znižanje ni zadostno, da bi lahko rekli, da je MIA antagonist za ER α . Rezultati več bioloških meritev pri koncentracijah 25 μ M, 100 nM in 10 nM so prikazani na Sliki 14 v podpoglavju »Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja«. Najvišja prikazana koncentracija za MIA pri antagonističnem testiranju je 25 μ M, saj smo imeli pri koncentraciji 100 μ M (najvišja necitotoksična koncentracija) težave s topnostjo. Rezultati posameznih bioloških ponovitev pri koncentraciji 100 μ M so se med seboj zelo razlikovali in niso bili primerljivi. Možen razlog za neponovljivost rezultatov je lahko topnost MIA v mediju. Pri pripravi vzorca za testiranje MIA s koncentracijo 100 μ M je namreč prišlo do obarjanja izhodiščne raztopine MIA v mediju. Ker je oborina po centrifugiranju izginila oz. ni bila več vidna s prostim očesom, smo meritve pri tej koncentraciji vseeno izvedli, a le-te med seboj niso bile primerljive. Drugi možen razlog za neponovljivost rezultatov pa bi lahko bila tudi nestabilnost celične linije.

4.5.4 Sertralinijev klorid

SER se je v naših testiranjih izkazal kot potencialen šibek agonist. Bil je edini izmed vseh štirih preiskovanih spojin, ki je vsaj pri eni izmed testiranih koncentracij povzročil povečanje aktivnosti luciferaze za več kot 30 % glede na kontrolo (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju). EC₅₀ (efektivna koncentracija, pri kateri preiskovana spojina povzroči za 50 % višji odziv od kontrole) za SER nismo mogli določiti, saj povečanje aktivnosti luciferaze ni bilo zadostno.

Rezultati informativnega luciferaznega testa za agonizem (Slika 11) so pokazali, da je SER pri koncentracijah 25 μ M in 10 μ M povzročil povečano aktivnost luciferaze, vendar pa to povečanje ni preseglo meje za pozitiven rezultat (130-% aktivnost luciferaze). Pri ostalih

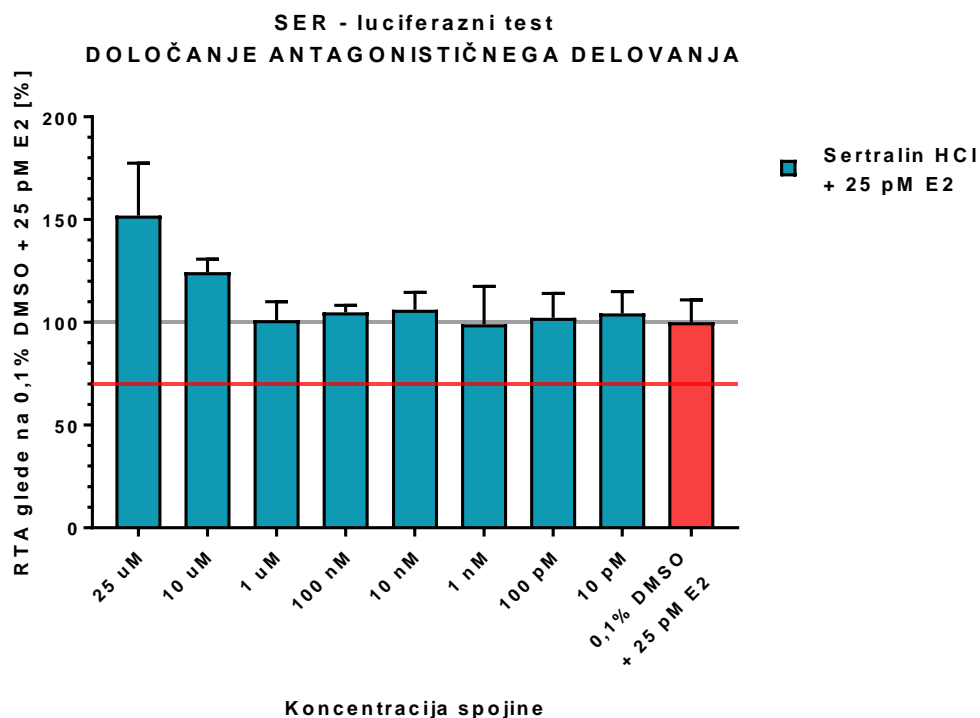
koncentracijah ni prišlo do povečanja aktivnosti luciferaze, ampak je bila njena aktivnost glede na kontrolo (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju) znižana.



Slika 11: Rezultati informativnega luciferaznega testa za SER, določanje agonističnega delovanja. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti (RTA) glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Kontrolo predstavlja 0,1 % DMSO, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100 % aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (130 % aktivnost luciferaze).

Končni rezultati luciferaznega testa za agonizem po več bioloških ponovitvah so pokazali, da je prišlo pri koncentraciji 25 μM do povečanja aktivnosti luciferaze za $>30\%$. Aktivnost luciferaze pri tej koncentraciji je znašala 134,41 % in je bila statistično značilna. Iz tega lahko sklepamo, da ima SER pri koncentraciji 25 μM šibek agonističen učinek. Pri koncentraciji 10 μM so rezultati po več bioloških ponovitvah prav tako pokazali statistično značilno povečanje aktivnosti luciferaze, vendar pa le-to ni presegalo meje za pozitiven rezultat. Pri ostalih testiranih koncentracijah končni rezultati niso pokazali nobenega povečanja aktivnosti luciferaze glede na kontrolo. Končni rezultati za koncentraciji 25 μM in 10 μM ter koncentracije v območju maksimalne plazemske koncentracije (Preglednica V) so prikazani na sliki 13 v podpoglavju »Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja«.

Rezultati informativnega luciferaznega testa za antagonizem (Slika 12) pri nobeni izmed testiranih koncentracij niso pokazali antagonističnega učinka. Izmerjena aktivnost luciferaze pri testiranih koncentracij je bila v območju luciferazne aktivnosti kontrole (0,1-% DMSO v gojitvenem mediju s 25 pM E2) oz. v primeru 25 µM in 10 µM SER celo povečana glede na kontrolo.



Slika 12: Rezultati informativnega luciferaznega testa za SER, določanje antagonističnega delovanja. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti glede na kontrolo (% ± SD). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO z dodatkom 25 pM E2, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (≤ 70 -% aktivnost luciferaze).

