

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA ŠPENDAL

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA ŠPENDAL

**UGOTAVLJANJE ANDROGENEGA IN GLUKOKORTIKOIDNEGA
DELOVANJA IZBRANIH NESTEROIDNIH PROTIVNETNIH SPOJIN NA
CELICAH MDA-kb2**

EVALUATION OF ANDROGEN AND GLUCOCORTICOID ACTIVITY OF
SELECTED NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON MDA-kb2
CELL LINE

Ljubljana, 2016

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

ZAHVALA

Diplomsko nalogo, v zahvalo za njihovo ljubezen, trud in podporo, posvečam svoji družini: očetu Janezu, materi Renati, stari mami Heleni, sestri Ireni in Žigu.

Izjava:

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

Ljubljana, 2016

Barbara Špendal

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	HORMONSKI MOTILCI	1
1.2	ANDROGENI SISTEM	3
1.2.1	ANDROGENI	3
1.2.2	ANDROGENI RECEPTOR	4
1.2.3	ENDOKRINI MOTILCI ANDROGENEGA SISTEMA	4
1.3	GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM	5
1.3.1	GLUKOKORTIKOIDI	5
1.3.2	GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR	6
1.3.3	ENDOKRINI MOTILCI GLUKOKORTIKOIDNEGA SISTEMA	7
1.4	PARACETAMOL	8
1.4.1	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI	8
1.4.2	FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	8
1.4.3	FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI	9
1.4.4	TOKSIČNOST	10
1.4.5	IZPOSTAVLJENOST PARACETAMOLU	10
1.5	DIKLOFENAK IN METABOLIT 4'-HIDROKSIDIKLOFENAK	11
1.5.1	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI	11
1.5.2	FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	11
1.5.3	FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI	12
1.5.4	TOKSIČNOST	12
1.5.5	IZPOSTAVLJENOST DIKLOFENAKU	13
1.6	PICEATANOL	14
1.6.1	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI	14
1.6.2	FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	14
1.6.3	FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI	14
1.6.4	TOKSIČNOST	15
1.6.5	IZPOSTAVLJENOST PICEATANOLU	15
2	NAMEN DELA	16
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	MATERIALI	18
3.1.1	TESTIRANE SPOJINE	18
3.1.2	REAGENTI	20
3.1.3	LABORATORIJSKI MATERIALI IN APARATURE	20
3.2	METODE DELA	21
3.2.1	PRIPRAVA RAZTOPIN	21
3.2.2	CELIČNA LINIJA MDA-KB2	23
3.2.3	DELO S CELICAMI	23
3.3	TESTIRANJE SPOJIN	27
3.3.1	TEST CITOTOKSIČNOSTI	27
3.3.2	LUCIFERAZNI TEST	29
3.4	STATISTIČNA ANALIZA	31
4	REZULTATI	33
4.1	TEST CITOTOKSIČNOSTI	33
4.2	DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA ANDROGENEM RECEPTORJU	35
4.2.1	DOLOČANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA NA AR	35
4.2.2	DOLOČANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA NA AR	38
4.3	DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA GLUKOKORTIKOIDNEM RECEPTORJU	40
4.3.1	DOLOČANJE AGONISTIČNEGA UČINKA NA GR	40
4.3.2	DOLOČANJE ANTAGONISTIČNEGA UČINKA NA GR	43

5	RAZPRAVA	46
5.1	PARACETAMOL.....	46
5.2	DIKLOFENAK	49
5.3	4'-HIDROKSIDIKLOFENAK	52
5.4	PICEATANOL.....	53
6	SKLEP	56
7	VIRI	58
8	PRILOGE	70

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijske strukture MTT, MTS in PMS	27
Slika 2: Pretvorba MTS v formazan.....	28
Slika 3: Mehanizem reakcije kresničkine luciferaze.....	29
Slika 4: Strukturna primerjava paracetamola s flutamidu podobnim spojinam	46
Slika 5: Strukturna primerjava paracetamola s fenoli	47
Slika 6: Strukturna primerjava diklofenaka z difeniletri	50
Slika 7: Strukturna primerjava piceatanola s stilbeni.....	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Testirane spojine.....	18
Preglednica II: Spojine, uporabljene kot pozitivne kontrole.....	19
Preglednica III: Uporabljeni reagenti	20
Preglednica IV: Uporabljeni laboratorijski materiali in aparature.....	20
Preglednica V: Sestava gojitvenega medija.....	21
Preglednica VI: Priprava testiranih spojin za MTS test.....	22
Preglednica VII: Priprava testiranih spojin za Luciferazni test	22
Preglednica VIII: Uporabljene koncentracije pozitivnih kontrol.....	23

