

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA RAČNIK
DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI PROGRAM KOZMETOLOGIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA RAČNIK

**DOLOČANJE VPLIVA RESVERATROLA IN NJEGOVIH ANALOGOV NA
GLUKOKORTIKOIDNE RECEPTORJE**

**DETERMINATION OF THE EFFECTS OF RESVERATROL AND HIS
ANALOGS ON THE GLUCOCORTICOID RECEPTORS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. ter somentorstvom mlade raziskovalke dr. Katre Kolšek, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za vso pomoč in usmerjanje pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi mladi raziskovalki dr. Katri Kolšek, mag. farm., za vsestransko pomoč pri izvajanju praktičnega dela in za vse koristne nasvete. Hvala tudi Katji in Ivani za prijetne trenutke pri opravljanju laboratorijskega dela.

Posebna zahvala gre moji družini ter partnerju Jaku za vso podporo ter spodbudo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Katre Kolšek, mag. farm.

Ljubljana, 2014

Špela Račnik

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	ii
KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO PREGLEDNIC.....	v
POVZETEK	vi
KLJUČNE BESEDE	viii
ABSTRACT	ix
KEYWORDS	xi
SEZNAM OKRAJŠAV.....	xii
1. UVOD	1
1.1. HORMONSKI SISTEM.....	1
1.2. HORMONSKI MOTILCI	2
1.3. GLUKOKORTIKOIDI.....	5
1.3.1. GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR.....	5
1.4. RESVERATROL.....	6
1.4.1. FARMAKOKINETIKA RESVERATROLA	6
1.4.2. FARMAKODINAMIKA RESVERATROLA.....	9
1.4.3. NEŽELENI UČINKI RESVERATROLA	11
2. NAMEN DELA.....	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. TESTIRANE SPOJINE.....	14
3.2. IZBIRA KONCENTRACIJ SPOJIN ZA DOLOČANJE VPLIVA NA GR.....	15
3.3. PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN	15
3.4. CELIČNA LINIJA MDA-kb2.....	15
3.5. DELO S CELICAMI	16
3.6. ODMRZOVANJE CELIC.....	17
3.7. GOJENJE CELIC	17

3.8.	PRESAJANJE CELIC	17
3.9.	NASAJANJE CELIC	18
3.10.	ŠTETJE CELIC	18
3.11.	TEST VIABILNOSTI	19
3.12.	IZVEDBA TESTA VIABILNOSTI.....	20
3.13.	DOLOČANJE UČINKOV NA GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH	21
3.14.	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	24
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1.	TESTIRANJE VIABILNOSTI.....	25
4.2.	DOLOČANJE GLUKOKORTIKOIDNEGA UČINKA RESVERATROLA IN NJEGOVIH ANALOGOVI	27
4.2.1.	TESTIRANJE GLUKOKORTIKOIDNEGA UČINKA SPOJIN.....	27
4.2.2.	ANTI-GLUKOKORTIKOIDNO DELOVANJE NA GR.....	29
5.	SKLEPI.....	31
6.	LITERATURA.....	33
7.	PRILOGE	37
7.1.	OECD SMERNICE ZA TESTIRANJA	37
7.2.	STRUKTURA GR.....	39
7.3.	METABOLIZEM <i>TRANS</i> -RESVERATROLA	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukture ZMP spojin in resveratrola	14
Slika 2: Struktura barvila MTS ter njegovega produkta formazana	20
Slika 3: Bioluminiscenca katalizirana s kresničkino luciferazo	21
Slika 4: Struktura hidrokortizona (HC)	22
Slika 5: Struktura flutamida (FLUT)	23
Slika 6: Struktura mifepristona (RU-486)	23
Slika 7: Graf rezultatov testiranja citotoksičnosti	26
Slika 8: Graf rezultatov testiranja glukokortikoidnega delovanja spojin na GR	28
Slika 9: Graf rezultatov testiranja antiglukokortikoidnega delovanja spojin na GR	29
Slika 10: Struktura glukokortikoidnega receptorja	39
Slika 11: Strukture <i>trans</i> -resveratrola ter njegovih metabolitov črevesne mikroflore	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: OECD smernice za testiranja	37
--	----

POVZETEK

Resveratrol je polifenol, ki se kot sekundarni metabolit nahaja v rastlinah (v prosti obliki kot aglikon, v glikozilirani kot piceid, obstaja pa v *cis* in *trans* izomerah). V zadnjem času je aktualen s terapevtskega vidika, saj nedavne *in vitro* študije izkazujejo številne pozitivne učinke te spojine. Tako so študije že potrdile njegovo antioksidativno, nevroprotektivno, kemoprotektivno in protivirusno delovanje. Pozitivni učinki so bili žal ugotovljeni pri odmerkih, ki jih je v organizmu zelo težko doseči, saj se resveratrol zelo hitro metabolizira. Zavoljo obetavnih izsledkov študij se raziskovalci vedno bolj usmerjajo k preučevanju analogov resveratrola. V želji po učinkovitih, stabilnih in v terapevtske namene uporabnih učinkovinah, ki izhajajo iz strukture resveratrola, je priprava analogov resveratrola zelo aktualna. Vsaka učinkovina pa mora biti za uporabo varna, s čim manj neželenimi učinki, med katere uvrščamo tudi neželeno delovanje na hormonski sistem. Zaenkrat je o resveratrolu kot hormonskemu motilcu malo podatkov, še največ je znanega o njegovi interakciji z estrogenskimi receptorji. Odločili smo se, da raziščemo vpliv resveratrola ter njegovih analogov na glukokortikoidne receptorje.

Naše delo smo izvedli na celični liniji MDA-kb2, ki izraža endogeni funkcionalni androgeni ter glukokortikoidni receptor in ponuja ponovljivost rezultatov ter raziskovanje učinkov tako na androgeni kot na glukokortikoidni receptor, v primeru glukokortikoidnega receptorja z razlikovanjem glukokortikoidnega ter antiglukokortikoidnega delovanja spojin. Najprej smo z izvedbo MTS testa določili citotoksičnost preiskovanih spojin. Pričeli smo s koncentracijo 50 μM . V primeru pojava oborine (netopnost) ali izkazane citotoksičnosti smo koncentracije spojin ustrezno znižali. Glede na rezultate MTS testa smo spojine testirali v naslednjih koncentracijah: ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 ter resveratrol v koncentraciji 25 μM . ZMP-17 in ZMP-23 smo testirali v koncentraciji 10 μM . Z izvedbo *in vitro* presejalnega luciferaznega testa smo določili učinke spojin na glukokortikoidni receptor. Rezultati luciferaznega testa kažejo, da vse spojine (razen ZMP-9 in ZMP-23) izkazujejo šibko glukokortikoidno delovanje. Antiglukokortikoidnega učinka ni izkazala nobena od testiranih spojin. Rezultati potrjujejo zastavljene delovne hipoteze: resveratrol in ZMP spojine so malo citotoksični in izkazujejo glukokortikoidni učinek, kar jih uvršča med hormonske motilce. Zaradi strukture resveratrola (dva aromatska obroča, tri hidroksilne skupine), ta deluje endokrino in ima višjo aktivnost od analogov z zaetrenimi hidroksilnimi skupinami.

Vrednotenje tveganja za zdravje ljudi je nadvse pomembno, še posebej pri spojinah, ki so v prihodnosti lahko namenjene terapevtski rabi. O toksičnosti resveratrola je trenutno znanega

bolj malo tudi z vidika motenj v hormonskem sistemu, zato je nujno, da se izvedejo študije, ki bodo v večji meri osvetlile tovrstne učinke te nadvse zanimive učinkovine.

KLJUČNE BESEDE

RESVERATROL

ANALOGI RESVERATROLA

HORMONSKI MOTILCI

GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR

ABSTRACT

Resveratrol is a polyphenol that can be found as a secondary metabolite in plants (in free form as aglycone, in glycosylated form as piceid, and it also exists in cis and trans isomers). It has become popular from a therapeutic point of view because the recent in vitro studies show numerous positive effects of this molecule. That is how the studies already confirmed its anti-oxidative, neuro-protective, chemo-protective and antiviral activity. The positive effects were unfortunately determined at dosages that are very hard to attain in an organism. It was also determined that resveratrol metabolizes very quickly. Owing to the promising results of the studies, the researchers are directing themselves more and more towards researching the resveratrol's analogs. The preparation of the resveratrol analogs is in full bloom in the hopes of finding molecules, originating from the resveratrol's structure, that are efficient, stable and fit for therapeutic purposes. Every active ingredient has to be safe for use, with as little side effects as possible, which also includes unwanted effects on the hormone system. For now there is little known about resveratrol as an endocrine disruptor, we know the most about its interaction with estrogen receptors. So we decided to investigate the influence of resveratrol and its analogs on the glucocorticoid receptors.

We performed our research on the cellular line MDA-kb2 that manifests the endogenous functional androgen and glucocorticoid receptor. This cellular line also offers repeatability of the results and research of the effects on the androgen as well as glucocorticoid receptor, by identifying the compound activity as glucocorticoid or antiglucocorticoid impact in the case of glucocorticoid receptor. First, we determined the cytotoxicity of the researched compounds with the MTS test. In the case of the occurrence of a precipitate or demonstrated cytotoxicity we adequately reduced the concentrations of the compounds. Regarding the MTS test results we tested the compounds at the following concentrations: ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 and resveratrol at a concentration of 25 μ M. We tested ZMP-17 and ZMP-23 at a concentration of 10 μ M. By performing in vitro screening luciferase test we determined the effects of the compounds on the glucocorticoid receptor. The results of the luciferase test show that all the compounds are showing weak glucocorticoid effect to the glucocorticoid receptor. None of the tested compounds demonstrated antiglucocorticoid effect on the glucocorticoid receptor. The results confirm our working hypotheses: resveratrol and ZMP compounds are a little cytotoxic and show the effect on the glucocorticoid receptor, so they classify as endocrine disruptors. Due to the structure of resveratrol (two aromatic

rings, three hydroxilic groups), it has an endocrine effect and has a higher activity of analogs with etherified hydroxilic groups.

The human health risk assessment is extremely important, especially with the compounds that can be used for therapeutic purposes in the future. For the moment, there is little known about the toxicity of resveratrol and practically nothing known from the point of view of hormone system disruptions. That is why it is vital to perform the studies that will shed light on the area of this very promising molecule.

KEYWORDS

RESVERATROL

RESVERATROL ANALOGS

ENDOCRINE DISRUPTORS

GLUCOCORTICOID RECEPTOR

SEZNAM OKRAJŠAV

AMPK - encim (AMP-aktivirana protein kinaza)

AR - androgeni receptor

DMSO - dimetilsulfoksid

EDSTAC - posvetovalni komite za testiranje endokrinih motilcev

EDTA - skupina za vrednotenje in testiranje endokrinih motilcev

FBS - fetalni goveji serum

FLUT - flutamid

GR - glukokortikoidni receptor

GREs - na glukokortikoid odzivni elementi (specifična DNA zaporedja na tarčnih genih)

HC - hidrokortizon

HM - hormonski motilci

OECD - Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj

PBS - fosfatni pufer

PES - fenozin etosulfat

RU-486 - mifepriston

SIRT1 - sirtuin (encim za deacetilacijo proteinov celične regulacije)

WHO – Svetovna zdravstvena organizacija

1. UVOD

Resveratrol je obetavna učinkovina in predmet številnih aktualnih študij njegove uporabe v terapevtske namene. V *in vitro* študijah izkazuje kemoprotektivne, nevroprotektivne, protivnetne ter protivirusne učinke, zanimiv pa je tudi kot učinkovina proti staranju. Hkrati pa je znano, da je zelo slabo biorazpoložljiv, ker se hitro metabolizira. Da bi izboljšali farmakokinetične in/ali farmakodinamske lastnosti resveratrola, se razvoj usmerja v izdelavo njegovih analogov. Preden pa lahko pride do terapevtske rabe novih učinkovin, je potrebno med drugim ovrednotiti potencialne toksikološke učinke. Vse bolj postaja pomembno določanje vpliva spojin na endokrini sistem, katerega motenje vodi v različna bolezenska stanja. Dobro so že raziskani vplivi spojin (endokrinih motilcev, EDC) na estrogenski in androgeni, manj pozornosti pa so do sedaj posvečali motnjam v delovanju glukokortikoidnega sistema, kar vodi v številne nepravilnosti metabolizma in rastnih ter reproduktivnih funkcij organizma. Zato smo želeli v tej diplomski nalogi proučiti učinek resveratrola in njegovih analogov na modulacijo glukokortikoidnega receptorskega sistema, saj v svoji strukturi vsebujejo elemente, ki so lahko prepoznavni za vezavno mesto na glukokortikoidnem receptorju.

1.1. HORMONSKI SISTEM

Hormonski sistem preko uravnavanja presnovne aktivnosti tkiv in organov pomembno sodeluje pri vzdrževanju homeostaze telesa. Hormoni, katere endokrine žleze izločajo v kri, povzročajo sorazmerno počasen odgovor za uravnavanje delovanja organov in tkiv. Endokrine žleze ter difuzne endokrine/nevroendokrine celice v kri izločajo specifične hormone, od koder se prenesejo do organov, kjer povzročijo določen učinek. Praviloma so endokrine žleze sestavljene iz otočkov sekrecijskih celic epitelijskega izvora z opornim tkivom, katero je preprejeno s kapilarami in limfno mrežo. Produkt sekrecijske celice se izloči v intersticijski prostor, od koder se hitro resorbira v kri. Zavaljo hitrega prehoda hormonov v kri in po telesu so endokrini tkiva močno ožiljena (1).