Na podlagi rezultatov informativnega testa za antagonizem smo se odločili, da opravimo več bioloških ponovitev le pri najvišji necitotoksični koncentraciji (25 µM) in pri koncentracijah 1 µM, 100 nM in 1nM. Koncentraciji 1 µM in 100 nM zajemata območje, v katerem se nahaja maksimalna plazemska koncentracija SER (Preglednica V). Končni rezultati po več bioloških ponovitvah so pokazali enako kot informativni test in so prikazani na Sliki 14 v podpoglavju »Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja«.

Iz rezultatov, pridobljenih v naši raziskavi, bi lahko torej sklepali, da je SER, glede na splošen kriterij, ki velja za celične linije, šibek agonist za ER α . Smo pa vse rezultate, kot je omenjeno v začetku razprave, pri agonističnem testiranju interpretirali tudi na podlagi posebnega kriterija za celično linijo hER α -HeLa-9903, ki ga navaja OECD 445. Na podlagi tega kriterija smo določili, da maksimalen izmerjen odziv pri 25 μ M SER predstavlja 7,5 % odziva pozitivne kontrole (1 nM E2), kar je pod mejo za pozitiven rezultat na agonistično delovanje. Meja za pozitiven rezultat je postavljena pri 10 % odziva pozitivne kontrole. Če torej upoštevamo ta uraden kriterij za celično linijo hER α -HeLa-9903, ki ga navaja OECD 455, potem SER pri nobeni izmed testiranih koncentracij ne izraža agonističnega učinka.

Tudi če bi se SER izkazal za pozitivnega na podlagi tega uradnega kriterija, še vedno ne bi mogli 100 % trditi, da je SER dejansko šibek agonist za ER α . Pri agonističnem testiranju lahko namreč pride do lažno pozitivnih rezultatov, in sicer zaradi:

1. aktivacije luciferaznega gena, ki ni posledica posredovanja ER α ,
2. direktne aktivacije genskega produkta,
3. fluorescence, ki ne nastaja v reakciji, ki jo katalizira luciferaza (obstaja še nek drug vir fluorescence).

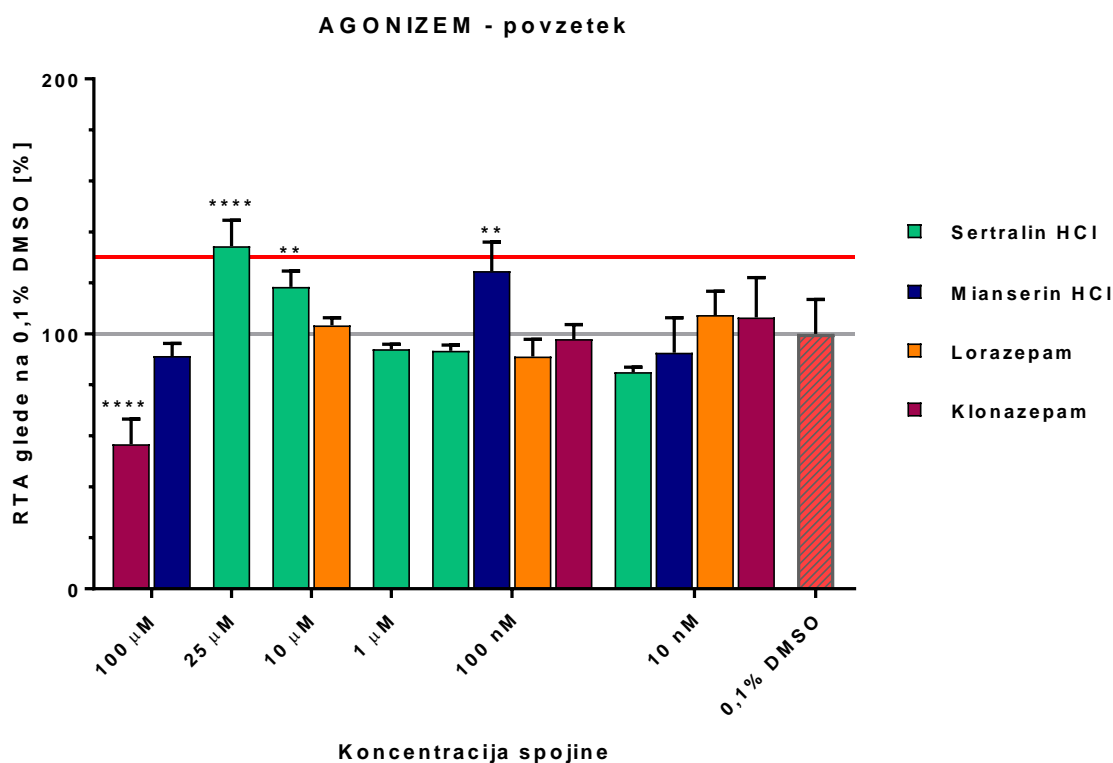
V OECD 455 je zapisano, da v primeru suma na prisotnost katerega izmed teh treh učinkov, testiramo vpliv znanega ER antagonista (npr. 4-hidroksitamoksifen pri netoksični koncentraciji) na odziv. Če znani ER antagonist zniža odziv, ki ga sproži testirana spojina, potem testirana spojina dejansko deluje agonistično na ER. Če pa znani antagonist ne povzroči znižanja odziva, ki ga sproži testirana spojina, potem pa zvišan odziv ni posledica agonističnega delovanja testirane spojine na ER (50).

Naši dobljeni rezultati se razlikujejo od rezultatov študije *Pop et al.* (61), ki je omenjena v poglavju »Izbrane spojine kot potencialni hormonski motilci«. Le-ti so v svoji študiji zapisali, da je sertralin pri nižjih koncentracijah (0,1 μ M) izražal šibek estrogenski učinek, pri višjih (10 μ M) pa antiestrogenski učinek. Agonističen/antagonističen učinek sertralina so v tej študiji preučevali na drugi celični liniji, in sicer na T47D-KBluc celični liniji raka dojke. Celična linija T47D-KBluc izraža oba podtipa ER, α in β (67).