KAZALO GRAFOV

Graf 1: MTS test	33
Graf 2: Rezultati določanja agonističnega učinka paracetamola na androgenem receptorju.	35
Graf 3: Rezultati določanja agonističnega učinka diklofenaka na androgenem receptorju... ..	35
Graf 4: Rezultati določanja agonističnega učinka 4'-hidroksidiklofenaka na androgenem receptorju.	36
Graf 5: Rezultati določanja agonističnega učinka piceatanola na androgenem receptorju....	36
Graf 6: Rezultati določanja antagonističnega učinka paracetamola na androgenem receptorju.	37
Graf 7: Rezultati določanja antagonističnega učinka diklofenaka na androgenem receptorju	38
Graf 8: Rezultati določanja antagonističnega učinka 4'-hidroksidiklofenaka na androgenem receptorju	38
Graf 9: Rezultati določanja antagonističnega učinka piceatanola na androgenem receptorju.	39
Graf 10: Rezultati določanja agonističnega učinka paracetamola na glukokortikoidnem receptorju	40
Graf 11: Rezultati določanja agonističnega učinka diklofenaka na glukokortikoidnem receptorju	40
Graf 12: Rezultati določanja agonističnega učinka 4'-hidroksidiklofenaka na glukokortikoidnem receptorju.....	41
Graf 13: Rezultati določanja agonističnega učinka piceatanola na glukokortikoidnem receptorju	41
Graf 14: Rezultati določanja antagonističnega učinka paracetamola na glukokortikoidnem receptorju	42
Graf 15: Rezultati določanja antagonističnega učinka diklofenaka na glukokortikoidnem receptorju	43
Graf 16: Rezultati določanja antagonističnega učinka 4'-hidroksidiklofenaka na glukokortikoidnem receptorju.....	43
Graf 17: Rezultati določanja antagonističnega učinka piceatanola na glukokortikoidnem receptorju	44

POVZETEK

Izpostavitvev hormonskim motilcem je povezana z nastankom endokrinih motenj, zato je identificiranje kemikalij, ki lahko delujejo kot hormonski motilci, ključno za zaščito zdravja ljudi in živali. V diplomski nalogi smo preučevali morebitni vpliv paracetamola (PAR), diklofenaka (DIC) in njegovega metabolita 4'-hidroksidiklofenaka (4'OH-DIC) ter piceatanola (PIC) na androgeni in glukokortikoidni sistem. Vse testirane spojine vsebujejo podobne strukturne elemente kot že znani hormonski motilci in preko katerih lahko poteka tvorba interakcij z receptorji endokrinega sistema in posledično motenje endokrinega delovanja. Potencialni vpliv PAR in PIC na motenje delovanja hormonskega sistema opisujejo tudi nedavne raziskave. PAR in DIC se široko uporabljata v terapevtske namene, izpostavljenost pa je lahko tudi neposredna, saj PAR in DIC spadata med učinkovine, ki so pogosto zaznane v vodnem okolju. PIC smo lahko izpostavljeni preko jemanja prehranskih dopolnil z resveratrolom ali preko uživanja določene hrane in pijače, ki vsebuje PIC.