Nadledvična žleza je parna žleza v trebušni votlini, ki je obdana s tanko vezivno ovojnico in se nahaja na zgornjem polu pripadajoče ledvice. Je piramidaste oblike, morfološko in funkcijsko sestavljena iz skorje ter sredice. Skorja je odgovorna za sintezo steroidnih hormonov iz holesterola in za njihovo izločanje. Endokrine celice v skorji imajo morfološke značilnosti steroide secernirajočih celic: lipidne kapljice znotraj citoplazme ter dobro razvit gladki endoplazmatski retikulum. Srednja in najširša plast skorje je snopičasta plast, ki ima

celice organizirane v vertikalne stebričke in ločene s kapilarami. V fascikulatni coni endokrine celice izločajo glukokortikoide (kortizol, kortikosteron), pa tudi androgene v manjših količinah. Glukokortikoidi so pomemben del presnove beljakovin, maščob ter ogljikovih hidratov in so vključeni v uravnavo krvnega tlaka (1). Kortizol pospešuje glukoneogenezo s povečanjem katabolizma beljakovin v skeletnem mišičju, v jetrih pa je odgovoren za aktivacijo glukoneogeneznih encimov (2). Klobčičasta plast je tanka cona sestavljena iz majhnih celic združenih v klobčičasta gnezda, bogata s kapilarami. V tej plasti se sintetizirajo ter secernirajo mineralokortikoidi, predvsem aldosteron (uravnava presnovo natrija, kalija in klora) (1).

Hormoni se po svoji zgradbi razlikujejo, lahko so aminokislinski derivati (npr. adrenalin), beljakovine ter polipeptidi (npr. inzulin) ali pa steroidi (npr. kortizol, estradiol, testosteron). Po sprostitvi v krvni obtok, se hormon veže na receptorje v tarčni celici. Receptorji tiroidnega ter steroidnih hormonov se praviloma nahajajo v citoplazmi (jedrni receptorji). S posredovanjem informacij preko membranskih receptorjev pa hormoni realizirajo hitre spremembe, saj preko jedrnih receptorjev poteka sprememba v celici razmeroma počasi. V primeru citoplazemskih receptorjev se kompleks hormon-receptor prenese do jedra in blizu promotorskega mesta sledi vezava neposredno na DNA. S tem je sprožen prepis določenih genov. Po aktivaciji tarčne celice se sproži inhibicijski signal endokrini žlezi (t.i. negativna povratna zanka) in izločanje hormonov se ustavi. Če je raven hormona za presnovni odgovor v tarčnem tkivu prenizka, pozitivna povratna zanka endokrino žlezo spodbudi k povečanemu izločanju hormonov. Tako se homeostaza vzdržuje preko sistema povratne zanke endokrinih žlez. Regulacija cirkulirajočih hormonov (konkretno glukokortikoidov) je podrobneje opisana v poglavju 1.3. Presežni hormoni v telesu so vezani na plazemske vezalne beljakovine, te jih biološko inaktivirajo in po potrebi tudi hitro sprostijo, saj so le prosti hormoni biološko aktivni (1).

1.2. HORMONSKI MOTILCI

Že daleč nazaj v zgodovini so ljudje poznali učinke specifičnih rastlinskih vrst na endokrini sistem. Kmetje so skozi stoletja opazovali učinke določenih rastlin s pašnikov na reproduktivni sistem svojih čred. Kasneje so ugotovili, da gre za rastline z estrogenimi komponentami, med drugim je takšen tudi kumestrol. Zgodovina endokrinologije lahko 20. stoletje razdeli na dve obdobji, v prvi polovici je poudarek na biokemiji in odkritju hormonov, medtem ko se druga polovica osredotoči na identifikacijo hormonskih receptorjev. Beseda hormon se prvič pojavi leta 1905, šele leta 1926 pa sta Kendeall ter Reichstein izolirala in

določila strukturo kortizolu in tiroksinu. V štiridesetih letih prejšnjega stoletja so tudi spojine z učinkom na hormonski sistem postale del prehranske in farmacevtske industrije (kontraceptivi in druga zdravila ter sredstva za hujšanje). Dietilstilbestrol (DES) je sintetični estrogen, ki so ga okrog leta 1940 predpisovali za preprečevanje splava in prezgodnjega poroda, leta 1971 pa ga je Food and Drug Administration (FDA) prepovedala, ker so ugotovili večjo pojavnost vaginalnega raka pri hčerkah mater, ki so jemale DES tekom nosečnosti. Na Japonskem so zaradi riža kontaminiranega s polikloriranimi bifenili (PCB) in polikloriranimi dibenzofurani (PCDF) ženske rojevale manjše otroke z motnjami nevrološkega razvoja. Okrog leta 1970 so ZDA raziskovale prisotnost hormonov v odpadnih vodah, kar je bila posledica množične uporabe kontraceptivov. Sredi devetdesetih let se je zanimanje družbe in toksikološke stroke usmerilo h kemikalijam, drogam in drugim potencialno škodljivim snovem z učinkom na endokrini sistem. To je spodbudilo številne raziskave mehanizmov toksičnega delovanja na endokrini sistem ter vprašanja kumulativne izpostavljenosti HM (3).

Okrog leta 1990 so se pojavila poročila in raziskave o vplivu HM na reproduktivni sistem (rak dojke, padec števila spermijev) ter o številnih nenormalnostih pri živalskih vrstah. Razne organizacije, tudi Svetovna zdravstvena organizacija (WHO), so zbrale strokovnjake s področja toksikologije in endokrinologije in postavile smernice in načela raziskovanja endokrine disrupcije in uvedle pojem »hormonski motilci«. Odprla so se vrata raziskavam in identifikaciji mehanizmov toksičnega delovanja HM ter posledicam izpostavitve tovrstnim spojinam. Leta 1996 je ameriška agencija za zaščito okolja (EPA) implementirala testni program detekcije endokrinih motilcev. To je vodilo k nastanku posvetovalnega komiteja za testiranje HM (EDSTAC) za evalvacijo 50 različnih testiranj estrogenskih, androgenih ter tiroidnih sistemov. Namen EDSTAC je bil, da se testira agonizem, antagonizem in indirektno delovanje kemikalij na endokrini sistem (3).

Leta 1998 je EDSTAC izdala poročilo o uporabi testnih metod za določanje endokrinega delovanja kemikalij. Testiranja so razdelili v dve skupini. Prva skupina testov so testi visoke občutljivosti z majhno specifičnostjo, druga skupina pa zajema ocene tveganja posamičnih kemikalij (npr. opredelitev večgeneracijske reproduktivne toksičnosti). Prva skupina obsega *in vivo* ter *in vitro* študije na sesalcih in *in vivo* študije na neselcih. Tako je namen prvega dela testiranj identifikacija spojin s potencialom za interakcije z estrogenskim, androgenim ali tiroidnim sistemom, čemur sledi nadaljnje testiranje v sklopu druge skupine testov. Drugi sklop testiranj omogoča analizo zbranih podatkov za izdelavo ocene tveganja. Nacionalni toksikološki program (NTP) je s podporo EPA odprl vprašanje učinka majhnih odmerkov HM

na organizem. Sklenili so, da je treba podrobneje raziskati učinke manjših odmerkov HM, kot se sicer uporabijo v raziskavah. Sledilo je tudi vprašanje medsebojnega vpliva mešanic kemikalij na končni toksikološki učinek. Še posebej zahtevno je vprašanje medsebojnega vpliva HM, ki izvirajo iz hrane oz. so zdravila (3). Znotraj EU področje kemikalij industrijske rabe pokriva European Chemicals Agency (ECHA), ki je tudi ključna za izvajanje regulatornega sistema REACH. Regulativa REACH se nanaša na registracijo, evalvacijo in avtorizacijo kemikalij. Proizvajalci so tako dolžni zbrati vse zahtevane informacije o lastnostih posamičnih kemikalij, zbrani podatki pa se zbirajo znotraj ECHA (4). Evropska komisija na področju HM aktivno deluje že od leta 1996. Najprej so sestavili listo potencialnih HM (564 spojin), te kemikalije so bile za vrednotenje predlagane s strani različnih organizacij. Osredotočili so se predvsem na tiste kemikalije, ki se v okolju ali v industriji pojavljajo pogostejše in v večjih količinah in tako predstavljajo tveganje za zdravje. Izbrane kemikalije so zatem razdelili v 3 kategorije: 1. kategorija predstavlja kemikalije z dokazanim endokrinim delovanjem na vsaj eni živalski vrsti, v 2. kategoriji so kemikalije z *in vitro* dokazanim endokrinim delovanjem, 3. kategorija pa zajema kemikalije za katere zaenkrat ni bilo dokazano endokrino delovanje oz. še ne obstaja dovolj podatkov. Kategorija 1 (dokazani endokrini motilci na vsaj eni živalski vrsti) pa se glede na stopnjo izpostavljenosti razdeli na visoko, srednjo ter nizko stopnjo tveganja (5).

Med hormonske motilce ali motilce delovanja endokrinega sistema danes vključujemo vse kemikalije oz. spojine, ki lahko vplivajo na sintezo, sekrecijo, transport, vezavo na receptorje ter eliminacijo endogenih hormonov in tako motijo ohranjanje homeostaznega ravnovesja v organizmu. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj OECD (Economic Cooperation and Development), znotraj katere deluje specifična delovna skupina EDTA (Endocrine Disrupter Testing and Assessment Task Force), je leta 2012 izdala smernice (GD - Guidance Document) testiranja endokrinih motilcev ter vrednotenja kemikalij kot potencialnih endokrinih motilcev. Testiranja zaenkrat zajemajo vpliv na estrogenske in androgene receptorje, tiroidne hormone ter vpletanje kemikalij v steroidogenezo (6, 7). EDTA je strategijo testiranja HM razdelila na 5 nivojev: 1 nivo zajema razvrstitev spojin glede na obstoječe podatke, 2 nivo predstavlja *in vitro* presejalne teste, 3 nivo so *in vivo* specifična testiranja endokrinih motilcev, 4 nivo so *in vivo* testiranja za določanje stranskih učinkov, 5 nivo pa so *in vivo* testiranja skozi več generacij organizmov. Tabela OECD smernic za testiranja se nahaja v Prilogah (Priloga 1) (8). Obstaja veliko testnih sistemov, validiranih in

tudi takšnih, ki niso validirani, omogočajo pa nam ugotavljanje učinkov na endokrine receptorske sisteme, med njimi je zelo pomemben tudi glukokortikoidni.

1.3. GLUKOKORTIKOIDI

Glukokortikoidi nadzirajo metabolične (metabolizem lipidov in proteinov), rastne ter reproduktivne funkcije in so nasplošno zelo pomembni pri uravnavanju homeostaze v telesu (9, 14). So steroidni hormoni skorje nadledvične žleze, ki sodelujejo v odzivu na stres ter regulirajo metabolizem glukoze. Naravni in sintezni glukokortikoidi se široko uporabljajo zaradi protivnetnega delovanja, vendar imajo številne neželene učinke (10). Razpoložljivost naravnih glukokortikoidov (kortizol pri ljudeh in kortikosteron pri glodavcih) v tkivih je odvisna od kortikosteroid-vezalnega globulina v serumu ter lokalno izraženega encima 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaze (11 β -HSD). Koncentracija cirkulirajočih glukokortikoidov je pod močnim vplivom hipotalamusa, hipofize in nadledvične žleze (HPA os). Hormon kortikoliberin (CRH) stimulira izločanje adrenokortikotropnega hormona (ACTH), ki stimulira izločanje kortizola iz nadledvične žleze. Glukokortikoidi povzročijo efekt negativne povratne zanke, kar vpliva na izločanje CRH (vpliv hipotalamusa) in ACTH (vpliv hipofize). Nepravilnosti v aktivaciji oziroma delovanju HPA osi vodijo v številne motnje imunskih in vnetnih odgovorov, metaboličnih procesov in psihosocialnega razvoja (9,11).

1.3.1. GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR

GR je modularni protein sestavljen iz N-terminalne transaktivacijske domene (NTD), centralne DNA vezavne domene (DBD), C-terminalne ligand vezavne domene (LBD) in fleksibilne regije, katera ločuje DBD in LBD. Slika strukture GR se nahaja v Prilogah (Priloga 2). NTD ima močno aktivacijsko funkcijo za transkripcijo (AF1), ki omogoča delovanje koregulatorjev in transkripcijskih faktorjev. Dvojni cinkovi prsti na DBD prepoznajo ter vežejo specifična DNA zaporedja na tarčnih genih (GREs) (11, 12, 13).

GR spada v družino jedrnih receptorjev, ki delujejo kot transkripcijski faktorji, odvisno od liganda. GR je produkt gena NR3C1, kateri se nahaja na kromosomu 5q31-32, ki pa lahko kodira za različne podtipe GR. Homologni receptorski izoobliki, hGR α in hGR β , se razlikujeta v karboksilnih koncih. V vseh humanih tkivih in celicah je izražen hGR α in velja za klasični GR, veže se z glukokortikoidi, se premesti v jedro in rekrutira koregulatorje za izvedbo transkripcijskih dejavnosti. hGR β se nahaja v jedru in predstavlja naravni dominantni inhibitor za hGR α . Kadar ligand ni prisoten, se hGR α nahaja v citoplazmi kot del multiproteinskega kompleksa vezan na šaperonske proteine. Ob vezavi liganda se hGR α loči od kompleksa in dimerizira ter translocira v jedro celice, se veže na DNA (hormonsko

odzivne elemente) in s tem modulira transkripcijsko dejavnost genov odzivnih na glukokortikoide (9,11). Z vezavo glukokortikoidov na GR se tako stimulira transkripcija GREs v tarčnih genih promotorja (transaktivacija) ali pa se glukokortikoidi vežejo na druge transkripcijske dejavnike in zavrejo njihovo delovanje (transrepresija). Z izbiro liganda tako lahko vplivamo na aktivacijo določenih tarčnih genov (10, 11, 14). Pri receptorjih steroidnih hormonov genska aktivacija zahteva vezavo koaktivatorjev, medtem ko je represija genov posredovana s korepresorji. Z glukokortikoidi inducirana ekspresija genov je posredovana preko koaktivatorjev vezanih na GR. Glukokortikoidni antagonist RU-486 se vmešava v z endogenimi glukokortikoidi posredovano aktivacijo ter lahko delno ustavi aktivnost agonista, pri tem odzivu so vpleteni korepresorji (15).