4.5.5 Povzetek rezultatov agonističnega in antagonističnega testiranja

Na podlagi končnih rezultatov po zaključenem testiranju bi lahko rekli, da nobena izmed preiskovanih spojin ne izraža agonističnega (Slika 13) ali antagonističnega (Slika 14)

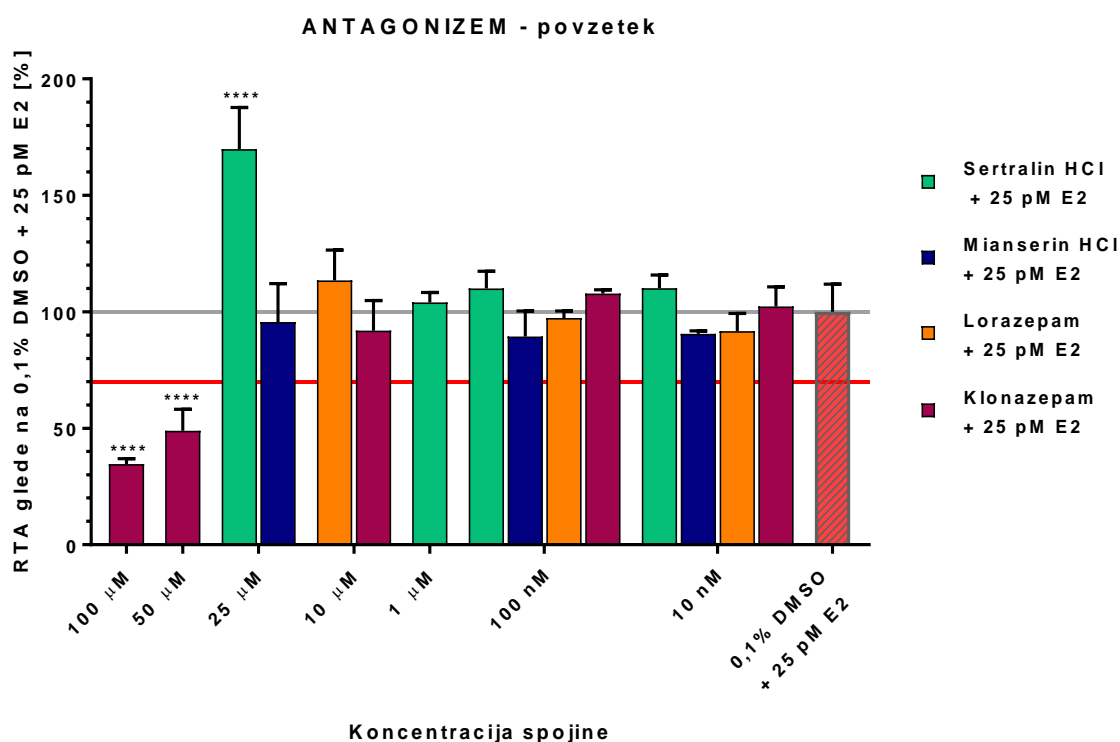
učinka na ER α v območju njene C_{max}. Iz tega lahko torej sklepamo, da jemanje preiskovanih spojin znotraj terapevtskih odmerkov pri bolnikih ne povzroča neželenih učinkov na področju estrogenskega delovanja. Maksimalne plazemske/serumske/krvne koncentracije za preiskovane spojine so navedene v Preglednici V. Ker se C_{max} za spojine CZP, LZP in MIA nahaja v območju okoli 100 nM, smo se v raziskavi osredotočili na rezultate meritev pri koncentracijah 100 nM in 10 nM. C_{max} za SER pa znaša okoli 600 nM, kar je na sredini med 1 μ M in 100 nM, zato so nas v tem primeru zanimali predvsem rezultati pri teh dveh koncentracijah.



Slika 13: Rezultati luciferaznega testa, agonistično delovanje. Prikazani so rezultati luciferaznega testa po več bioloških ponovitvah pri najvišjih necitotoksičnih koncentracijah, C_{max} in potencialno pozitivnih koncentracijah testiranih spojin. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti (RTA) več bioloških ponovitev glede na kontrolo (% \pm SD). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (130-% aktivnost luciferaze). Statistična značilnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Povzetek končnih rezultatov agonističnega testiranja pri ključnih koncentracijah je prikazan na Sliki 13. Iz predstavljenih rezultatov je razvidno, da je prišlo do agonističnega

delovanja na ER α , ob upoštevanju splošnega kriterija za celične linije, samo pri SER s koncentracijo 25 μ M. Na podlagi tega bi lahko rekli, da je SER edini, ki je možen agonist. Vendar pa obstaja za celično linijo hER α -HeLa-9903 uraden kriterij, ki je zapisan v OECD 445. Po tem kriteriju, kot je pojasnjeno v poglavju »Določanje učinka preiskovanih spojin - Sertralinijev klorid«, tudi SER pri koncentraciji 25 μ M ne izraža agonističnega učinka. Naša končna ugotovitev, sprejeta na podlagi rezultatov uradnega kriterija, je, da nobena izmed preiskovanih spojin ni agonist za ER α .



Slika 14: Rezultati luciferaznega testa, antagonistično delovanje. Prikazani so rezultati luciferaznega testa po več bioloških ponovitvah pri najvišjih necitotoksičnih koncentracijah, C_{max} in potencialno pozitivnih koncentracijah testiranih spojin. Podane so povprečne vrednosti relativne transkripcijske aktivnosti več bioloških ponovitev glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Kontrolo predstavlja 0,1-% DMSO z dodatkom 25 pM E2, ki ga ponazarja rdeči stolpec. Siva črta prikazuje vrednost kontrole (100-% aktivnost luciferaze), rdeča črta pa mejno vrednost za pozitiven rezultat (≤ 70 -% aktivnost luciferaze). Statistična značilnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Povzetek končnih rezultatov antagonističnega testiranja pri ključnih koncentracijah je prikazan na Sliki 14. Iz predstavljenih rezultatov je razvidno, da je prišlo do antagonističnega delovanja samo pri višjih koncentracijah CZP. Na podlagi tega bi lahko

rekli, da je CZP možen antagonist na ER α . Za dokončno potrditev antagonističnega delovanja CZP pa bi morali, kot je pojasnjeno v poglavju »Določanje učinka preiskovanih spojin - Klonazepam«, preveriti še možnost delovanja CZP direktno na encim luciferazo. Če bi se CZP na koncu dejansko izkazal kot antagonist za ER α , pa to še ne pomeni, da bi povzročal pri bolnikih neželene učinke na področju estrogenskega delovanja. Kot je razvidno iz rezultatov, CZP namreč že pri koncentraciji 10 μ M, ki je dosti višja od njegove C_{max} (47,2 nM), ni več deloval antagonistično. Naša končna ugotovitev na podlagi rezultatov torej je, da nobena izmed preiskovanih spojin v območju terapevtskih koncentracij ne deluje antagonistično na ER α .