Za vrednotenje delovanja testiranih spojin na androgeni in glukokortikoidni sistem smo uporabili *in vitro* metodo testiranja s celično linijo MDA-kb2, ki izraža androgene (AR) in glukokortikoidne receptorje (GR), hkrati pa vsebuje reporterski gen za luciferazo. Najprej smo s testom MTS določili prvo necitotoksično koncentracijo, ki je za PAR, DIC in PIC znašala 175 μM in za 4'OH-DIC 50 μM . Agonistični in antagonistični učinek testiranih spojin na AR in GR celične linije MDA-kb2 smo vrednotili z uporabo luciferaznega testa. Spojine smo testirali v prvi necitotoksični koncentraciji ter v velikostnih razredih koncentracij, ki se nahajajo v plazmi po terapevtski uporabi (PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC) oziroma v koncentracijah, ki jih lahko izmerimo v okolju (PAR in DIC). Rezultati testiranj so pokazali, da PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC izkazujejo učinek na AR in/ali GR celične linije MDA-kb2. Učinek na AR in/ali GR celične linije MDA-kb2 so izkazovali v prvi necitotoksični koncentraciji (PAR kot agonist na AR in GR; DIC kot mešani agonist/antagonist na AR in GR; 4'OH-DIC kot agonist na GR in PIC kot agonist na AR in GR), v terapevtskih koncentracijah (PAR sam ali v kombinaciji z dihidrotestosteronom kot agonist na AR in kot antagonist na GR; DIC kot agonist na AR; 4'OH-DIC kot agonist na GR in PIC v kombinaciji z dihidrotestosteronom kot agonist na AR) in v okoljskih koncentracijah (PAR kot antagonist na GR).

Rezultati raziskave diplomske naloge kažejo, da testirane spojine PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC lahko izkazujejo potencial hormonskih motilcev. Zaradi široke terapevtske uporabe in potencialne neposredne izpostavljenosti spojinam preko okolja, je smiselno nadaljnje

testiranje vpliva teh spojin na hormonski sistem.

Ključne besede: hormonski motilci, paracetamol, diklofenak, 4'-hidroksidiklofenak, piceatanol, androgeni receptor, glukokortikoidni receptor, celična linija MDA-kb2

ABSTRACT

Exposure to endocrine-disrupting chemicals can lead to health problems, related to irregularities in the functioning of the endocrine system. Therefore, identifying chemicals that can act as endocrine-disrupting chemicals is crucial to maintain the health of humans and animals.

The main objective of this study was to evaluate the potential influence of the selected nonsteroidal anti-inflammatory drugs paracetamol (PAR), diclofenac (DIC) and its metabolite 4'-hydroxydiclofenac (4'-OH-DIC), and piceatannol (PIC) on the androgen and glucocorticoid system. All tested substances contain in their chemical structure similar elements as already known endocrine-disrupting chemicals. These structural elements can be responsible for the interactions with hormone receptors and consequently for disturbances of the endocrine system. The potential acting of PAR and PIC as endocrine-disrupting chemicals was already described in previous studies. PAR and DIC are widely used for therapeutic purposes. However, the exposure to PAR and DIC can also be indirect, as PAR and DIC are commonly found in the water environment. The human exposure to PIC can be due to the intake of supplements that contain resveratrol or by intake of certain foods and beverages, which contain PIC.

For the evaluation of potential influence of tested substances on the androgen and glucocorticoid system the *in vitro* system with MDA-kb2 cell line was used. The MDA-kb2 cell line expresses the androgen receptors (AR) and glucocorticoid receptors (GR) and contains the luciferase reporter gene construct. In the first part of the study we examined the cytotoxicity of PAR, DIC, 4'-OH-DIC and PIC and determined their first non-cytotoxic concentration, which was 175 μM for PAR, DIC and PIC and 50 μM for 4'-OH-DIC. The agonist and antagonist properties of tested substances were examined with the luciferase reporter gene assay.

The examined substances were tested in their first non-cytotoxic concentration and in concentration range in which the tested substances are present in plasma after therapeutic use (PAR, DIC, 4'-OH-DIC and PIC) or in the water environment (PAR and DIC). Results of this study showed that PAR, DIC, 4'-OH-DIC and PIC can act as endocrine-disrupting chemicals on the androgen and glucocorticoid receptors of the MDA-kb2 cell line. The effect on the AR and/or GR of the MDA-kb2 cell line was noticed in the tested first non-cytotoxic concentration (PAR as agonist on AR and GR; DIC as mixed agonist/antagonist on AR and GR; 4'-OH-DIC as agonist on GR and PIC as agonist on AR and GR). The

tested substances acted as endocrine-disrupting chemicals on AR and GR of the MDA-kb2 cell line also in the concentration range that covers plasma concentrations of tested substances after therapeutic use (PAR alone or in combination with dihydrotestosterone as agonist on AR and as antagonist on GR; DIC as agonist on AR; 4'OH-DIC as agonist on GR and PIC in combination with dihydrotestosterone as agonist on AR) and in the concentration range in which tested substances can be found in the water environment (PAR as antagonist on GR).