Da lahko jedrni receptor aktivira transkripcijo genov je potrebna vezava liganda na regijo LBD na GR. Hidrofobni del na LBD je namenjen vezavi liganda (za stabilno in transkripcijsko aktivno konformacijo receptorja potrebujemo nastanek vezi med amino kislinami proteina ter ligandom). Med ligandom ter GR nastanejo številne vodikove vezi. V študiji so primerjali afiniteto vezave naslednjih ligandov: aldosterona, kortizola, estradiola, progesterona in testosterona. Izsledki kažejo, da se na GR najmočneje veže kortizol (je endogeni ligand za GR) zavrlo sterične ter elektrostatske kompatibilnosti (ta vezava ima največjo solvacijsko prosto energijo). Ostali ligandi so sicer bolj lipofilni, vendar z GR tvorijo premalo stabilnih vodikovih vezi in fiziološko njihov učinek na ta receptorski sistem ni tako pomemben (16).

1.4. RESVERATROL

Resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroksitilben) je sekundarni metabolit določenih rastlinskih vrst, med drugim grozdja (17, 19). V rastlinah resveratrol najdemo predvsem v obliki *trans*-resveratrol-3-O- β -D-glukozida, znani kot piceid (19). Struktura resveratrola je prikazana v 3. poglavju (Materiali in metode).

1.4.1. FARMAKOKINETIKA RESVERATROLA

Plazemska membrana sesalcev je dvosloj sestavljen iz lipidov in proteinov in je selektivno prepustna ter ločuje zunajcelični prostor od notranjega. Membrana je organizirana v lipidne mikrodomene, ki jih od preostanka membrane prepoznamo po velikih količinah sfingomielina ter holesterola. Lipidni rafti so urejene membranske strukture, rezultat preferenčnega pakiranja sfingolipidov ter holesterola in pokrivajo približno 35 % celične površine. Lipidni rafti so zelo dinamični, lahko se premeščajo zavrlo intracelularnega transporta molekul in indukcije odziva na stimulacije. Zaradi lipofilne narave resveratrola se ta akumulira v lipidnih

raftih preden se endocitozno prenese v citoplazmo. Akumulacija resveratrola v lipidnih raftih je pogoj za aktivacijo kinazno odvisnih signalnih poti (ERKs, JNKs, Akt) ter povzročitev kaspazno odvisne apoptoze v rakavih celicah. V študiji z radiooznačenim resveratrolom so dokazali, da polifenol vstopa v celice preko pasivnih ter olajšanih procesov. Celične mikrodomene torej igrajo ključno vlogo v protirakavem delovanju pa tudi pri absorpciji in distribuciji resveratrola (19). Zaradi hitrega metabolizma so vprašljivi rezultati dosedanjih *in vitro* študij učinkov resveratrola. Resveratrol sicer ima dobro absorpcijo, vendar pa je metabolizem resveratrola nadvse hiter ter obsežen. Dovolj visoke serumske koncentracije za doseg optimalnih učinkov je pri ljudeh skoraj nemogoče doseči, predvsem zavoljo slabe biorazpoložljivosti, kar pa bi lahko izboljšali z optimizacijo dostavnih sistemov za resveratrol (20).

Metabolizem resveratrola je celično specifičen in odvisen od ravni ekspresije encimov. Velika zmožnost biotransformacije ter različni transporterji (MRP2, MRP3, ABCG2) zmanjšajo intracelularne koncentracije resveratrola, kar pomeni tudi manjšo farmakološko razpoložljivost. Biotransformacija resveratrola je kompleksen proces. Pri ljudeh so najpogostejši konjugacijski produkti resveratrol-3-O-glukuronid, resveratrol-3-O-sulfat in resveratrol-4'-O-glukuronid. Študije poleg teh osnovnih monokonjugatov poročajo o številnih izomerih, mono in dikonjugatih. V črevesju poteka metabolizem resveratrola z bakterijami, kar rezultira v dihidroresveratrolu in njegovih glukuronidih ter sulfatih. V plazmi so identificirali še dva resveratrol-C/O-konjugirana glukuronida po odmerku piceida (resveratrol-3-O- β -D-glukozid) na zdravih prostovoljcih. Stopnja glukuronidacije ter sulfatacije pri ljudeh variira glede na polimorfne izooblike sulfotransferaze SULT1A1 ter glukuronosiltransferaze UGT1A1. Metabolizem resveratrola se razlikuje tudi med ljudmi ter drugimi živalmi. V študiji, ki je zajela glodavce, pse ter človeške prostovoljce, so jetrni mikrosomi podgan in miši povzročili večjo količino nastalih glukuroniranih metabolitov kot mikrosomi ljudi ter psov. Kot model za raziskave glukuronidacije resveratrola se tako bolj priporočajo psi kot pa glodavci (17).

V prebavilih in jetrih poteka metabolizem resveratrola v sulfate ter glukuronide. Glede na trenutne podatke so sulfatirani konjugati aktivni, toda njihova aktivnost pada s stopnjo sulfatacije. Sulfatirani konjugati inhibirajo COX-1/2, produkcijo NO ter ROS. V študiji so testirali celični sprejem resveratrola v črevesju in ugotovili, da je pasivna difuzija glavni mehanizem prehoda nekonjugiranega resveratrola. Po intravenozni aplikaciji v miši in podgane se resveratrol porazdeli v številne organe. V analiziranih tkivih so konjugirani

metaboliti v višjih koncentracijah od koncentracije vnešenega resveratrola (17). Serumske koncentracije metabolitov so višje od koncentracij resveratrola, zato je zmožnost metabolitov da ohranijo aktivnost večja. Maksimalna koncentracija nespremenjenega resveratrola v plazmi naraste ob večjih odmerkih, 0,5-5 g na dan, kar pri ljudeh izkazuje minimalne neželene učinke. Pri 5 g peroralnega odmerka je serumska koncentracija nespremenjenega resveratrola 538 ng/mL. O-Alkilirani derivati polifenolov v študijah izkazujejo večjo *in vivo* stabilnost (npr. metilirani polifenoli). Pterostilben, dimetil eterni analog resveratrola, z enako reaktivnostjo do peroksilnih radikalov kot resveratrol, ima pri podganah 80 % biorazpoložljivost, resveratrol pa komaj 20 %. Z ustrezno spremenjenimi analogi resveratrola je tako mogoče doseči večjo biorazpoložljivost (vpliv na metabolizem), ustrezne plazemske koncentracije ter stabilnost molekule (20). V študiji na podganah so ugotovili, da epikatehin, piperin ter kurkumin inhibirajo glukuronidacijo ter sulfatacijo. Kurkumin ter kvarcetin sta znana inhibitorja membranskega prenašalca MRP2 ter BCRP, oboje tako lahko poveča biorazpoložljivost resveratrola (narastejo intracelularne koncentracije resveratrola, kar pomeni večjo farmakološko razpoložljivost). Študija na pacientih kolorektalnega raka je pokazala, da je glede na podatke študij *in vitro*, črevesje idealen tarčni organ za resveratrol (17).

Reakcije mikrobne transformacije fenolov zajemajo redukcijo, dekarboksilacijo, dehidroksilacijo ter demetilacijo. Črevesne bakterije (Coriobacteriaceae) so sposobne resveratrol pretvoriti v dihidroresveratrol, ki se vsaj delno absorbira in metabolizira v konjugirane oblike, ki jih zaznamo v urinu. Mikrobni metabolizem transresveratrola lahko vodi v eno od treh možnih nadaljnjih poti: produkcija lunularina, produkcija dihidroresveratrola ali pa hkratna produkcija dihidroresveratrola in lunularina. Zadnja možnost ponuja dva zaključka: dihidroresveratrol je lahko končni produkt ali pa je zgolj intermediat. Črevesna mikroflora v primeru resveratrola reducira dvojno vez ogljik-ogljik in odstrani eno od dveh meta pozicioniranih hidroksilnih skupin (dehidroksilacija). Študija je poleg že znanega mikrobnega metabolita *trans*-resveratrola *in vivo* in *in vitro* potrdila še dva: 3,4'-dihidroksi-*trans*-stilben ter 3,4'-dihidroksibenzil (t.i. lunularin). Shema metabolizma *trans*-resveratrola je prikazana na sliki v Prilogah (Priloga 3). Lunularin lahko nastane na enega od dveh načinov: preko dehidroksilacije intermediate dihidroresveratrola ali pa preko redukcije intermediate 3,4'-dihidroksi-*trans*-stilbena. V študiji so prostovlji prejeli 0,5 mg *trans*-resveratrola/kg telesne teže (koloidna formulacija). Po 24 h so v vzorcih urina v obliki *trans*-resveratrola zaznali 19,6-41,1 % zaužitega odmerka. Gastrointestinalna mikroflora je odgovorna za metabolizem 8,1-62,7 % *trans*-resveratrola. V vzorcih urina sta med metaboliti

prevladovala lunularin ter dihidroresveratrol. Izsledki študij na tem področju kažejo, da je metabolizem *trans*-resveratrola s črevesno mikrofloro pri ljudeh zelo različen, zavoljo razlik v sestavi črevesne mikroflore med posamezniki je vrsta in razmerje metabolitov *trans*-resveratrola precej variabilno področje. Hepatični ter črevesni metabolizem resveratrola je potrebno še dodatno raziskati, ker še vedno ostaja precej neznank (18). Podatki o farmakokinetiki resveratrola so izjemno pomembni za učinek na GR, saj je bistvo negativnega vpliva na endokrini sistem ravno to, da spojina pride do tarče.

Študije izkazujejo slabo biorazpoložljivost ter hitro metabolično razgradnjo resveratrola, tkivne koncentracije so nadvse nizke. Navkljub velikim vnešenim odmerkom so tako koncentracije resveratrola v organizmu precej manjše od tistih, ki se v *in vitro* študijah izkažejo kot učinkovite (17, 20). V študijah na ljudeh ob peroralnem odmerku 25 mg resveratrola so zaznali 70 % absorpcijo, plazemske koncentracije resveratrola ter njegovih metabolitov skupno so bile 490 ng/mL z maksimalno koncentracijo nespremenjenega resveratrola pod 5 ng/mL v razpolovnem času 9 ur. Biorazpoložljivost nespremenjenega resveratrola je bila tako blizu nič. Visoka absorpcija ter hitri metabolizem pri peroralnem zaužitju dajeta pod vprašaj številne *in vitro* študije pozitivnih učinkov resveratrola z uporabljenimi visokimi koncentracijami (20).

1.4.2. FARMAKODINAMIKA RESVERATROLA

V *in vitro* študijah ter na živalskih modelih je resveratrol dokazano učinkovit kot preventiva in v zdravljenju rakavih obolenj, pri vnetjih, kardiovaskularnih obolenjih, deluje nevroprotektivno in protivirusno. Lahko je uporaben v boju proti debelosti, sladkorni bolezni in staranju. Dokazano podaljša življenjsko dobo kvasovk, črvov, muh in rib (17, 20, 21, 24). Resveratrol svoje pozitivne učinke posreduje preko različnih molekulskih mehanizmov: ima antioksidativno delovanje, inhibira NF- κ B (provnetni transkripcijski faktor), aktivira AMPK (20, 25). AMPK se aktivira v primeru celičnega stresa (postenje, telovadba) in je nadzorovana s cirkulirajočimi hormoni ter hranili. Aktivacija AMPK poveča oksidacijo maščobnih kislin ter fosforilira in aktivira PGC1 α , kar vodi v povečanje mitohondrijske biogeneze (26). S citoprotektivnimi učinki resveratrola sta povezana tudi zmanjšana NO produkcija ter manjša ekspresija NOS-2 (21).

Resveratrol dokazano zniža nivo glukoze v krvi ter ščiti celice trebušne slinavke (odgovorne za produkcijo insulina) pred oksidativnim stresom, kar so potrdile študije na živalih. Tako resveratrol obeta veliko na področju preprečevanja ter zdravljenja sladkorne bolezni.

Občutljivost na inzulin se pri jemanju resveratrola poveča (pri tem pomembno vlogo igra aktivacija AMPK ter povečanje izražanja SIRT1), kot podporna terapija zdravljenja sladkorne bolezni resveratrol lahko pripomore k boljšemu počutju ter manjših odmerkih insulina za bolnike (22).

Resveratrol je pri zdravljenju ter preprečevanju kardiovaskularnih bolezni obetaven, saj stimulira endotelijsko produkcijo NO, inhibira vaskularno vnetje ter prepreči agregacijo trombocitov. Agregacija trombocitov igra pomembno vlogo pri aterotrombotičnih procesih in učinkovine, ki ta pojav preprečujejo, pomembno zmanjšajo možnost infarkta in kapi. Študije na živalih so potrdile tudi pozitivno vlogo resveratrola pri zdravljenju visokega krvnega tlaka. Resveratrol je tako na področju kardiovaskularnih obolenj (npr. povišan krvni tlak, srčna kap, bolezni srčnih zaklopk, ateroskleroza ipd.) primeren za terapijo ogroženih skupin populacije (22).

Študije kažejo, da resveratrol pripomore pri zdravljenju nevrodegeneracije v primeru demence ter Alzheimerjeve bolezni. Eksperimentalno so že bili dokazani tudi učinki resveratrola pri preprečevanju epileptičnih napadov. Resveratrol je na področju terapij živčnega sistema predmet študij predvsem na področju celične rasti in diferenciacije nevronov, potrebno pa je še natančneje raziskati, na katera področja živčnega sistema pravzaprav deluje in na kakšen način (23).

Tudi varovanje pred oksidativnim stresom bi lahko bilo posredovano preko SIRT1, vendar je mehanizem zaenkrat še slabo razjasnjen (24). Resveratrol v študijah dokazano stimulira aktivnost histonske deacetilaze SIRT1, kar bi lahko bil najpomembnejši mehanizem metaboličnih učinkov te molekule (21, 25). Mišično popuščanje je povezano z manjšo ekspresijo ter aktivnostjo histonskih deacetilaz, tudi SIRT1. Študije kažejo, da resveratrol ščiti skeletno mišičje pred vplivom kataboličnih stanj (uporaben bi torej lahko bil v terapiji diabetesa, mišične distrofije) (26).