5 SKLEP

V Evropi in drugod po svetu se povečujeta zavedanje in zaskrbljenost zaradi možnih škodljivih učinkih hormonskih motilcev (HM) na ljudi in živali. Ker pa je količina trenutno dostopnih znanstvenih informacij o možnih škodljivih učinkih HM majhna, se med znanstveniki povečuje zanimanje za preučevanje njihovih vplivov na živa bitja. Pri raziskovanju predstavljajo pomembno področje tudi zdravilne učinkovine, ki imajo potencial, da učinkujejo kot HM. V magistrskem delu smo se osredotočili na 4 anksiolitike, za katere je program Endocrine Disruptome napovedal visoko verjetnost vezave in agonističnega ali antagonističnega delovanja na ER α ali ER β . Vrednotili smo vpliv klonazepama (CZP), lorazepama (LZP), mianserinijevega klorida (MIA) in sertralinijevega klorida (SER) na ER α .

Na osnovi naših testiranj v okviru eksperimentalnega dela lahko zaključimo sledeče:

- Začetna najvišja koncentracija 100 μ M se je izkazala za citotoksično pri SER in LZP. Pri tej koncentraciji smo imeli težave s ponovljivostjo rezultatov zaradi obarjanja ali možne nestabilnosti celične linije tudi pri antagonističnem testiranju MIA. Primerna koncentracija za nadaljnje testiranje je tako znašala 10 μ M pri LZP ter 25 μ M pri SER in pri antagonističnem testu za MIA. Pri testiranju CZP in agonističnem testiranju MIA smo uporabili prvotno izbrano koncentracijo 100 μ M.
- Pri testiranju agonističnega delovanja spojin na ER α je sicer prišlo do statistično značilnega povišanja aktivnosti luciferaze pri 25 μ M in 10 μ M SER ter 100 nM MIA, vendar pa v nobenem primeru ni bil presežen prag za pozitiven rezultat za agonistično delovanje, ki ga določa uradni kriterij za celično linijo hER α -HeLa-9903 in je zapisan v OECD 445.
- Pri testiranju antagonističnega delovanja na ER α se je pokazalo, da je prišlo do statistično značilnega znižanja aktivnosti luciferaze samo pri višjih koncentracijah CZP. Rezultati kažejo, da CZP pri koncentracijah 50–100 μ M zniža aktivnost luciferaze za več kot je meja za pozitiven rezultat (30 % znižanje). Iz tega bi lahko sklepali, da je antagonist za ER α , a bi morali prej preveriti še možnost delovanja CZP direktno na encim luciferazo.
- Nobena izmed spojin ni pokazala agonističnega ali antagonističnega učinka na ER α v območju terapevtskih koncentracij.

- Rezultati informativnega luciferaznega testa za agonizem in antagonizem niso pokazali, da bi katera izmed preiskovanih spojin izražala učinek na ER α v območju med 10 in 100 pM (najnižji merjeni koncentraciji), kjer se nahajajo okoljske koncentracije preiskovanih spojin.

V okviru magistrske naloge nismo uspeli popolnoma potrditi obeh, v načrtu dela postavljenih hipotez:

1. Izbrane učinkovine se vežejo in modulirajo ER.
2. V primeru, da učinkovine modulirajo ER, je učinek takšen, kot je bila napoved.

V magistrskem delu smo namreč ugotovili, da vse preiskovane spojine ne vplivajo na ER α . Je pa res, da je imel izmed teh 4 spojin samo SER napovedano visoko verjetnost vezave na ER α , ostale tri so imele napovedano visoko verjetnost vezave na ER β .

Za pravilno se je izkazala hipoteza 2. V primeru, da se je pojavil signifikanten učinek, je bil ta namreč takšen, kakršen je bil napovedan. Potrebno je tudi poudariti, da nobena izmed preiskovanih učinkovin ni izrazila učinka v območju terapevtskih ali še nižjih, okoljskih koncentracij. V območju okoljskih koncentracij bi sicer morali izvesti še vsaj eno biološko ponovitev, da bi lahko z gotovostjo trdili, da spojine pri teh koncentracijah nimajo učinka na ER α . Na podlagi tega bi lahko sklenili, da izbrane spojine, vsaj z vidika estrogenskega delovanja, ne predstavljajo nevarnosti za zdravje ljudi in živali. V prihodnje bi bilo potrebno izvesti še nadaljnja testiranja za CZP, da bi ugotovili ali je dejansko antagonist ER α ali samo deluje inhibitorno na luciferazo. Dobro bi bilo tudi testirati vpliv teh spojin na ER β , glede na to, da so imele vse preiskovane spojine razen SER, napovedano visoko verjetnost vezave in učinka nanj in ne na ER α .

6 LITERATURA

1. Endocrine disruptors - European Commission. [citirano 20.1.2018]. Dostopno na: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm
2. Endocrine Disruptors Fact Sheet - NIEHS, 2010 [citirano 20.1.2018]. Dostopno na: https://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf
3. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC: Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 2009; 30(4): 293–342.
4. Endocrine Disruption - US EPA. [citirano 21.1.2018]. Dostopno na: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption>
5. Klep J: Magistrska naloga: Ugotavljanje tiroidnega delovanja izbranih nesteroidnih protivnetnih učinkovin na celicah GH3.TRE-Luc. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015: 1-3, 15.
6. Understanding endocrine disruption - TEDX. [citirano 24.1.2018]. Dostopno na: <https://endocrinedisruption.org/assets/media/documents/EDCFactSheet0180130.pdf>
7. What are endocrine disruptors - European Commission. [citirano 20.1.2018]. Dostopno na: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis_en.htm
8. Effects of endocrine disruptors - European Commission. [citirano 24.1.2018]. Dostopno na: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/affect_en.htm
9. Shamma NK: Endocrine Disruptors. In: Wang LK, Hung YT, Shamma NK, editors. *Advanced Physicochemical Treatment Technologies Handbook of Environmental Engineering*, vol 5. Totowa, NJ: Humana Press, 2007; 485–504.
10. Gore AC, Crews D: Environmental Endocrine Disruption of Brain and Behavior. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT, editors. *Hormones, Brain and Behavior*, 2nd ed. Elsevier; 2009; 1789–816.
11. Costanzo LS: *Physiology*, 5th ed., Saunders Elsevier, Philadelphia, 2014: 383–389.
12. Wu J, McAndrews JM: Introduction To The Endocrine System: Part 1: Basic Concepts And Anatomy. *Amwa Jurnal*, electronic edition, 2012; 27(4): 152–156 [citirano: 22.3.2018]. Dostopno na: <http://c.ymcdn.com/sites/www.amwa.org/resource/resmgr/journal/Issues/2012/2012v2>