The results of this study indicate that tested substances PAR, DIC, 4'OH-DIC and PIC can act as endocrine-disrupting chemicals. Because of the wide therapeutic use of PAR and DIC, and due to the potential exposure to tested substances through indirect environmental exposure, further research about potential influence of PAR, DIC, 4'OH-DIC and PIC on the endocrine system is required.

KEYWORDS: endocrine-disrupting chemicals, paracetamol, diclofenac, 4'-hydroxydiclofenac, piceatannol, androgen receptor, glucocorticoid receptor, MDA-kb2 cell line

SEZNAM OKRAJŠAV

4'-OH-DIC	4'-hidroksidiklofenak
11 β -HSD1	11 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tip 1
11 β -HSD2	11 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tip 2
ACTH	adrenokortikotropni hormon
AR	androgeni receptor
ARE	androgen odzivni element
ATP	adenozintrifosfat
CAS	enoznačen številčni identifikator kemijskih elementov, spojin, polimerov, bioloških sekvenc, zmesi in zlitin
COX	ciklooksigenaza
CRF	kortikotropin sproščujoči faktor
CYP	citokrom P450
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DBD	DNA vezavna domena
DES	dietilstilbestrol
DIC	diklofenak
DMSO	dimetilsulfoksid
DHT	5 α -dihidrotestosteron
EDC	kemikalije, ki motijo hormonski sistem
ER	estrogeni receptor
FBS	fetalni telečji serum
FLU	flutamid
FSH	folikle stimulirajoči hormon
GnRH	gonadoliberin
GR	glukokortikoidni receptor
GRE	glukokortikoidni odzivni element
HC	hidrokortizon
HDL	lipoprotein z visoko gostoto
HM	hormonski motilci
HPA	hipotalamus - hipofiza - skorja nadledvične žleze
HRE	hormonski odzivni element
HSP	proteini toplotnega šoka

IPCS	Mednarodni program za kemijsko varnost
L-15	Leibovitz-ev medij
LAF	laminarni pretok zraka
LBD	ligand vezavna domena
LBD-AR	ligand vezavna domena androgenega receptorja
LDL	lipoprotein z nizko gostoto
LH	luteinizirajoči hormon
MR	mineralokortikoidni receptor
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijeva sol
NAD(P)H	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
NAPQI	N-acetil-p-benzokinonimin
NFκB	jedrni faktor κB
NSAID	nesteroidne protivnetne učinkovine
NTD	N - terminalna domena
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
PAR	paracetamol
PBS	fosfatni pufer
PMS	fenazin metosulfat
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂
PGI ₂	prostaglandin I ₂
PIC	piceatanol
RLB	pufer za lizo celic
RU-486	mifepriston
TNF- α	tumor nekrotizirajoči faktor alfa
UV	ultravijolično sevanje
VLDL	lipoprotein z zelo nizko gostoto
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

1.1 HORMONSKI MOTILCI

Raziskave kažejo, da pojavnost in razširjenost bolezni, ki nastanejo kot posledica motenja endokrinega sistema v zadnjih letih narašča (1). Ljudje smo vsakodnevno izpostavljeni številnim substancam, ki zaradi svojih strukturnih lastnosti in sposobnosti učinkovanja pri zelo nizkih koncentracijah posnemajo delovanje hormonov in motijo naš kompleksen in natančno uravnavan endokrini sistem (2). Te substance imenujemo hormonski motilci (HM). Po Mednarodnem programu za kemijsko varnost (IPCS) in Svetovni zdravstveni organizaciji (WHO) je hormonski motilec definiran kot eksogena substanca ali mešanica, ki spremeni funkcijo(e) endokrinega sistema in posledično povzroči neželene zdravstvene učinke v organizmu, njegovih potomcih ali (sub)populacijah (3). Skupina snovi, definiranih kot HM, je zelo obširna in heterogena (2). HM so lahko sinteznega ali naravnega izvora, pri čemer trenutno največjo skrb zbuja sintetično pridobljene industrijske kemikalije (4). Med primere HM sinteznega izvora spadajo industrijska topila (dioksini, poliklorirani in polibromirani bifenili), sestavine plastike (bisfenol A, ftalati, polifluoroalkili, polibromirani difenil etri), surfaktanti (alkilfenoli), pesticidi (organoklorni pesticidi) (4) in zdravila (npr. paracetamol, acetilsalicilna kislina, indometacin) (5). Primer HM naravnega izvora predstavljajo fitoestrogeni (npr. genistein) (6). HM najdemo v vsakodnevno uporabljenih predmetih kot so plastične steklenice, kovinske pločevinke za hrano, kozmetika in igrače (7). Lahko smo jim izpostavljeni tudi preko uživanja kontaminirane hrane in vode, saj so številni HM prisotni v okolju v ng/L do mg/L koncentracijskem območju (8).