Resveratrol lahko zakasni ali prepreči kancerogenezo. Ti učinki so dokazani na celični in molekularni ravni v *in vivo* ter *in vitro* študijah. Resveratrol prepreči pojav/razrast karcinomov z inhibicijo cikla tumorskih celic, aktivira signalne poti, ki vključujejo kinazne aktivacije in/ali inducira proteolitično kaskado kaspaz kar vodi do tumorske celične apoptoze (19). Študija, kjer so bolniki s kolorektalnim rakom resveratrol prejeli 8 x dnevno, 29 dni, v odmerkih 0,5 do 1 g, je nakazala vlogo kemoprotektivne učinkovine, celična proliferacija rakavih celic je upadla za 5 %. Bolniki s kronično limfatično levkemijo so 1 mesec prejeli

5 g resveratrola na dan, vzorce krvi so jim pregledali 4 tedne pred in 4 tedne po terapiji z resveratrolom. Resveratrol je rahlo zmanjšal raven N-acetilglukoamina (marker tumorske progresije, posledica je manjše število belih krvnih celic) (17).

Resveratrol je tudi šibek inhibitor aromataze, kar bi lahko povezali z ugodnim učinkom jemanja pri nekaterih vrstah raka (predvsem hormonsko odzivnega raka dojk). Tako so skušali razviti številne analoge resveratrola – inhibitorje aromataze. Z menjavo dvojne vezi pri *trans*-stilbenresveratrolu s tiadiazolnim obročom ter z nekaj dodatnimi spremembami dobimo 3,5-dipiridil-1,2,4-tiadiazole, obetajoče nesteroidne inhibitorje aromataze. Optimizacija strukture resveratrola je v primeru takšnih piridiltiazolnih analogih resveratrola vplivala na večjo aktivnost, saj so te spojine do 6000 x bolj učinkovite kot resveratrol. Resveratrol na splošno prikazuje precej širok spekter inhibicije kancerogeneze na nivoju iniciacije, promocije ter progresije in ima vsaj eno močno afinitetno tarčo – kinon reduktazo-2 in verjetno deluje preko več mehanizmov, ki so zaenkrat še slabo raziskani (20).

Podatki o biološki aktivnosti konjugatov resveratrola z glukuronsko kislino so še pomanjkljivi. Resveratrol-3-O-glukuronid izkazuje zmerno inhibicijo COX-1 ter COX-2 in nima antiestrogenske aktivnosti. Resveratrol-3-O-glukuronid ter resveratrol-4'-O-glukuronid pripomoreta k delovanju resveratrola proti debelosti saj spodbudita delipizacijske učinke v dozorevajočih preadipocitih ter zrelih adipocitih. Resveratrol-3-O-sulfat, resveratrol-3-O-glukuronid in resveratrol-4'-O-glukuronid so v študiji močno inhibirali rast rakavih celic črevesja (17). Aktivnost sulfatnih metabolitov pada s stopnjo sulfatacije, z nekaj izjemami (3-sulfat je močnejši od resveratrola pri inhibiciji COX-1, ostali sulfati pa so manj učinkoviti) (20).

1.4.3. NEŽELENI UČINKI RESVERATROLA

V enoletnih študijah jemanja resveratrola pod 100 mg dnevno niso zaznali neželenih učinkov. Pri odmerkih 1 do 1,5 g na dan pa so v kratkotrajnih študijah zaznali nekaj stranskih učinkov (driska, vročinski oblivi). Pri odmerkih nad 2,5 g na dan se pojavita še bruhanje ter abdominalne bolečine. Pri bolnikih, ki so prejeli po 5 g resveratrola dnevno so zaznali ledvično toksičnost, pri zdravih prostovoljcih pa ne. Obstajajo literaturni podatki o interakcijah resveratrola z drugimi zdravili. Novejše *in vitro* ter študije na živalih kažejo, da resveratrol poveča raven testosterona in inhibira estradiol (deluje kot kompetitivni antagonist), kar nakazuje, da resveratrol moti homeostazo endogenih hormonov (17). Nedavno je bilo dokazano, da resveratrol in določeni analogi oslabijo steroidogenezo v Leydigovih celicah

(osnovna funkcija zarodnih ter odraslih je produkcija androgenov) preko zaviranja izražanja StAR in citokroma P450c17. Fitoestrogeni ter BPA (bisfenol A) negativno vplivajo na funkcijo Leydigovih celic, kar vodi v zmanjšane koncentracije androgenov. To lahko pripomore k pomanjkljivi maskulinizaciji moškega urogenitalnega trakta razvijajočega se ploda, kar rezultira v številnih motnjah omenjenega organskega sistema. Vpliv omenjenih HM na funkcijo Leydigovih celic je odvisen od časa izpostavljenosti, odmerka, stopnje razvoja tarčnega organizma ter ostalih dejavnikov. Disfunkcija zarodnih Leydigovih celic zaradi HM lahko v prihodnosti pomeni nepopolno maskulinizacijo in razvoj moškega reproduktivnega sistema, tako pri ljudeh, kot pri živalih, zato je potrebno ugotoviti, v kakšni meri smo takšnim spojinam lahko izpostavljeni brez neželenih učinkov (6).

2. NAMEN DELA

Napredek človeštva na vseh področjih rezultira v razvoju vedno novih spojin, uporabnih v mnogih segmentih življenja. Moderen način življenja terja svoj davek, saj v okolico v obliki odpadkov oz. odpadnih produktov odlagamo številne potencialno nevarne kemikalije. Tako sta razvoj toksikologije ter njena nenehna odkritja bistvenega pomena za zdravje ljudi in ostalih organizmov na svetu. Pomemben del toksikoloških študij je preučevanje HM v naši okolici. Gre za spojine, ki preko različnih mehanizmov motijo normalno delovanje hormonskega sistema. Te spojine so negativni zunanji dejavniki, kateri lahko spremenijo koncentracije hormonov v telesu, najpogosteje zaradi vezave na hormonske receptorje preprečijo učinkovanje naših hormonov ali pa s posnemanjem našemu telesu naravno prisotnih hormonov povzročijo prekomerno delovanje in izražanje le-teh.

V diplomski nalogi bomo z uporabo *in vitro* testiranja določili glukokortikoidno ter antiglukokortikoidno delovanje izbranih spojin na GR. Testirali bomo resveratrol ter njegove analoge, skupno 9 spojin (slika 1), katerih vpliv na glukokortikoidni sistem še ni raziskan. Prvi del našega eksperimentalnega dela bo testiranje citotoksičnosti za obravnavane spojine v prvotno izbrani koncentraciji 50 μ M, ki jo bomo v primeru izkazane citotoksičnosti ustrezno znižali za nadaljnja testiranja. Po določitvi meje citotoksičnosti za vsako izmed testiranih spojin sledi t.i. luciferazni test (funkcijski test), s katerim lahko določimo glukokortikoidno oz. antiglukokortikoidno delovanje posamične spojine. Delali bomo s celično linijo MDA-kb2, ki je nezahtevna za gojenje ter vzdrževanje celic, ustrezno občutljiva, stabilna ter daje ponovljive rezultate. Omenjena celična linija vsebuje človeške epitelijske celice raka dojke, te izvirne celice izražajo endogene, funkcionalne AR ter GR (27). Aktivnost luciferaze (bioluminiscenca) pokaže biološko aktivnost preiskovanih spojin. Osnovana je na interakciji encima luciferaze s substratom luciferinom, kjer se poleg nastanka encimskega produkta sprošča svetloba. Pri testiranju delovanja spojin na omenjeni celični liniji vedno blokiramo enega izmed receptorjev, da vidimo učinek na drugega. Rezultati, ki jih bomo dobili, nam bodo pomagali pri potrditvi ali zavrnitvi naslednjih hipotez:

- Resveratrol in ZMP spojine so nizko citotoksični za celično linijo MDA-kb2.
- Glede na kemijsko strukturo (podobnost z DES, ima aromatske OH) bo resveratrol deloval na GR.
- Tako kot resveratrol imajo tudi analogi (ZMP spojine) učinek na GR.
- Analogi resveratrola z zaetrenimi –OH skupinami bodo imeli manjšo aktivnost na GR kot resveratrol.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. TESTIRANE SPOJINE

Za resveratrol in njegovih 8 rigidiziranih analogov nas je zanimalo, ali modulirajo aktivnost GR. Strukture resveratrola in analogov so predstavljene na sliki 1.

IME	STRUKTURA
ZMP-9	
ZMP-15	
ZMP-17	
ZMP-20	
ZMP-21	
ZMP-23	
ZMP-24	
ZMP-25	
resveratrol	

Slika 1: Strukture ZMP spojin in resveratrola.

Resveratrol je predmet številnih trenutno aktualnih raziskav zaradi mnogih pozitivnih učinkov, saj deluje: antioksidativno, protivnetno, kardioprotektivno, nevroprotektivno, protivirusno. Vendar pa zaradi svoje strukture ni tako učinkovit ter tarčno specifičen, kot bi si

želeli. Tako se razvoj na tem področju usmerja v pripravo njegovih analogov in vrednotenje njihovih učinkov (28).

ZMP spojine so rigidizirani derivati resveratrola. Od resveratrola se razlikujejo v obročnem oksadiazolskem obroču, ki namesto etilenske skupine povezuje oba aromatska obroča, poziciji hidroksilnih skupin ter v metiliranju teh hidroksilnih skupin.

3.2. IZBIRA KONCENTRACIJ SPOJIN ZA DOLOČANJE VPLIVA NA GR

Preiskovane spojine smo glede na rezultate citotoksičnosti predhodno izvedenega MTS testa (test uporabljen za iskanje meje citotoksičnosti, opisan v nadaljevanju) testirali v koncentraciji 50 μ M oz. v primeru obarjanja spojin v ustrezni nižji koncentraciji 25 μ M, 10 μ M ali pa 1 μ M. Za vrednost največje oz. prvotno izbrane koncentracije za testiranje (50 μ M) smo se odločili glede na verjetnost pojavljanja posamične spojine v okolju/organizmih v tej koncentraciji. Da smo koncentracije spojin za testiranje ustrezno izbrali, smo pod mikroskopom spremljali morebitne kristale oz. oborino spojine v mediju. Tako smo določili najvišjo koncentracijo vsake spojine za nadaljnje poskuse. Oborina se je pojavila v primeru, da je bila koncentracija spojine previsoka in posledično spojina ni bila topna.

3.3. PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN

Priprava raztopin za testirane spojine je potekala v epicah, v 1000 x višji koncentraciji od kasneje testirane. Najprej smo spojine natehtali na analitski tehtnici (Mettler Toledo, Greifensee, Švica) ter jih nato raztopili v 99,8 % DMSO (Sigma-Aldrich, MO, ZDA). Spojine raztopljene v DMSO smo hranili na -20 °C. Nadaljnje redčenje spojin smo izvedli z gojitvenim medijem (naveden v poglavju 3.5.). V primeru, da se je pri predhodnem testu citotoksičnosti pojavila oborina, smo morali pripraviti ustrezno nižje koncentracije raztopin spojin. Omenjeno redčenje smo izvedli v epicah z 0,2 % DMSO v gojitvenem mediju. Na koncu je vsaka epica vsebovala 0.998 mL medija ter 2 μ L spojine raztopljene v DMSO.

3.4. CELIČNA LINIJA MDA-kb2

Pri eksperimentalnem delu smo se odločili za delo s pritrjeno (t.i. adherentno) celično linijo MDA-kb2 (ATCC, Nemčija) zaradi številnih ugodnih lastnosti, ki ustrezajo namenu našega dela. To linijo so pridobili s stabilno transfekcijo iz MDA-MB-453 linije človeških epiteljskih celic raka dojke. Omenjene izvirne celice izražajo endogene funkcionalne AR ter GR, v manjšem obsegu tudi ER β . Receptorski vektor MMTV.luciferase.neo (ta vsebuje na glukokortikoide in androgene odzivno promotorsko zaporedje ter reporterski gen za

luciferazo), so vstavili celicam MDA-MB453 (29). Za izbrano linijo smo se pri eksperimentalnem delu odločili zaradi prednosti, ki jih nudi: dobra občutljivost in specifičnost, celice so nezahtevne za gojenje ter vzdrževanje, odzivnost celic je stabilna preko 80 pasaž, transfekcije niso potrebne, testi so hitro izvedljivi, rezultati ponovljivi, linija pa omogoča določanje učinkov tako androgenih kot glukokortikoidnih receptorjev, v primeru GR z razlikovanjem glukokortikoidnega ter antiglukokortikoidnega delovanja spojin (30).

3.5. DELO S CELICAMI

Delo s celicami smo izvedli v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka LAF komori (Iskra, Šentjernej, Slovenija). LAF komora deluje kot primarna bariera, ki ščiti material pred zunanjimi kontaminanti, pa tudi osebje in sam laboratorij pred potencialno škodljivimi spojinami/celicami oz. organizmi, s katerimi delamo. Aseptično delo pomeni, da preprečimo kontaminacijo sterilnega materiala ali objektov, da pridejo v kontakt s kontaminanti. Kritična področja aseptičnega laboratorijskega dela so: delovni prostor, material, oprema, procesi ter naprave za sterilizacijo ter osebje. Vse, kar pride v kontakt s celicami, mora biti sterilno oziroma nekontaminirano. To vključuje medij, vodo, instrumente, pa tudi okolje, kateremu so kulture izpostavljene med prenosi tekom rasti ali poskusa oz. testiranja. Za osebje je nadvse pomembno, da imajo laboratorijske halje, copate, ustrezne rokavice za delo v laboratoriju in po potrebi zaščitna očala. Po zaključenem delu se rokavice odvržejo, prav tako se zavržejo vsi instrumenti za enkratno uporabo, ki so prišli v stik z biološkim materialom. Delovno okolje vedno razkužimo s 70 % etanolom, enako velja za vse pripomočke v LAF komori ter rokavice (31).

Za vzdrževanje oz. gojitev celic smo potrebovali naslednje reagentne:

- L-15 (Leibovitz) medij (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- fetalni goveji serum - FBS (Gibco, USA),
- raztopino antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 µg/mL (Sigma-Aldrich, MO, ZDA),
- DMSO 99.8 % (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- fosfatni pufer - PBS (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- tripsin (Sigma-Aldrich, Nemčija) in

- barvilo tripan modro (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Gojitveni medij sestavljajo prvi trije reagenti s seznama.