7n4_online.pdf

13. Wu J., McAndrews JM: Introduction to the Endocrine System: Part 2: Physiology. *Amwa Jurnal*, electronic edition, 2013; 28(2): 51–56 [citirano: 22.3.2018]. Dostopno na:
http://c.ymcdn.com/sites/www.amwa.org/resource/resmgr/journal/Issues/2013/2013v28n2_online.pdf
14. Guyton AC, Hall JE: *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed., Saunders Elsevier, Philadelphia, 2006: 905–910, 957, 1004, 1016–1152.
15. Silbernagl S, Despopoulos A: *Color Atlas of Physiology*, 6th ed., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009: 268–274, 304–306.
16. Štiblar-Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Finderle Ž, Marš T: *Anatomija, histologija, fiziologija*, 1 izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 436–453.
17. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M: Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 2017; 16(1): 4–20.
18. Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R: The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J Androl* [serial online], 2016; 18(3): 435–440.
19. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson J.: Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*, 2007; 87(3): 905–931.
20. Lee HR, Kim TH, Choi KC: Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Laboratory animal research*, 2012; 28(2): 71–76.
21. Mencej Bedrač S, Zupanj J, Kocjan T, Mlakar V, Preželj J, Marc J, Ostanek B: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farmacevtski vestnik*, 2012; 63(5–6): 267–362.
22. Clonazepam - PubChem. [citirano 22.3.2018]. Dostopno na:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2802>
23. Rivotril - povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC). [citirano 22.3.2018]. Dostopno na:
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/22B3699039BEE3C4C12579C2003F56A1/\\$File/s-014149.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/22B3699039BEE3C4C12579C2003F56A1/$File/s-014149.pdf)
24. Wick JY: The History of Benzodiazepines. *The Consultant Pharmacist*, 2013; 28(9):

- 538–548.
25. Klonopin® Tablets (Medication Guide). [citirano 1.4.2018]. Dostopno na: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/017533s0591bl.pdf#page=19
 26. Crevoisier C, Delisle MC, Joseph I, Foletti G: Comparative single-dose pharmacokinetics of clonazepam following intravenous, intramuscular and oral administration to healthy volunteers. *European Neurology*, 2003; 49(3): 173–177.
 27. Nardi AE, Machado S, Ferreira Almada L, Paes F, Cardoso Silva A, Marques RJ, Amrein R, Freire RC, Martin-Santos R, Cosci F, Hallak JE, Crippa JA, Arias-Carrion O: Clonazepam for the Treatment of Panic Disorder. *Curr Drug Targets*, 2013; 14(3): 353–364.
 28. Wang L, Wang X: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of Clonazepam in Children With Epilepsy Treated With Valproate: A Preliminary Study. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2002; 24(4): 532–536.
 29. Lorazepam - PubChem. [citirano 1.4.2018]. Dostopno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3958>
 30. Lorsilan - povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC). [citirano 1.4.2018]. Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/48D8856EFC1053E4C12579C2003F518F/\\$File/s-018471.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/48D8856EFC1053E4C12579C2003F518F/$File/s-018471.pdf)
 31. Ativan® CIV (Medication Guide). [citirano 3.4.2018]. Dostopno na: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/017794s034s0351bl.pdf
 32. Ativan (lorazepam) Injection (Medication Guide). [citirano 3.4.2018]. Dostopno na: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/018140s0281bl.pdf
 33. Mianserin hydrochloride - PubChem. [citirano 17.4.2018]. Dostopno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68551#section=Synonyms>
 34. Mianserin 30 mg film-coated tablets (SmPC) - eMC. [citirano 18.4.2018]. Dostopno na: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/2741/smpc>
 35. Mianserin hydrochloride - DrugBank. [citirano 17.4.2018]. Dostopno na: <https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT000957>
 36. Centralna baza zdravil 2 - Rezultati iskanja za zdravilno učinkovino mianserinijev klorid. [citirano 17.4.2018]. Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=\(%5BSEZNAMUCI](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=(%5BSEZNAMUCI)

NKNAZIV%5D=_mianserinijev+klorid*)&SearchOrder=4&SearchMax=301

37. Tolvon - Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC). [citirano 18.4.2018]. Dostopno na:
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/264DC28C3E092D43C12579C2003F640B/\\$File/s-009319.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/264DC28C3E092D43C12579C2003F640B/$File/s-009319.pdf)
38. Maguire KP, Norman TR, Burrows GD, Scoggins BA: A pharmacokinetic study of mianserin. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1982; 21(6): 517–520.
39. Zoloft - povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC). [citirano 11.4.2018]. Dostopno na:
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/904D67F795016340C12579C2003F5C59/\\$File/s-020272.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/904D67F795016340C12579C2003F5C59/$File/s-020272.pdf)
40. Sertraline hydrochloride - PubChem. [citirano 10.4.2018]. Dostopno na:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/63009>
41. Sertraline - PubChem. [citirano 10.4.2018]. Dostopno na:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68617>
42. DeVane CL, Liston HL, Markowitz JS: Clinical Pharmacokinetics of Sertraline. *Clinical Pharmacokinetics*, 2002; 41(15): 1247–1266.
43. Zoloft - Product Monograph. [citirano 11.4.2018]. Dostopno na:
http://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10017036/f/201411/ZOLOFT_PM_E_27.pdf
44. Sertraline hydrochloride - DrugBank. [citirano 12.4.2018]. Dostopno na:
<https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT000808>
45. Goodnick PJ, Goldstein BJ. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders – I. Basic pharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, 1998; 12(3 Suppl B): S5–S20.
46. Zoloft (medication guide). [citirano 5.4.2018]. Dostopno na:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/019839s0911bl.pdf#page=27
47. Asentra - povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC). [citirano 7.5.2018]. Dostopno na:
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7E79B0E946B018BCC12579C2003F4F1E/\\$File/s-018810.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7E79B0E946B018BCC12579C2003F4F1E/$File/s-018810.pdf)
48. Kolšek K, Mavri J, Sollner Dolenc M, Gobec S, Turk S: Računalniški program Endocrine disruptome. [citirano 19.5.2018]. Dostopno na:

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

49. Kolšek K, Mavri J, Sollner Dolenc M, Gobec S, Turk S. Endocrine Disruptome – An Open Source Prediction Tool for Assessing Endocrine Disruption Potential through Nuclear Receptor Binding. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2014; 54(4): 1254–1267.
50. OECD (2016), Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
51. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM: Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2009; 133(9): 1463–1467.
52. MEM, no glutamine, no phenol red - Thermo Fisher Scientific. [citirano 22.3.2018]. Dostopno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/51200046>
53. TPP tissue culture flask. [citirano 27.3.2018]. Dostopno na: https://www.tpp.ch/page/produkte/01_zellkultur_flasche.php
54. Riss TL, Moravec RA, Niels AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L: Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual (spletna verzija), 1 maj 2013 [posodobljeno 1 julij 2016]. [itirano 24.3.2018] Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
55. Search the TEDX List - The Endocrine Disruption Exchange. [citirano 30.5.2018]. Dostopno na: <https://endocrinedisruption.org/interactive-tools/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/search-the-tedx-list>
56. Chemicals - Environment - European Commission. [citirano 30.5.2018]. Dostopno na: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.htm#priority_list
57. Khadem-Ansari M-H, Rasmi Y, Ahani A, Mikaeili P: Effect of benzodiazepines on thyroglobulin, anti-thyroglobulin, anti-thyroid peroxidase, and thyroid stimulating hormone in rat. *Med J DY Patil Univ [serial online]*, 2014; 7(4): 447–449. [citirano 2018 2.6.2018]. Dostopno na: <http://www.mjdrdypu.org/text.asp?2014/7/4/447/135259>
58. Chevassus H, Mourand I, Molinier N, Lacarelle B, Brun J-F, Petit P: Assessment of

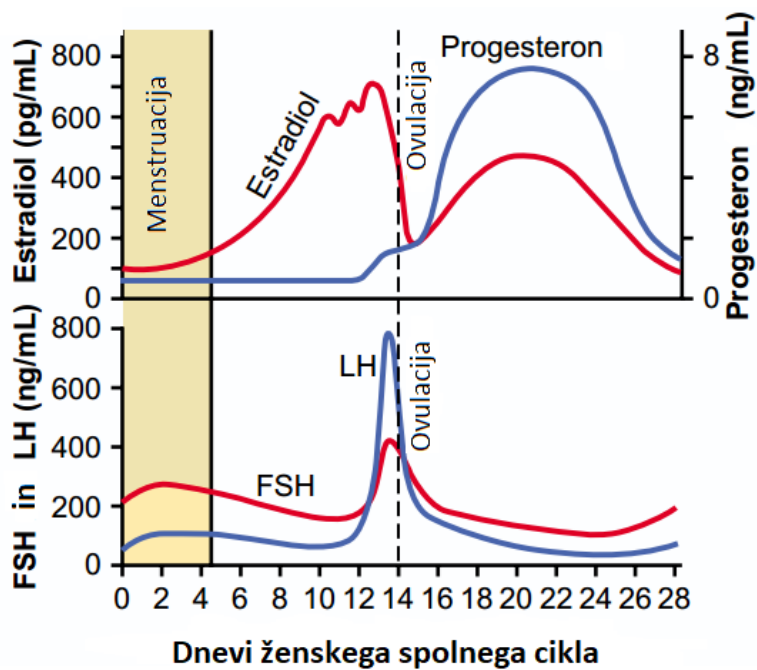
- single-dose benzodiazepines on insulin secretion, insulin sensitivity and glucose effectiveness in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized cross-over trial [ISRCTN08745124]. *BMC Clinical Pharmacology*, 2004; 4: 3.
59. Männistö PT, Laakso M-L, Järvinen A, Rägo L: Effects of Central and Peripheral Type Benzodiazepine Ligands on Growth Hormone and Gonadotropin Secretion in Male Rats. *Pharmacology & Toxicology*, 1992; 71(1): 75–80.
 60. van der Ven K, Keil D, Moens LN, Van Hummelenet P, van Remortel P, Maras M, De Coen W: Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: Molecular markers of endocrine disruption. *Chemosphere*, 2006; 65(10): 1836–1845.
 61. Pop A, Lupu DI, Cherfan J, Kiss B, Loghin F: Estrogenic/antiestrogenic activity of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Clujul Med.*, 2015; 88(3): 381–385.
 62. Owens B: Pharmaceuticals in the environment: a growing problem. *The Pharmaceutical Journal* [online], 2015; 294(7850). [citirano 20.6.2018]. Dostopno na: <http://www.pharmaceutical-journal.com/news-and-analysis/features/pharmaceuticals-in-the-environment-a-growing-problem/20067898.article>
 63. Pharmaceuticals in Drinking-water - WHO. [citirano 18.6.2018]. Dostopno na: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals_2011_0601.pdf
 64. Ferreira AP: Environmental Investigation of Psychiatric Pharmaceuticals: Guandu River, Rio De Janeiro State, Southeast Brazil. *Journal of Chemical Health Risks*, 2014; 4(3): 25–32.
 65. Valcárcel Y, Martínez F, González-Alonso S, Segura Y, Catalá M, Molina R, Monterubio JC, Mastroianni N, Lopez de Alda M, Postigo C, Barcelo D: Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: Heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. *Environment International*, 2012; 41: 35–43.
 66. Giebułtowicz J, Nałęcz-Jawecki G: Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014; 104: 103–109.
 67. Wilson VS, Bobseine K, Gray LE: Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists. *Toxicological Sciences*, 2004; 81(1): 69–77.
 68. List of products: Clonazepam - MHRA [citirano 3.4.2018]. Dostopno na:

- <http://www.mhra.gov.uk/spc-pil/?subsName=CLONAZEPAM&pageID=SecondLevel>
69. List of products: lorazepam - MHRA. [citirano 2.4.2018]. Dostopno na:
http://www.mhra.gov.uk/spc-pil/?IdcService=SS_GET_PAGE&nodeId=%3C%25%3D+nodeId+%25%3E&searchFiled=lorazepam&SubmitSearch=Search
70. Lorazepam - INCHEM. [citirano 2.4.2018]. Dostopno na:
<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim223.htm>
71. Mianserin hydrochloride Assay Standard - Safety data sheet (British Pharmacopoeia), 2013. [citirano: 17.4.2018]. Dostopno na:
https://www.pharmacopoeia.com/Catalogue/Preview?uri=%2Fcontent%2Ffile%2Fproducts%2Fhealthandsafety%2FCat_252_GB.pdf
72. Centralna baza zdravil - Rezultati iskanja za farmacevtsko učinkovino sertralinijev HCl [citirano 11.4.2018]. Dostopno na:
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=\(%5BSEZNAMUCI%20NKNAZIV%5D=_sertralin*\)&SearchOrder=4&SearchMax=301](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=(%5BSEZNAMUCI%20NKNAZIV%5D=_sertralin*)&SearchOrder=4&SearchMax=301)