Posledice okoljske izpostavljenosti HM so v večji meri dokazane na populaciji divjih živali. Vpliv take izpostavljenosti se kaže v razvoju reproduktivnih nepravilnosti, feminizaciji ali maskulinizaciji, zmanjšani plodnosti, motnjah v razvoju, poškodbah nevrološke funkcije in zmanjšanem imunskem sistemu. Posledice okoljske izpostavljenosti HM ljudi so težje direktno dokazljive (8,9). Nastanek hormonskih motenj pri ljudeh najpogosteje povezujejo z izpostavljenostjo ksenoestrogenom, antiestrogenom, antiandrogenom ter z ostalimi HM, ki motijo tiroidno, kortikoidno in druge metabolne funkcije (1). Podobno kot pri raziskavah na populaciji divjih živali, tudi epidemiološke raziskave kažejo na povezavo med potencialno izpostavljenostjo ljudi HM in posledičnim nastankom nepravilnosti. Te se kažejo kot nepravilnosti moškega in ženskega

razmnoževalnega sistema (zmanjšano število semenčic, kriporhizem (nespuščena moda), hipospadiaza (prirojena nepravilnost spolnega organa), endometrioza (pojav maternične sluznice zunaj normalnega mesta)), nastanek hormonsko odvisnih rakov (rak mod, prostate, dojk), nepravilnosti v delovanju tiroidnega, živčnega in adrenalnega sistema ter pojavnost imunskih in metaboličnih motenj (10).

HM lahko motijo endokrini sistem po več različnih poteh in mehanizmih delovanja. Glavna pot delovanja poteka preko direktne ali indirektne interakcije z jedrnimi receptorji (8). Človeški genom vsebuje 48 jedrnih receptorjev, ki so vključeni v uravnavanje ključnih funkcij, kot so razvoj zarodka, homeostaza, reprodukcija, metabolizem in odziv na ksenobiotike (11). Jedrni receptorji so od liganda odvisni transkripcijski faktorji in so na podlagi evlucijske sorodnosti razdeljeni v 6 skupin (12). Obravnavana jedrna receptorja v diplomskem delu (androgeni receptor (AR) in glukokortikoidni receptor (GR)) spadata med steroidne receptorje in se poleg estrogenega receptorja (ER) in mineralokortikoidnega receptorja (MR) uvrščata v 3 skupino jedrnih receptorjev (12). HM lahko direktno interagirajo z jedrnimi receptorji preko posnemanja delovanja endogenih hormonov. Pri tem se vežejo na jedrni receptor in aktivirajo gensko transkripcijo (agonistično delovanje) ali zasedejo vezavna mesta na jedrnih receptorjih, povzročijo konformacijske spremembe in/ali preprečijo vezavo receptorja na DNA, s čimer posledično preprečijo ekspresijo genov (antagonistično delovanje) (4). Med indirektno interakcije HM spadajo motenje steroidogeneze, metabolizma, transporta in sproščanja hormonov, vpliv na ekspresijo receptorjev, transkripcijskih koaktivatorjev in metabolnih encimov ter spreminjanje količine hormonov preko vpliva na celično signaliziranje (npr. inhibicija histon acetilaze, inhibicija aromataze) (8). Poleg delovanja preko klasične, počasne, genomske poti lahko delujejo tudi preko hitrih, negenomskih mehanizmov, znano pa je tudi medsebojno sporazumevanje med genomskimi in negenomskimi potmi (1). Na specifičen način delovanja HM vplivajo tudi njihove posebne karakteristike, kot so izkazovanje učinka delovanja pri zelo nizkih koncentracijah (13), tkivno specifično delovanje (14), aditivni učinek kombinacije HM (15) in učinkovanje po principu netipične, nemonotone krivulje odmerok-odziv (13,14). Pomembno vlogo pri razvoju potencialnih zdravstvenih težav predstavlja tudi obdobje in čas izpostavljenosti HM, pri čemer najboljčutljivejšo skupino predstavljajo nosečnice oziroma zarodek v razvoju (2). Poročila o prisotnosti HM v okolju so spodbudila diskusije po potrebi razvoja strategij za oceno varnosti in regulacijo kemikalij z lastnostmi endokrinega motilca. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in