3.6. ODMRZOVANJE CELIC

Celična kultura, ki smo jo uporabili za delo, je bila sprva shranjena z zamrzovanjem v tekočem dušiku na $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$. V krioviali (TPP, Transadingen, Švica) volumna 1 mL smo imeli shranjenih približno 6×10^6 celic. Da smo lahko pričeli z delom, smo kriovialo s celicami vzeli iz posode s tekočim dušikom ter hitro odtajali v vodni kopeli na približno $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (do odtalitve). Takoj smo celice prenesli v 15 mL centrifugirko ter jim dodali približno 9 mL gojitvenega medija. Za centrifugiranje smo kot protiutež v centrifugo dali centrifugirko z 10 mL vode. Centrifugirali smo 5 minut na 900 obratih/min, zatem odpipetirali in zavrgli supernatant. S postopkom centrifugiranja smo se tako znebili našega krioprotektanta (10 % DMSO). Celice iz dobljenega sedimenta smo resuspendirali v približno 5 mL gojitvenega medija, vse skupaj nežno vorteksirali in dobljeno suspenzijo prenesli v gojitveno posodo površine 75 cm^2 (TPP, Transadingen, Švica). Paziti smo morali, da je medij zares prekril vso površino gojitvene posode.

3.7. GOJENJE CELIC

Za rast ter preživetje celic so potrebni optimalni pogoji. Zato smo celice celične linije MDA-kb2 gojili v sterilnih gojitvenih posodah (plastenke oblike T s perforiranim zamaškom) v inkubatorju MCO-18AIC (Sanyo, USA) na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri atmosferskih pogojih. Za preživetje celice potrebujejo gojitveni medij ustrezne sestave. Medija smo potrebovali približno 7-10 mL, da je prekril dno gojitvene posode.

Medij smo pripravili po naslednjem postopku: 500 mL mediju Leibovitz smo dodali 50 mL FBS ter 5 mL antibiotika (10000 U/mL penicilina in 10000 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina).

Pripravljeni medij smo shranjevali v hladilniku in ga pred vsako uporabo segreli v vodni kopeli ali v inkubatorju na približno $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med gojenjem celic smo medij menjali vsake 2 do 3 dni.

3.8. PRESAJANJE CELIC

Celice se presajajo, ko dosežejo približno 80 % konfluenco. Ta pogoj smo preverili pod invertnim svetlobnim mikroskopom Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japonska). Celice smo v povprečju presajali na 7 dni, edino po postopku odmrzovanja potrebujejo nekoliko več časa za normalno rast.

Pred presajanjem celic gojitveni medij, tripsin (predhodno ga 10x redčimo) ter PBS segrejemo na vodni kopeli na približno 37 °C. Pri tripsinu moramo biti pri segrevanju pazljivi, ker s segrevanjem pada njegova aktivnost.

Za odlepljenje adherentnih celic smo najprej odstranili medij, celice smo sprali s približno 5 mL PBS (s tem smo odstranili FBS, ki inhibira tripsin) in zatem odstranili PBS ter dodali 5 mL redčenega tripsina. Odlepljenju je sledila 4 minutna inkubacija v inkubatorju na 37 °C. Po inkubaciji smo uspešnost odlepljenja celic preverili pod mikroskopom. Celično suspenzijo smo zatem s serološko pipeto za enkratno uporabo (TPP, Transadingen, Švica) prenesli v centrifugirko volumna 15 mL, dodali 5 mL gojitvenega medija (FBS ustavi delovanje tripsina) in to centrifugirali 5 minut na 1200 obratih/min. Odpipetirali smo dobljeni supernatant ter ostanek resuspendirali v 5 mL gojitvenega medija s pipeto oz. po potrebi z vibracijskim mešalnikom (Biosan, Latvija). Po priporočilu proizvajalca smo celice presajali v razmerju 1:2 (27).

3.9. NASAJANJE CELIC

Za nasaditev celic smo uporabljali mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami. Za izvedbo testa citotoksičnosti smo celice nasadili na prozorne plošče tipa 92096 (TPP, Transadingen, Švica). Za izvedbo luciferaznega testa smo uporabili bele plošče Microlon Lumitrac 600 (Greiner bio-one, Kremsmünster, Avstrija). Postopek nasajanja celic je precej podoben presajalnemu, le da na koncu celice v drugi koncentraciji prenesemo v vdolbine mikrotitrskih plošč namesto v gojitvene posode. V vsako vdolbino mikrotitrne plošče smo prenesli po 100 µL suspenzije, ki je vsebovala 10^4 celic. Suspenzijo smo v vdolbine nanašali z avtomatsko multikanalno pipeto (Biohit, Helsinki, Finska). Pred nanašanjem v vdolbine smo pod mikroskopom šteli celice, da smo z izračunom dobili volumen suspenzije s priporočenim številom celic za vnos v vdolbine. Izračunanemu volumnu smo dodali še količino gojitvenega medija za ustrezno koncentracijo celic (10^5 celic/mL).

3.10. ŠTETJE CELIC

Da smo dobili priporočeno število celic za nasajanje ali presajanje, smo vedno najprej šteli celice v sami suspenziji in tako dobili ustrezen volumen suspenzije celic. Za štetje celic smo uporabljali barvilo tripan modro, ki mrtve celice obarva modro, žive celice pa so na pogled svetlejše. Po določenem času omenjeno barvilo deluje citotoksično tudi na žive celice in jih obarva.

Najprej smo v epico odpipetirali 80 μ L suspenzije celic ter jim dodali enako količino barvila. Vsebinsko epice smo homogeno premešali s pipeto. Na hemocitometer (Brand, Wertheim, Nemčija) smo nanесли 1 μ L homogene suspenzije in pod svetlobnim mikroskopom šteli žive celice. Hemocitometer je priprava namenjena štetju celic, ta objektna ploščica vsebuje t.i. Neubauerjeve komore. Najpogosteje se uporabljajo dvojne komore, torej imamo dva ločena prostora, katera lahko posamično polnimo s suspenzijo celic za štetje (32). Celice smo prešteli v skupno štirih kvadrantih. Število celic v celotnem volumnu naše suspenzije smo izračunali po naslednji formuli:

$$(A+B+C+D)/4 \times R \times K_p \times V$$

A, B, C, D predstavljajo število celic v posamičnih kvadrantih. Prešteli smo celice v vseh 4 kvadrantih ter nato izračunali povprečno število celic na 1 kvadrant.

R je faktor redčenja. Mi smo redčili 80 μ L celične suspenzije z 80 μ L barvila tripan modro.

K_p je volumen, v katerem štejemo celice.

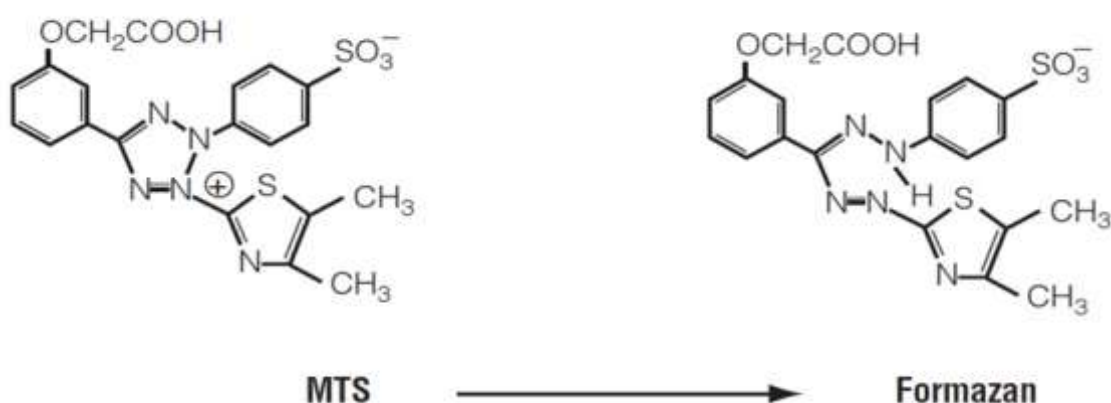
V je volumen suspenzije, v katerem so bile celice resuspendirane.

3.11. TEST VIABILNOSTI

Kadar celice izpostavimo citotoksičnim spojinam, to rezultira v različnih pojavih. Pride lahko do sprememb v metabolizmu celic ali pa do celične smrti. Poznamo več različnih testov citotoksičnosti: test viabilnosti (kratkotrajni odziv, npr. spremenjena prepustnost membrane), test preživetja (dolgotrajna ohranitev obnovitvene kapacitete, vsaj 5-10 generacij), metabolni test (spremembe v metabolizmu po tretiranju celic) ter inflamatorni test (izločanje dejavnikov vnetja) (33). Odzivnost testa na testirane spojine je odvisna od: medija, izmenjave plinov ter izhlapevanja tekočine. Celice se na toksine odzovejo v odvisnosti od mehanizma celične smrti, koncentracije toksina ter trajanja izpostavljenosti (34).

Pri eksperimentalnem delu smo se odločili za izvedbo metabolnega oz. MTS testa, s katerim že kmalu po tretiranju celic z izbranimi spojinami določimo metabolne spremembe. MTS test so poimenovali po glavni komponenti reagenta, barvilu MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol). MTS reagent (Cell Titer 96® AQueous One Solution Reagent) je pravzaprav zmes barvila MTS v obliki soli ter fenozin etosulfata

(PES), ki je reagent za prenašanje elektronov (35). MTS test je osnovan na pretvorbi tetrazolijeve soli v obarvan, vodotopen produkt formazana preko mitohondrijske aktivnosti živih celic pri 37 °C (36). Omenjena pretvorba je prikazana na sliki 3. NADH ter NADPH preneseta na PES svoj elektron, ta reducira MTS do obarvanega formazana (34). Količina formazana je direktno proporcionalna številu živih celic v kulturi ter jo lahko pomerimo pri 492 nm. MTS test se je izkazal za finančno ugodno izbiro, je dobro občutljiv, hiter in daje zanesljive rezultate (36).



Slika 2: Struktura barvila MTS ter njegovega produkta formazana (37).

3.12. IZVEDBA TESTA VIABILNOSTI

Za izvedbo MTS testa smo potrebovali:

- L-15 (Leibovitz) medij (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- FBS (Gibco,USA),
- raztopino antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 µg/mL (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- DMSO 99.8 % (Sigma-Aldrich, Nemčija) in
- reagent MTS; Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI, ZDA).

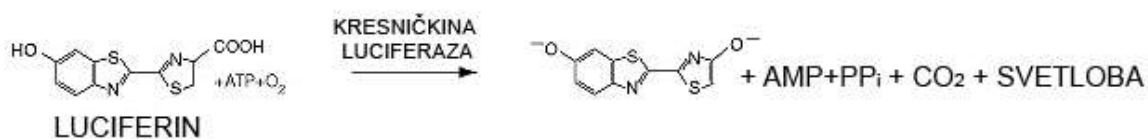
Gojitveni medij sestavljajo prvi trije reagenti s seznama.

Testiranje izbranih spojin smo pričeli v naslednjih koncentracijah: 50 μM , 25 μM ter 10 μM . Gojitveni medij je predstavljal našo kontrolo, 0.2 % DMSO v mediju pa kontrolo topila. Izvedba MTS testa je trajala 3 dni.

Prvi dan je potekalo nasajanje celic na mikrotitrsko ploščo, sledila je 24 urna inkubacija na 37 °C pri atmosferskih pogojih (redkost pri delu s celicami, praviloma se celice namreč goji na 37 °C s 5 % CO_2). Drugi dan izvedbe smo gojitveni medij odstranili in na celice nanegli raztopine preiskovanih spojin ali pa kontrolo ter gojitveni medij. Celice z nanešenimi raztopinami spojin so stimulirane, celice, na katere smo nanegli kontrole, pa so nestimulirane. Po inkubaciji smo mikrotitrsko ploščo s celicami pogledali pod mikroskopom in iskali morebitne oborine preiskovanih spojin. Nato smo dodali 10 μL MTS reagenta, vse skupaj postavili v inkubator za 3 ure in zatem s čitalcem za mikrotitrsko plošče Synergy H4 Hybrid Reader (Bio Tek, USA) pri 492 nm merili absorbanco. Kot ozadje smo posneli absorbanco za 0.2 % DMSO v gojitvenem mediju, t.i. slepa kontrola brez celic. Na koncu smo od absorbance stimuliranih ter nestimuliranih celic odšteli ozadje. Rezultat preživetja celic smo podali relativno glede na kontrolo.

3.13. DOLOČANJE UČINKOV NA GLUKOKORTIKOIDNIH RECEPTORJIH

Nekatere spojine lahko preko GR povzročijo biološki odziv, v celici se sproži veriga signalnih reakcij, kar se izrazi v sintezi specifičnih proteinov, ki so povzročitelji biološkega odgovora. Te proteine v *in vitro* testiranjih določijo glede na merljive, sicer posredne parametre, kateri so v neposredni povezavi s koncentracijo aktivne spojine. Tako merimo relativno biološko aktivnost izbrane spojine glede na kontrolo. Luciferazni test smo izvedli za posredno določitev delovanja spojin. Gre za test s poročevalskim genom. Ta test temelji na izražanju reporterskega gena, ki kodira encim luciferazo. Reporterski gen se uravnava s promotorskim zaporedjem, na to zaporedje se v obliki kompleksa z ligandom veže GR kot transkripcijski faktor. Aktivnost luciferaze, bioluminiscenca, je pokazatelj biološke aktivnosti preiskovanih spojin in je osnovana na interakciji encima luciferaze s substratom luciferinom, kjer se poleg nastanka encimskega produkta sprošča tudi svetloba (slika 3) (38).



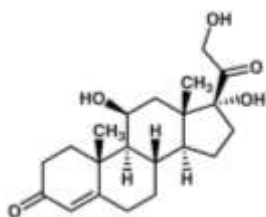
Slika 3: Bioluminiscenca katalizirana s kresničkino luciferazo (39).