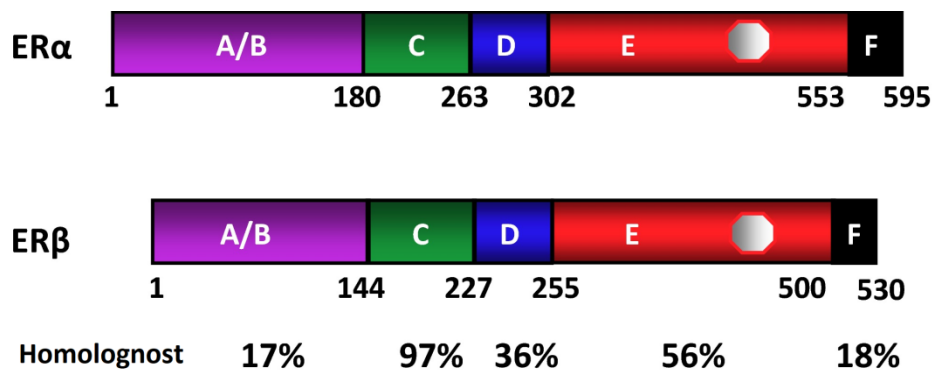
7 PRILOGE

Priloga 1: Približne koncentracije gonadotropinov in hormonov jajčnikov med normalnim ženskim spolnim ciklom. FSH - folikle stimulirajoči hormon, LH - luteinizirajoči hormon.

(14)



Priloga 2: Shematični prikaz strukturnih domen estrogenskih receptorjev α ($ER\alpha$) in β ($ER\beta$). $ER\alpha$ sestoji iz 595 AK, $ER\beta$ pa iz 530 AK. (17)



Priloga 3: *Uporaba klonazepamoma v zdravstvu. V preglednici so navedeni namen uporabe, režim odmerjanja in farmacevtske oblike zdravilne učinkovine klonazepam. (22,23,27,68)*

Uporaba	V osnovi je bil registriran kot protiepileptično zdravilo, kar je še vedno njegov glavni namen. Uporablja se pri večini kliničnih oblik epilepsij pri otrocih in dojenčkih, predvsem pri tipičnih in atipičnih petit mal absencah ter primarnih ali sekundarnih generaliziranih tonično-kloničnih krčih. Pri odraslih se uporablja predvsem pri fokalni epilepsiji. Dobro se je uveljavila tudi njegova uporaba pri zdravljenju številnih psihiatričnih stanj, vključno s panično motnjo.
Odmerjanje	Zdravljenje s klonazepamom je potrebno začeti z majhnimi odmerki, drugače lahko pride do pojava neželenih učinkov. Odmerek se nato postopoma povečuje, dokler se za posameznega bolnika ne doseže vzdrževalni odmerek. Za dosego vzdrževalnega odmerka so običajno potrebni 2–4 tedni zdravljenja. Dnevni vzdrževalni odmerek za odraslo osebo običajno znaša med 4 in 8 mg, za dojenčke (do 1 leta) od 0,5 do 1 mg, za otroke pa med 1,5 in 6 mg (odvisno od starosti). Razdeljen je v 3 ali 4 posamezne odmerke, ki se jemljejo v intervalih preko dneva.
Farmacevtske oblike	Obstaja več farmacevtskih oblik. Najpogosteje se uporablja v obliki peroralnih tablet, nekatera podjetja pa ga ponujajo tudi v obliki oralnih tablet, ki jih raztopimo v ustih, in oralne raztopine. V Sloveniji so v uporabi samo peroralne tablete.

Priloga 4: Osnovne fizikalno kemijske lastnosti klonazepama (22).

Lastnost	Opis lastnosti
Oblika	kristalinični prašek
Barva	rumene barve
Vonj	šibek
Topnost	netopen v benzenu, zelo slabo topen v vodi (100 mg/L pri 25 °C) in rahlo topen v metanolu (8,6 mg/L pri 25 °C), kloroformu (15 mg/L pri 25 °C) ter acetonu (31 mg/L pri 25 °C)
Strukturni opis	triciklična spojina, sestavljena iz dveh benzenskih obročev in enega 1-4-diazepinskega obroča (osnovna struktura benzodiazepinov); v primerjavi z osnovno strukturo benzodiazepinov vsebuje še tri dodatne funkcionalne skupine, in sicer eno kloro, eno keto in eno nitro skupino

Priloga 5: *Uporaba lorazepam v zdravstvu. V preglednici so navedeni namen uporabe, režim odmerjanja in farmacevtske oblike zdravilne učinkovine lorazepam. (30,32,69)*

Uporaba	Lorazepam se uporablja za kratkotrajno zdravljenje hudih anksioznih motenj in kratkotrajno zdravljenje nespečnosti, ki je povezana z anksioznostjo. Zaradi sedativnih lastnosti se uporablja tudi kot pomirjevalo pred diagnostičnimi ali operativnimi posegi v splošni kirurgiji in zobozdravstvu. Uporablja se samo pri zdravljenju odraslih oseb, za osebe mlajše od 18 let pa ni primeren. Uporaba v nosečnosti in med dojenjem ni priporočljiva.
Odmerjanje	Režim odmerjanja in trajanje zdravljenja sta prilagojena vsakemu bolniku posebej. Zdravljenje naj bi bilo čim krajše in bi naj na splošno trajalo od nekaj dni do 4 tedne. Velikost odmerka je odvisna od namena uporabe: <ul style="list-style-type: none">- zdravljenje anksioznosti: 1–6 mg (dnevni odmerek),- zdravljenje nespečnost povezane z anksioznostjo: 1–4 mg, zvečer pred spanjem,- predoperativna priprava: 2–3 mg večer pred posegom ali 2–4 mg eno do dve uri pred posegom.
Farmacevtske oblike	Na trgu je na voljo v več farmacevtskih oblikah, in sicer v obliki tablet, peroralne raztopine in raztopine za injiciranje. V obliki raztopine za intravensko ali intramuskularno injiciranje se uporablja le za zdravljenje statusa epileptikusa in za sedacijo bolnikov pred operacijo. V Sloveniji se uporablja le v obliki tablet.

Priloga 6: Osnovne fizikalno kemijske lastnosti lorazepama (29,70).