razvoj (OECD) je že leta 1998 začela z visoko prioritarno nalogo, da obnovi obstoječe in razvije nove testne smernice za presejanje in testiranje kemikalij, ki lahko delujejo kot HM (EDC). OECD konceptualni okvir za testiranje in oceno EDC obsega pet nivojev in predstavlja orodje, preko katerega lahko z različnimi testi pridobimo informacije za detekcijo nevarnosti endokrinih motilcev (Priloga 1) (16).

1.2 ANDROGENI SISTEM

1.2.1 ANDROGENI

Splošno se izraz androgeni uporablja za razred steroidnih hormonov, ki vsebujejo 19-C-androstan steroidni skelet in so proizvedeni v spolnih žlezah in skorji nadledvične žleze pri obeh spolih (17). Pri moškem androgeni predstavljajo moške spolne hormone, ki opravljajo ključno funkcijo v različnih življenjskih obdobjih moškega. Med embriogenezo so odgovorni za razvoj moškega fenotipa, v puberteti za spolno dozorevanje in v odrasli dobi za vzdrževanje moške reproduktivne funkcije (18,19). Glavni predstavnik androgenov je testosteron, ki se primarno sintetizira iz holesterola v Leydigovih celicah v modih. Prav tako se v manjši meri sintetizira v skorji nadledvične žleze in v jajčnikih pri ženskah. Sinteza testosterona je uravnavana preko osi hipotalamus-hipofiza-spolne žleze. Hipotalamus izloča gonadoliberin (GnRH), ki nadalje uravnava izločanje hormonov iz sprednje hipofize - folikle stimulirajočega hormona (FSH) in luteinizirajočega hormona (LH). FSH spodbuja spermatogenezo v Sertolijevih celicah, LH pa sintezo testosterona v Leydigovih celicah v modih. Po načelu negativne povratne zveze testosteron zavira sproščanje FSH in LH iz hipofize ter GnRH iz hipotalamusa (20). Testosteron se pod vplivom encima 5α -reduktaze (tip 2) v moškem urogenitalnem traktu, koži genitalij, lasnih foliklih in v jetrih pretvori v 5α -dihidrotestosteron (DHT). DHT je odgovoren za maskulinizacijo genitalij in utero ter za spremembe v času pubertete (rast in aktivnost prostate, rast moškega spolnega organa, potemnitev kože mod, rast sramnih dlak ter dlak po obrazu in telesu). V času pubertete se v koži izrazi tudi encim 5α -reduktaza (tip 1), ki prispeva k aktivnosti žlez lojnic in pojavu aken. Testosteron, ki se ne pretvori v DHT, je odgovoren za uravnavanje funkcije Sertolijevih celic, povečanje VLDL in LDL, zmanjšanje HDL, odlaganje maščob na trebuhu, spodbujanje rasti kosti, anabolno delovanje ter vzdrževanje erektilne funkcije in libida (21).

Androgeni imajo pomembno fiziološko vlogo tudi pri ženskah (18). Pomembni so za razvoj reproduktivne funkcije, hormonske homeostaze in predstavljajo vmesne prekurzorje

v biosintezi estrogenov (17). Glavna prekurzorja v sintezi estrogenov sta androstendion in testosteron, njuno konverzijo v estrogene katalizira encimski kompleks aromataza (22). Med mesta delovanja androgenov pri ženskah spadajo hipotalamus, limbični sistem, kosti, prsi, skeletne mišice, adipozno tkivo in genitalije. Androgeni pri ženskah tako vplivajo na gostoto kosti, mišično maso in moč, porazdelitev adipoznega tkiva, spolno željo, razpoloženje in energijo (17).