Za izvedbo luciferaznega testa smo potrebovali:

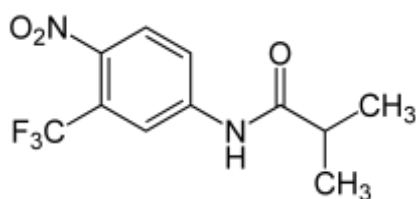
- L-15 (Leibovitz) medij (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- FBS (Gibco, USA),
- raztopino antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 µg/mL (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- DMSO 99.8 % (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- PBS (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- izhodni lizirni pufer Reporter Lysis 5X Bufffer (Promega, Madison, WI, ZDA) in
- luciferazni reagent Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI, ZDA),
- hidrokortizon (HC, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- flutamid (FLU, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- mifepriston (RU-486, Sigma-Aldrich, Nemčija).

Gojitveni medij sestavljajo prvi trije reagenti s seznama.

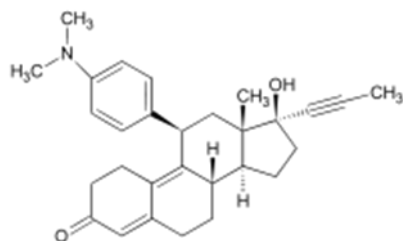
Glede na rezultate MTS testiranja smo določili koncentracije preiskovanih spojin za izvedbo luciferaznega testa. V primeru pojava oborin spojin v mediju smo koncentracije ustrezno znižali za potrebe nadaljnjih testiranj. Ti koncentraciji sta bili 25 µM ter 10 µM. V luciferaznem testu je gojitveni medij prav tako predstavljal negativno kontrolo, 0.2 % DMSO pa kontrolo topila.



Slika 4: Struktura hidrokortizona (HC) (40).



Slika 5: Struktura flutamida (FLU) (41).



Slika 6: Struktura mifepristona (RU-486) (42).

Prvi dan je bil namenjen nasajanju celic na mikrotitrsko ploščo, sledila je 24 urna inkubacija na 37 °C. Drugi dan testiranja smo gojitveni medij odstranili in celice tretirali z raztopinami preiskovanih spojin ter kontrol. Dodajanje spojin je glede na potrebe posamičnega testa potekalo v točno določenem zaporedju, s polurnim zamikom. Test glukokortikoidnega delovanja je izjemoma receptorsko neselektiven, celicam smo tu dodali zgolj 100 μ L raztopine preiskovane spojine. Splošni postopek testiranja izvajamo na sledeč način:

- Glukokortikoidno delovanje: dodali smo 50 μ L raztopine FLUT, ki je antagonist na AR, ki s predhodno zasedbo AR omogoči izražanje učinka preiskovane spojine zgolj na GR. Po polurni inkubaciji smo dodali 50 μ L raztopine preiskovane spojine.
- Antiglukokortikoidno delovanje: pričeli smo z dodatkom 50 μ L raztopine preiskovane spojine, polurni inkubaciji je sledil dodatek 50 μ L raztopine HC, ki je agonist na GR. Glede na padec učinka hkrati dodanega glukokortikoidnega agonista smo določili aktivnost preiskovane spojine.

Dodatku raztopin preiskovanih spojin ter kontrolnih spojin je sledilo 24-urno inkubiranje, zatem smo vse raztopine iz vdolbin odpipetirali. Z dodatkom 100 μ L PBS smo ploščo sprali oz. odstranili morebiten zaostanek poprej odstranjenih raztopin. Po odstranitvi PBS smo v vsako od vdolbin nanesti po 20 μ L lizirnega pufru (izhodni pufer smo prej 5x redčili z vodo). Zatem smo mikrotitrsko ploščo prenesli v zamrzovalnik (Sanyo, USA) in jo na -80°C

zamrznili za približno 3 ure (gre za stresno liziranje, postopek smo izvedli z vmesnim odmrzovanjem). Z multikanalno pipeto smo nato v vdolbine dodajali po 35 μ L luciferaznega reagenta z luciferinom. S čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader (Bio Tek, USA) smo pomerili luminiscenco. Meritev smo opravili takoj po dodatku luciferina, ker ta na svetlobi razpada. Kot relativno aktivnost luciferaze smo podali razmerje med izmerjeno intenzivnostjo signala inducibilno izražene kresničkine luciferaze po tretiranju celic s preiskovano spojino in izmerjeno intenzivnostjo signala po tretiranju s kontrolo.

3.14. STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Za statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo se poslužili dela z računalniškim programom Microsoft Excel. Naše rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost meritev iz 3 neodvisnih ponovitev za vsak test (t.i. biološke ponovitve, vedno na drugi pasaži celic). Vsakokrat smo preiskovano spojino v določeni koncentraciji ter kontrolo testirali vsaj 2 x (delo je potekalo v minimalno duplikatih, praviloma pa v 3 bioloških ponovitvah).

Rezultate preiskovanih spojin in kontrol smo primerjali z dvostranskim Studentovim t-testom. Odstopanja od kontrole so bila statistično značilna pri verjetnosti, da sta vzorec in kontrola enaka, manjši od 5 % (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). Izračunom je sledila še grafična predstavitev rezultatov. Zato smo rezultate meritev sprva normalizirali glede na kontrolo, vrednost te smo izbrali za 100 %. Nazadnje smo normaliziranim povprečnim vrednostim poskusov določili standardne deviacije.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. TESTIRANJE VIABILNOSTI

Izbrane spojine smo na začetku v koncentraciji 50 μM testirali z MTS testom za morebitno citotoksičnost. V kolikor je izbrani test le-to potrdil, smo koncentracije spojin znižali. Izmerjena absorbanca je premosorazmerna z viabilnostjo celic. Tako smo s testom MTS za vse spojine, ki so v tej diplomii predmet obravnave, poiskali koncentracijo, ki ni bila citotoksična in pri kateri ni prihajalo do oborin v gojitvenem mediju. Spojine so se izkazale za slabo topne, imeli smo številne probleme z obarjanjem. Oborina se pojavi v primeru, da spojina pri izbrani koncentraciji ni topna, zato koncentracijo znižamo, da se izognemo pojavu obarjanja v nadaljnjih testiranjih (v nasprotnem primeru bi imeli realno nižjo koncentracijo ZMP spojine v mediju). Morebitno obarjanje smo preverjali pod mikroskopom. Pri nižanju koncentracij zaradi obarjanja smo nato raztopine pripravljali direktno iz DMSO, da ne bi prihajalo do prenosa oborine pri redčenju. S primerjavo celic tretiranih z izbranimi spojinami s celicami inkubiranimi v 0,2 % DMSO v mediju smo določili nivo citotoksičnosti. Izbrana koncentracija je citotoksična, kadar metabolna aktivnost celic pade pod 80 %, t.i. minimalna meja zadostne metabolne aktivnosti. Pri testiranju citotoksičnosti smo imeli naslednji dve kontroli: gojitveni medij ter 0,2 % DMSO v gojitvenem mediju (slepa kontrola brez celic). DMSO nam izboljša topnost spojin, vendar zmanjša število živih celic (ima vpliv na viabilnost celic), zato se v testiranjih uporablja maksimalno 0,5 % DMSO. Podrobna izvedba testiranja viabilnosti je opisana v poglavju 3.11.

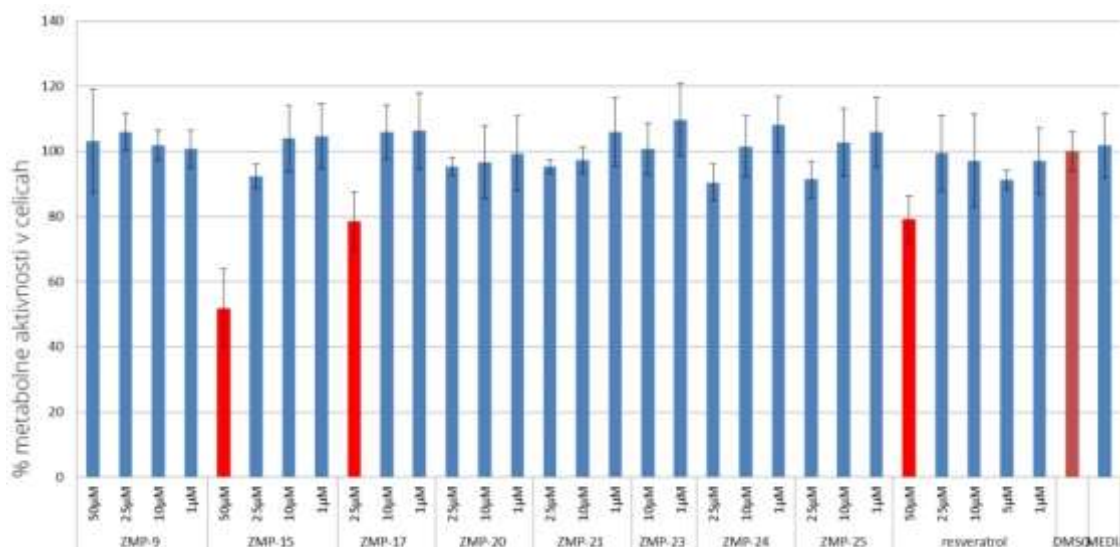
Izbrane koncentracije za testiranje:

- ZMP-9 in ZMP-15: 50 μM , 25 μM , 10 μM in 1 μM .
- ZMP-17, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24 in ZMP-25: 25 μM , 10 μM in 1 μM .
- ZMP-23: 10 μM ter 1 μM .
- Resveratrol: 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM in 1 μM .

Večji kot je bil delež živih celic, večja je bila obarvanost vdolbine. MTS test deluje na principu nastanka barvila (metabolno aktivne celice), rumenkasta barva kaže na slabo preživetje celic (približno 20 % viabilnost). Rezultate smo vizualno primerjali z vdolbino slepe kontrole brez celic (večja je citotoksičnost, bolj je barva opazovane vdolbine na plošči spominjala na barvo vdolbine slepe kontrole). Od povprečja meritev izbrane koncentracije spojine smo odšteli povprečje meritev slepe kontrole, nato smo rezultate normalizirali na meritve DMSO (rezultat delimo z absorbanco DMSO ter množimo s 100). Temu sledi izračun

standardne deviacije. Rezultati pod 80 % metabolne aktivnosti v celicah niso primerni za nadaljnja testiranja. Za testiranje spojin v luciferaznem testu so zelo zaželene standardne deviacije rezultatov MTS testiranja pod 10 (sprejemljive so vse do 20).

Citotoksičnost se je izkazala pri ZMP-15 v koncentraciji 50 μ M, ZMP-17 v koncentraciji 25 μ M ter pri resveratrolu v koncentraciji 50 μ M. Procent metabolne aktivnosti v celicah je v omenjenih treh primerih padel pod 80 %, kar je v našem primeru meja citotoksičnosti za MTS test. Glede na rezultate (slika 7) smo spojine oziroma koncentracije le-teh za testiranje glukokortikoidnega ter antiglukokortikoidnega delovanja na GR izbirali z naslednjima kriterijema: % metabolne aktivnosti v celicah mora biti nad 80%, hkrati pa želimo čim manjšo SD rezultatov. Na podlagi teh dveh kriterijev smo izbrali spojine v naslednjih koncentracijah: ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 ter resveratrol v koncentraciji 25 μ M. ZMP-17 in ZMP-23 sta glede na rezultate najbolj primerna za testiranje na ekspresijo luciferaze v koncentraciji 10 μ M. Na podlagi rezultatov (slika 7) lahko zaključimo, da so ZMP spojine manj toksične od resveratrola (izjema je ZMP-17, ki je za izbrano celično linijo bolj citotoksična od resveratrola). Večinoma spojine ne znižajo in ne povečajo viabilnosti (to lahko v nadaljnjih testiranjih vodi v lažno pozitivne rezultate). ZMP-15 ima pri koncentraciji 50 μ M precej nižjo viabilnost kot resveratrol v isti koncentraciji, v obeh primerih je citotoksičnost potrjena. Poseben primer je spojina ZMP-17 ki v koncentraciji 25 μ M kaže podobno viabilnost z resveratrolom v koncentraciji 50 μ M, zopet v obeh primerih procent metabolne aktivnosti ne dosega 80 %.



Slika 7: Graf rezultatov testiranja citotoksičnosti (MTS test).

4.2. DOLOČANJE GLUKOKORTIKOIDNEGA UČINKA RESVERATROLA IN NJEGOVIH ANALOGOV

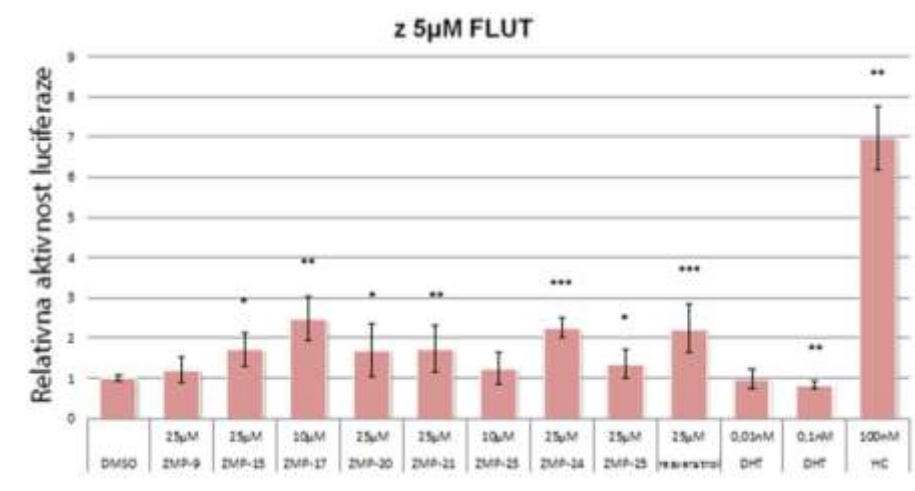
4.2.1. TESTIRANJE GLUKOKORTIKOIDNEGA UČINKA SPOJIN

Delovanje HM se najpogosteje izraža v interakcijah z receptorjem, kar ogrozi homeostazo vzpostavljeno z izločanjem endogenih hormonov v organizmu. Izvedeni *in vitro* presejalni test je osnovan na aktivaciji transkripcije gena za luciferazo. GR se v obliki kompleksa z ligandom kot transkripcijski faktor veže na promotorsko zaporedje. To zaporedje je bistveno za uravnavo izražanja reporterskega gena za luciferazo. Aktivacija transkripcije gena za luciferazo je pokazatelj biološke aktivnosti obravnavanih spojin. Posredni, merljivi parametri pri izvedenem presejalnem testu luciferaze so v neposredni povezavi s koncentracijo testirane spojine.