Lastnost	Opis lastnosti
<i>Oblika</i>	kristalinični prašek
<i>Barva</i>	skoraj bele barve
<i>Vonj</i>	brez
<i>Topnost</i>	zmerno topen v alkoholu in rahlo topen v kloroformu
<i>Strukturni opis</i>	triciklična spojina, sestavljena iz dveh benzenskih obročev in enega 1-4-diazepinskega obroča (osnovna struktura benzodiazepinov); v primerjavi z osnovno kemijsko strukturo benzodiazepinov vsebuje še 4 dodatne funkcionalne skupine, in sicer dve kloro, eno keto in eno hidroksi skupino

Priloga 7: *Uporaba mianserinijevega klorida v zdravstvu. V preglednici so navedeni namen uporabe, režim odmerjanja in farmacevtske oblike zdravilne učinkovine mianserinijev klorid. (34,37)*

Uporaba	Mianserinijev klorid se je v preteklosti zaradi svojih antidepresivnih učinkov uporabljal za lajšanje simptomov depresije. Deluje tudi anksiolitično in izboljšuje spanje. Zaradi tega je njegova uporaba koristna pri zdravljenju bolnikov s tesnobo ali motnjami spanja, povezanih z depresijo. Danes je njegova uporaba zelo zmanjšana in se na večini trgov ne uporablja več.
Odmerjanje	Dnevni odmerek zdravila je potrebno prilagoditi vsakemu bolniku posebej. Pri odraslih je priporočeno začeti zdravljenje z dnevnim odmerkom 30 mg, ki se ga lahko nato postopoma povešuje vsakih nekaj dni, dokler pri bolniku ni dosežen optimalen klinični odziv. Običajno znaša učinkovit dnevni odmerek 60–90 mg. Pri starostnikih lahko za dosego optimalnega kliničnega odziva zadošča že nižji odmerek od običajnega za odrasle. Mianserinijev klorid se ne sme uporabljati pri osebah mlajših od 18 let. Nenadna prekinitve zdravljenja z zdravilno učinkovino mianserinijev klorid lahko v zelo redkih primerih pri bolniku povzroči odtegnitvene simptome. Njegova uporaba v času nosečnosti in dojenja ni dovoljena, razen če zanjo obstajajo utemeljeni razlogi.
Farmacevtske oblike	Na trgu je na voljo v obliki filmsko obloženih tablet za peroralno administracijo.

Priloga 8: *Osnovne fizikalno kemijske lastnosti mianserinijevega klorida (33,71).*

Lastnost	Opis lastnosti
<i>Oblika</i>	kristalinična trdna snov
<i>Barva</i>	bele barve
<i>Vonj</i>	brez
<i>Topnost</i>	topen v DMSO in metanolu
<i>Strukturni opis</i>	tetraciklična spojina

Priloga 9: Uporaba sertralina v zdravstvu. V preglednici so navedeni namen uporabe, režim odmerjanja in farmacevtske oblike sertralina. (39,44,46,47,72)

Uporaba	<p>Sertralin se pri odraslih uporablja za zdravljenje:</p> <ul style="list-style-type: none">- hudih depresivnih epizod in preprečitev njihovega ponovnega pojava,- posttravmatske stresne motnje,- socialne anksiozne motnje,- obsesivno-kompulzivnih motenj,- paničnih motenj z agorafobijo ali brez nje,- predmenstrualne disforične motnje. <p>Pri otrocih in mladostnikih starih 6–17 let se uporablja samo za zdravljenje obsesivno-kompulzivnih motenj. Uporaba sertralina med nosečnostjo in pri doječih materah ni priporočljiva, razen če pričakovane koristi zdravljenja odtehtajo možno tveganje za plod oziroma dojenčka.</p>
Odmerjanje	<p>Pri odraslih se začne zdravljenje s sertralinom z odmerkom 25 oz. 50 mg dan. Če je odziv bolnika na začetno odmerjanje nezadosten, se lahko odmerek povečuje enkrat tedensko v korakih po 50 mg do ustreznega odziva oz. do maksimalnega dnevnega odmerka. Maksimalen dnevni odmerek znaša 200 mg. Zdravilo se jemlje enkrat dnevno. Pri dolgotrajnem vzdrževalnem zdravljenju je potrebno odmerek ohranjati na najnižji učinkoviti ravni in ga sproti prilagajati glede na terapevtski odziv. Kot pri drugih antidepresivih lahko tudi pri zdravljenju s sertralinom traja več tednov preden so klinični učinki vidni.</p>
Farmacevtske oblike	<p>Na trgu je na voljo v dveh različnih farmacevtskih oblikah, in sicer v obliki filmsko obloženih tablet in koncentrata za peroralno raztopino. V farmacevtskih izdelkih se nahaja v obliki sertralinijevega klorida, na primer 1 filmsko obložena tableta vsebuje 50 mg sertralina v obliki 55,95 mg sertralinijevega klorida.</p>

Priloga 10: Osnovne fizikalno kemijske lastnosti sertralinijevega klorida (41,46).

Lastnost	Opis lastnosti
<i>Oblika</i>	kristalinična trdna snov
<i>Barva</i>	bele barve
<i>Vonj</i>	brez
<i>Topnost</i>	rahlo topen v vodi in izopropilnem alkoholu ter zmerno topen v etanolu
<i>Strukturni opis</i>	triciklična spojina

Priloga 11: Podatki o uporabljenih referenčnih standardih. Za vsak referenčni standard je navedena čistost, molska masa, CAS številka, Proizvajalec in oznaka produkta (Cat. (catalogue number)).

Spojina	Čistost [%]	MM [g/mol]	CAS	Proizvajalec	Cat. #
α-estradiol	$\geq 98,0$	272.38	57-91-0	Sigma	E8750
Corticosterone	$\geq 98,5$	346.46	50-22-6	Sigma	27840
Tamoxifen	$\geq 98,0$	371.51	10540-29-1	Sigma-Aldrich	85256
Flutamide	$> 99,0$	276.21	13311-84-7	Sigma	F9397

Priloga 12: Podatki o uporabljenih reagentih. Za vsak reagent je navedena njegova okrajšava (če jo ima), CAS številka, proizvajalec in oznaka produkta (Cat. (catalogue number)).

Reagenti	Okrajšava	CAS	Proizvajalec	Cat. #
Luciferase Cell Culture Lysis 5X Reagent	CCLR	-	Promega	E1531
Fetal Bovine Serum	FBS	-	Sigma	F6765
Kanamycin solution from <i>Streptomyces kanamyceticus</i>		25389-94-0	Sigma	K0129
Penicillin-Streptomycin		-	Sigma	P0781
ONE-Glo™ Luciferase Assay System		-	Promega	E6120
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	DPBS (PBS)	-	Gibco™	14190-136
Trypan Blue solution		72-57-1	Sigma	T8154
Dimethyl sulfoxide	DMSO	67-68-5	Sigma	D2650
Minimum Essential Medium (no glutamine, no phenol red)	MEM	-	Gibco™	51200046
L-Glutamine - 200mM (100X), liquid	L-GLUT	-	Gibco™	25030
Resazurin		62758-13-8	Sigma	R7017