Testirali smo glukokortikoidno delovanje, ki je lahko posledica agonističnega delovanja na GR, povečanja izražanja GR, inhibicije metabolizma endogenih agonistov GR ali drugih možnih mehanizmov. Ker uporabljena celična linija izraža tako AR kot tudi GR, smo pri testiranju glukokortikoidne aktivnosti AR zasedli z njegovim antagonistom (FLUT). Tako smo v testni sistem najprej dodali FLUT, nato smo dodali preiskovano spojino. HC (kot agonist GR) je bila naša pozitivna kontrola, s katerim smo preverili odzivnost testa.

Glukokortikoidno delovanje na GR smo določali za ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 ter resveratrol v koncentraciji 25 μM . ZMP-17 in ZMP-23 smo testirali v koncentraciji 10 μM . FLUT v koncentraciji 5 μM smo dodali pol ure pred dodajanjem spojin, da je zasedel AR. S tem smo dosegli, da preiskovane spojine na aktivnost luciferaze vplivajo zgolj preko vpliva na GR. Rezultati testiranja kažejo (slika 8), da spojine (razen ZMP-9 in ZMP-23) delujejo šibko glukokortikoidno na GR (signifikantno povečajo indukcijo luciferaze). Gre za relativno majhno povečanje aktivnosti, spojine tudi niso bile testirane vse v enaki koncentraciji (ZMP-17 in ZMP-23 v koncentraciji 10 μM , ostale 25 μM). Pri ZMP spojinah (kemijska struktura spojin se nahaja v poglavju 3.1.) z zaetreno/imi hidroksilno/mi skupino/ami je glukokortikoidna aktivnost na GR nekoliko manjša v primerjavi z resveratrolom, saj je hidroksilna skupina na aromatskem obroču ključna za vezavo na GR. To ustreza povezavi med strukturo liganda in njegovim učinkom na GR (SAR-u za GR). Tvorba stabilnih vodikovih vezi je ključna za vezavo liganda na GR, pomembna pa je tudi sterična ter elektrostatična kompatibilnost (16). Tako sta ZMP-24 ter resveratrol, ki imata nezaetrene hidroksilne skupine, imela najboljše glukokortikoidno delovanje testirane serije spojin, saj jima omogoča dobro interakcijo z GR. ZMP-24 je popoln analog resveratrola na aromatskih

strukturnih delih molekule. Od resveratrola se razlikuje le po zamenjavi dvojne vezi z oksadiazolsko skupino. Večina pozitivnih učinkov resveratrola je žal dokazana pri koncentracijah, ki jih je pri ljudeh skoraj nemogoče doseči (predvsem zaradi hitrega metabolizma). Prehranska dopolnila z resveratrolom na trgu trenutno vsebujejo približno 200 mg resveratrola na kapsulo. Pri jemanju 5 g peroralnega odmerka je serumska koncentracija nespremenjenega resveratrola 538 ng/mL (20). Peroralni odmerek 200 mg torej pomeni serumsko koncentracijo nespremenjenega resveratrola približno 20 ng/mL. Resveratrol je v našem primeru glukokortikoidno delovanje na GR izkazal v 5.000-krat višji koncentraciji. Resveratrol je tudi večino neželenih učinkov izkazoval pri mnogo višjih odmerkih, kot so dnevno predpisani. Pri odmerkih 1 do 1,5 g resveratrola na dan so v kratkotrajnih študijah kot stranska učinka zabeležili le drisko in vročinske oblike. Pri jemanju nad 2,5 g resveratrola dnevno se pojavi še bruhanje ter abdominalne bolečine. Jemanje pod 100 mg dnevno glede na študije ne prinaša neželenih učinkov (17). Glede na to, da so naše spojine šibko glukokortikoidno delovanje izkazale v 5000 x višji koncentraciji kot bi znašala serumska koncentracija ob zaužitju ene kapsule prehranskega dopolnila (200 mg resveratrola na kapsulo), je možnost endokrinega delovanja ob tovrstni rabi majhna oz. ničelna. Da bi lahko nedvoumno ovrednotili možnost glukokortikoidnega delovanja resveratrola pri prej omenjenih terapevtskih koncentracijah, pa bi bilo potrebno testiranje vseeno izvesti tudi pri nižjih koncentracijah.

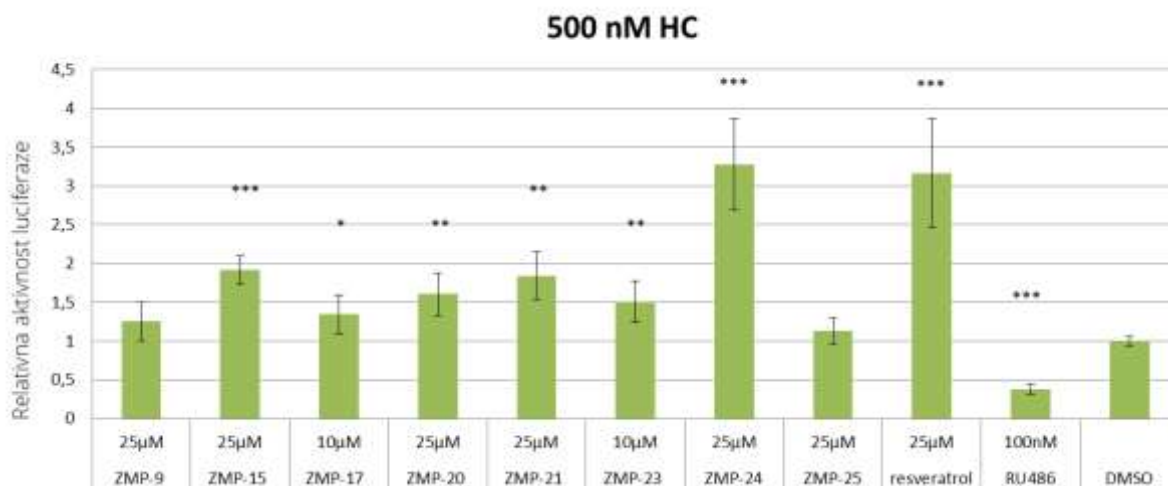


Slika 8: Graf rezultatov testiranja glukokortikoidnega delovanja spojin na GR. Statistična signifikanca: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***).

4.2.2. ANTIGLUKOKORTIKOIDNO DELOVANJE NA GR

V primeru, da spojina na receptorju (v našem primeru GR) zasede vezavno mesto za endogeni hormon, kar onemogoči vezavo tega hormona na receptor, govorimo o antiglukokortikoidnem delovanju HM. Najprej smo v testni sistem s celicami dodali preiskovano spojino, po določenem času pa še agonist za GR (HC). Antiglukokortikoidni učinek smo preiskovani spojini določili glede na njeno sposobnost zmanjšanja učinka dodanega agonista GR. Antiglukokortikoidno delovanje bi torej spojini pripisali v primeru, da bi v določeni koncentraciji signifikantno zmanjšala učinek hkrati dodanega glukokortikoidnega agonista HC.

Antiglukokortikoidno delovanje smo določali za ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 ter resveratrol v koncentraciji 25 μ M. ZMP-17 in ZMP-23 smo testirali v koncentraciji 10 μ M. To so bile najvišje koncentracije, ki v MTS testu niso pokazale vpliva na viabilnost celic (necitotoksične koncentracije). RU-486 inhibira GR (je antagonist GR in inhibira izražanje luciferaze), kar je pokazatelj, da naš test deluje (pozitivna kontrola). Iz rezultatov, prikazanih na sliki 9, lahko zaključimo, da nobena od testiranih spojin v uporabljeni koncentraciji ne deluje antiglukokortikoidno na GR. Pomembno je torej izpostaviti, da ne vemo, kako bi se spojine obnašale v nižjih koncentracijah (npr. pitje vina in hrana, ki vsebuje resveratrol).



Slika 9: Graf rezultatov antiglukokortikoidnega delovanja spojin na GR. Statistična signifikanca: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***).

Sklenemo lahko, da so tako ZMP spojine (razen ZMP-9 in ZMP-23) kot tudi resveratrol HM, saj izražajo šibko glukokortikoidno aktivnost. Poudariti je treba, da je resveratrol z vidika hormonskega delovanja še precej slabo opredeljen, potrebno bi bilo testiranje na vseh ostalih

hormonskih sistemih in nato ugotoviti tveganje ob terapevtski izpostavljenosti. Pri analogih lahko pričakujemo podobno obnašanje kot pri resveratrolu, kar dokazujejo rezultati te diplomske naloge. Da pa bi lahko vsako spojino glede jakosti delovanja primerjali z resveratrolom, bi tudi ZMP-17 ter ZMP-23 morali testirati v koncentraciji 25 μ M kot resveratrol, vendar spojina ZMP-23 pri tako visoki koncentraciji ni bila topna v testnem mediju, ZMP-17 pa je pri tej koncentraciji znižala viabilnost celic pod 80 %. Primerjavo bi tako lahko izvedli pri testiranju tako resveratrola, kot tudi obeh analogov v koncentraciji 10 μ M.

Pri vrednotenju resveratrola ali njegovih analogov kot HM z učinkom na glukokortikoidni sistem smo se srečali s problematiko pomanjkanja validiranih testov. Ugotovili smo, da bi bil izbrani testni sistem (celična linij MDA-kb2) ustrezen kot presejani test za ugotavljanje glukokortikoidnega delovanja. Celice so nezahtevne za gojenje ter vzdrževanje, odzivnost celic je stabilna preko 80 pasaž, transfekcije niso potrebne, testi so hitro izvedljivi, rezultati ponovljivi. Žal pa testni sistem še ni validiran, kar bi omogočilo primerjavo rezultatov različnih študij in s tem pripomoglo k ustreznemu vrednotenju učinkov spojin na glukokortikoidni sistem.

5. SKLEP

Toksikološke študije predstavljajo pomemben del raziskav naravnih in sinteznih spojin, ki bi v prihodnosti lahko bile uporabljene v farmacevtski ali prehrambeni industriji. O resveratrolu je zadnja leta med raziskovalci veliko govora zaradi številnih pozitivnih učinkov, ki jih izkazuje v *in vitro* študijah in smo jih v tem diplomskem delu obsežneje predstavili v uvodnem delu. Ker pa ima resveratrol slabo biorazpoložljivost, se aktualne študije usmerjajo k pripravi analogov resveratrola z izboljšanimi lastnostmi absorpcije in distribucije v organizmu (boljše farmakokinetične lastnosti). Pri razvoju terapevtsko uporabnih učinkovin je nujno ovrednotiti njihove potencialne toksične odmerke in čimveč neželenih učinkov. Kot neželeni učinki postajajo vedno bolj pomembni tudi tisti, ki vplivajo na homeostazo hormonskega sistema v organizmu, tudi na glukokortikoidni sistem. V okviru OECD zaenkrat za GR validirana testiranja ne obstajajo, kljub temu pa je vse pomembneje določiti tudi tovrstne učinke spojin, ki smo jim lahko tudi kronično izpostavljeni. Tako smo v diplomskem delu s presejalnim luciferaznim testom preverjali, ali so obravnavane spojine HM. Želeli smo ugotoviti, ali resveratrol in ZMP spojine izkazujejo glukokortikoidno ali antiglukokortikoidno delovanje na GR.

Rezultati eksperimentalnega dela dajejo naslednje zaključke:

- ✓ Na podlagi netopnosti in izražene citotoksičnosti smo v okviru MTS testa za nadaljnja testiranja izbrali naslednje koncentracije spojin: ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 ter resveratrol v koncentraciji 25 μ M. ZMP-17 in ZMP-23 pa smo nadalje testirali v koncentraciji 10 μ M. V višjih koncentracijah je spojina ZMP-17 citotoksična, spojina ZMP-23 pa netopna in se v testnem sistemu obarja.
- ✓ V luciferaznem testu so obravnavane spojine (z izjemo ZMP-9 in ZMP-23) izkazale šibko glukokortikoidno delovanje na GR, saj so pri testiranih koncentracijah imele signifikanten vpliv na aktivnost luciferaze.
- ✓ Antiglukokortikoidnega učinka na GR ni izkazala nobena izmed testiranih spojin.
- ✓ Dokazali smo, da je aktivnost resveratrola in njegovih analogov odvisna od podobnosti v strukturi. Pomembna je pozicija, število in nezaetrenost OH skupin. Rigidni oksadiazolski distančnik se je izkazal za ustrezen mimetik centralne dvojne vezi v resveratrolu. ZMP-24 ima glede na rezultate približno enako jakost delovanja

kot resveratrol, kar ne preseneča, saj imata oba za tvorbo vodikovih vezi z GR na voljo 3 OH skupine. ZMP-9 in ZMP-25 nimata aktivnosti. ZMP-15 ima manjšo jakost kot resveratrol (manjkajoča OH skupina je najbrž ključna), jakost ZMP-23 pa je še manjša, kar pa morda lahko pripišemo tudi testiranju v koncentraciji 10 μ M.

- ✓ Potrdile so se vse naše delovne hipoteze:
- Resveratrol in ZMP spojine so nizko citotoksični za celično linijo MDA-kb2, ki je ustrezen presejalni testni sistem za določanje glukokortikoidne aktivnosti spojin.
- Vse spojine, razen ZMP-9 in ZMP-23, signifikantno izkazujejo učinek na GR in bi jih na osnovi luciferaznega presejalnega testa lahko uvrstili med hormonske motilce, vendar bi za popolno razjasnitev delovanja mehanizma potrebovali še dodatna testiranja.
- Potrdili smo, da struktura testiranih spojin bistveno vpliva na interakcijo z GR. Resveratrol, ki vsebuje več strukturnih elementov potrebnih za vezavo z GR, izkazuje večjo jakost delovanja kot njegovi analogi. Najbolj se mu strukturno približa ZMP-24, ki ima tudi podobno jakost delovanja kot resveratrol. Zaetrenje hidroksilnih skupin in neustrezna pozicija hidroksilnih skupin v molekuli analogov zmanjša njihovo jakost delovanja v primerjavi z resveratrolom.

6. LITERATURA

1. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T, Legan M: Anatomija, histologija in fiziologija, 2. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2008: 83-92.
2. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T, Legan M: Anatomija, histologija in fiziologija, 2. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2008: 148.
3. Marty MS, Carney WE, Craig Rowlands J: Endocrine Disruption: Historical Perspectives and Its Impact on the Future of Toxicology Testing. *Toxicological sciences*, 2011; 120(S1): 93-108.
4. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_en.htm Dostop: 17.7.2014
5. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.htm#report1 Dostop: 27.7.2014
6. Schvecnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J, Söder O: Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 1-10.
7. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)34&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)34&doclanguage=en); dostop 15.6.2014
8. <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm> Dostop: 27.7.2014
9. Charmandari E, Kino T, Chrousos PG: Glucocorticoids and Their Actions, An Introduction. *New York Academy of Sciences*, 2004. doi: 10.1196/annals.1321.001:1-8.
10. Weger DB, Weger M, Nusser M, Brenner-Weis G, Dickmeis T: A Chemical Screening System for Glucocorticoid Stress Hormone Signaling in an Intact Vertebrate. *ACS Publications*, 2012, 7: 1178-1183.
11. Cidlowski AJ, Kadmiel M: Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2013; 34: 518-530.
12. <http://ep.physoc.org/content/92/2/299/F1.expansion>; Dostop: 16.6.2014
13. Bladh L-G, Liden J, Dahlman-Wright K, Reimers M, Nilsson S, Okret S: Identification of Endogenous Glucocorticoid Repressed Genes Differentially Regulated by a Glucocorticoid Receptor Mutant Able to Separate between Nuclear

- Factor-kB and Activator Protein-1 Repression. *Molecular Pharmacology*, 2005; 67: 815-826.
14. Rogatsky I, Hittelman AB, Pearce D, Garabedian MJ: Distinct Glucocorticoid Receptor Transcriptional Regulatory Surfaces Mediate the Cytotoxic and Cytostatic Effects of Glucocorticoids. *Molecular and Cellular Biology*, 1999; 19: 5036-5049.
 15. Schulz M, Eggert M, Baniahmad A, Dostert A, Heinzel T, Renkawitz R: RU486-induced Glucocorticoid Receptor Agonism Is Controlled by the Receptor N Terminus and by Corepressor Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 26238-26243.
 16. Von Langen J, Heinrich Fritzemeier K, Diekmann S, Hillisch A: Molecular Basis of the Interaction Specificity between the Human Glucocorticoid Receptor and Its Endogenous Steroid Ligand Cortisol. *Chembiochem*, 2005; 6: 1110-1118.
 17. Maier-Salamon A, Böhmendorfer M, Riha J, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W: Interplay between metabolism and transport of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013; 1290: 98-106.
 18. Bode LM, Bunzel D, Huch M, Cho GS, Ruhland D, Bunzel M, Bub A, Franz CM, Kulling SE: In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2013; 97: 295-309.
 19. Delmas D, Aires V, Colin DJ, Limagne E, Scagliarini A, Cotte AK, Ghiringhelli F: Importance of lipid microdomains, rafts, in absorbiton, delivery, and biological effects of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013; 1290: 90-97.
 20. Ogas T, Kondratyuk TP, Pezzuto JM: Resveratrol analogs: promising chemopreventive agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013; 1290: 21-29.
 21. Farghali H, Kutinova-Canova N, Lekić N: Resveratrol and related Compounds as Antioxidants With an Allosteric Mechanism of Action in Epigenetic Drug Targets. *Physiological Research*. 2013, 62: 1-13.
 22. Li H, Xia N, Forstermann U: Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Elsevier*, 2012; 26: 102-110.
 23. Dasgupta S, Bandyopadhyay: Neuroprotective mode of action of resveratrol in central nervous system. *PharmaNutrition*, 2013; 1: 90-97.
 24. Bakhtiarova A, Taslimi P, Elliman SJ, Kosinski PA, Hubbard B, Kavana M, Kemp DM: Resveratrol inhibits firefly luciferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 351: 481-484.

25. Alamdari N, Aversa Z, Castellero E, Gurav A, Petkova V, Tizio S, Hasselgren PO: Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012; 417: 528-533.
26. Fullerton MD, Steinberg GR: SIRT1 Takes a Backseat to AMPK in the Regulation of Insulin Sensitivity by Resveratrol. *Diabetes*, 2010; 59:551-553.
27. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2713&Template=cellBiology> Dostop: 2.2.2014
28. Talysa O, Kondratyuk TP, Pezzuto JM: Resveratrol analogs: promising chemopreventive agents. *Annals of the New York academy of sciences*, 2013:21.
29. Risheng M, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M: UV Filters with Antagonistic Action at Androgen Receptors in the MDA-kb2 Cell Transcriptional-Activation Assay. *Toxicological Sciences*, 2003: 43.
30. Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE Jr.: A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological sciences*, 2002; 66 (1): 69-81.
31. <http://georgelab.eng.uci.edu/resources/Aseptic%20Technique.pdf> Dostop: 20.1.2014
32. <http://futurescienceleaders.org/protocols/files/2013/02/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf> Dostop: 2.2.2014
33. http://studentski.net/get/ulj_ffa_lb1_bma_vaj_pretocna_citometrija_01__gradivo.pdf Dostop: 9.7.2014
34. <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/> Dostop: 27.2.2013
35. http://www.promega.com/products/cell-health-and-metabolism/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/ Dostop: 2.2.2014
36. Malich G, Markovic B, Winder C: The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124, 1997: 179-192.
37. <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20Aqueous%20One%20Solution%20Cell%20Proliferation%20Assay%20System%20Protocol.pdf> Dostop: 20.1.2014

38. <http://www.promega.com/~media/files/resources/cell%20notes/cn021/luciferase%20reporter%20assays-%20powerful%20adaptable%20tools%20for%20cell%20biology%20research.pdf?la=en> Dostop: 2.2.2014
39. http://www.promega.com/~media/images/resources/figures/1300-1399/1399ma03_6a.jpg?la=en Dostop: 2.2.2014
40. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kortizol> Dostop: 2.2.2014
41. <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/452039> Dostop: 2.2.2014
42. <http://en.wikipedia.org/wiki/Mifepristone> Dostop 2.2.2014

7. PRILOGE

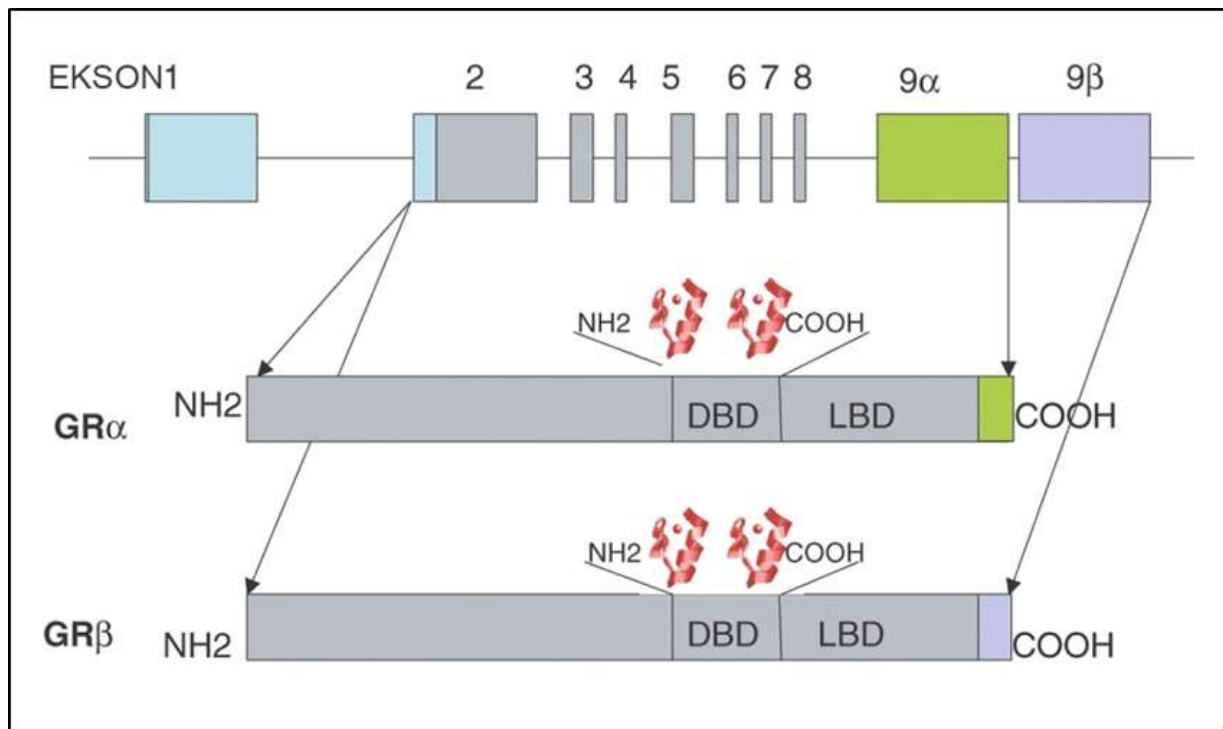
7.1. OECD SMERNICE ZA TESTIRANJA

Preglednica I: Tabela smernic za testiranja HM s strani OECD (8).

TG (Test Guideline)	Naslov	Leto uveljavitve
440	Uterotrofično biotestiranje na glodalcih: kratkotrajna vrednotenjska študija estrogenskih lastnosti	2007
407	28-dnevna študija oralne toksičnosti na glodalcih	2008
211	Daphnia Magna reproduktivni test	2011
441	Hershberger biotestiranje na podganah: kratkotrajna vrednotenjska študija (anti)androgenih lastnosti	2009
229	Kratkotrajna študija reprodukcije rib	2009
230	21-dnevno testiranje rib: kratkotrajno vrednotenje estrogenskega in androgenskega delovanja ter inhibicije aromataze	2009
231	Študija metamorfoze dvoživk	2009
455	Študija aktivacije transkripcije estrogenskega humanega receptorja α za detekcijo estrogenskega agonizma kemikalij	2009
233	Toksični test življenjskega cikla žuželk (Chironomid) z	2010

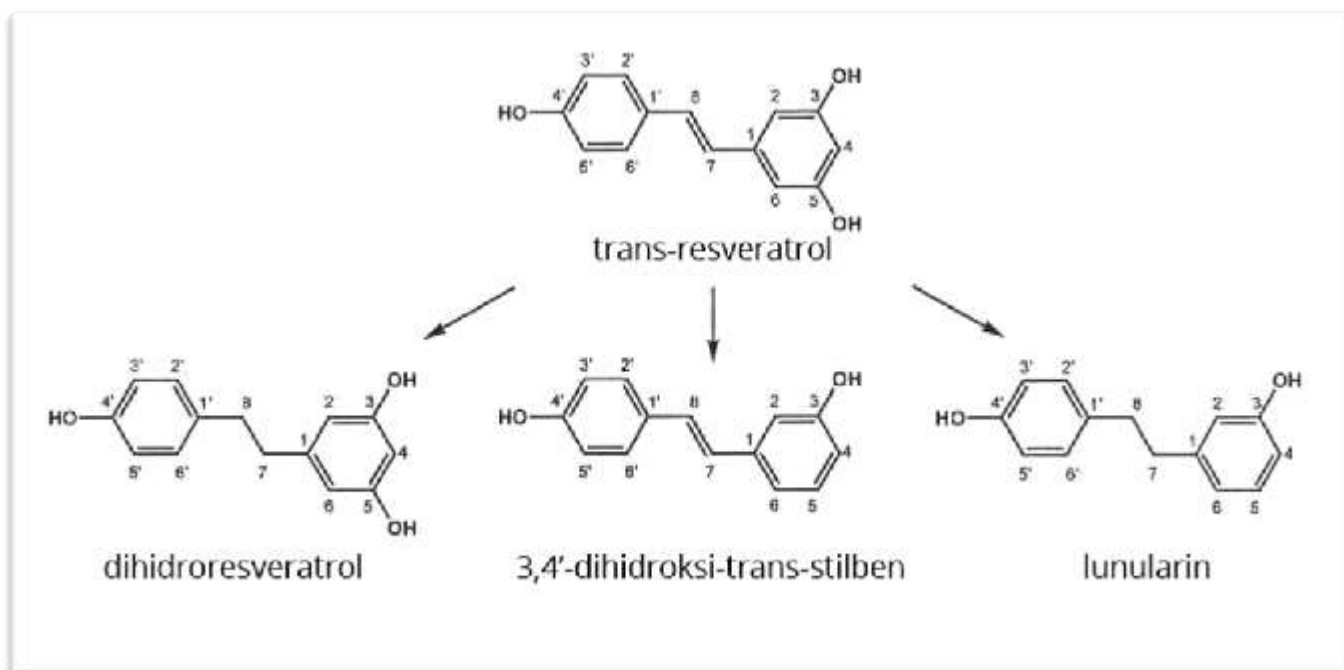
	uporabo obogatene vode ali obogatenega sedimenta	
234	Test spolnega razvoja rib	2011
456	H295R Steroidogenezni test	2011
457	BG1Luc transaktivacija estrogenskega receptorja, <i>in vitro</i> testiranje agonistov ter antagonistov estrogenskega receptorja	2012

7.2. STRUKTURA GR



Slika 10: Struktura GR (12).

7.3. METABOLIZEM *TRANS*-RESVERATROLA



Slika 11: Strukture *trans*-resveratrola ter njegovih metabolitov črevesne mikroflore (18).