1.2.2 ANDROGENI RECEPTOR

Androgeni večino svojih učinkov izvajajo preko interakcije z androgenim receptorjem (AR), ki ga uvrščamo med jedrne receptorje (19). Sestava AR vključuje tri glavne domene: N-terminalno domeno (NTD), DNA-vezavno domeno (DBD) in ligand-vezavno domeno (LBD) (23). NTD služi kot mediator večine AR transkripcijske aktivnosti, saj omogoča vezavo in zagon delovanja ko-regulatorjev. DBD vsebuje motiv dveh zinkovih prstov, ki omogočata prepoznavo specifičnega DNA zaporedja, vezavo receptorja na DNA in dimerizacijo monomerov receptorja. LBD predstavlja vezavno domeno AR, ki izkazuje visoko afiniteto do androgenih ligandov (24). AR se pred vezavo liganda nahaja v citoplazmi, vezan na proteine toplotnega šoka, kot so Hsp90 in Hsp70 (25). Po vezavi androgenov pride do sprostitve proteinov toplotnega šoka in konformacijske spremembe AR, kateri sledi vstop receptorja v jedro, fosforilacija in tvorba homodimera. AR-dimer se nadalje veže na androgen odzivni element (ARE), ki se nahaja v regulatorni regiji tarčnega gena. Sledi vezava kompleksa ko-regulatorjev, kar vodi v začetek transkripcijskega procesa in sprememb v ekspresiji tarčnih genov (19) (Priloga 2).

Delovanje androgenov preko AR spada med klasično genomsko delovanje, katerega učinek je običajno viden po več kot pol ure. Novejše raziskave navajajo tudi hitro, negenomsko delovanje androgenov, katerih učinek je viden v časovnem intervalu nekaj sekund oz. minut. Mehanizem negenomskega delovanja androgenov naj bi potekal preko klasičnega intracelularnega androgenega receptorja, transmembranskega androgenega receptorja in transmembranskega spolne hormone vezujočega globulina (26).

1.2.3 ENDOKRINI MOTILCI ANDROGENEGA SISTEMA

Znanih je več mehanizmov delovanja, po katerih endokrini motilci lahko motijo poti androgene signalizacije. Endokrine motilce androgene signalizacije lahko razdelimo v dve skupini. Med prvo skupino uvrščamo spojine, ki motijo biosintezo ali metabolizem

androgenov in tako indirektno spreminjajo funkcijo androgenov (t.i. od receptorja neodvisni motilci). V drugo skupino uvrščamo spojine, ki interagirajo z AR in motijo od liganda odvisno transkripcijsko funkcijo (t.i. od receptorja odvisni motilci) (27). Med ostale mehanizme delovanja androgenih motilcev spadajo še motnje ekspresije stopnje androgenih receptorjev in motnje signalizacije povratne zanke FSH/LH (28).

Motilce, ki delujejo preko androgenih receptorjev, lahko klasificiramo v agoniste in antagonist. Agonist se veže na AR in sproži odziv, ki posnema učinek naravno prisotnega androgena. Antagonisti delujejo nasprotno kot agonisti in blokirajo aktivacijo AR. (27). Tako ksenobiotiki, ki posnemajo učinke androgenov, kot ksenobiotiki, ki izkazujejo antiandrogeni učinek, vodijo v pojav neželenih učinkov. Glede na dosedanje raziskave večina okoljskih endokrinih motilcev, ki moti androgeno signalizacijo in ki jih povezujejo z nastankom večjih zdravstvenih težav, učinkuje kot antiandrogeni (28).

Ker je moška spolna diferenciacija v celoti odvisna od androgenov, imajo spojine, ki delujejo kot motilci androgenega sistema, večji vpliv na razvoj moškega reproduktivnega trakta. Študije povezujejo prenatalno izpostavljenost antiandrogenim motilcem s povečano pojavnostjo kritporhizma, hipospadiaze, raka testikularnih zarodnih celic, z zmanjšanim številom semenčic ter z zamaknjeno puberteto in zmanjšano anogenitalno distanco pri novorojenih fantkih (27). Izpostavljenost antiandrogenom pri odraslih moških povezujejo s pojavnostjo zmanjšane števila semenčic v semenski tekočini, azoospermijo (semenska tekočina ne vsebuje semenčic) in z zmanjšanjem libida (28).

Pri ženskah izpostavljenost eksogenim androgenom vodi v maskulinizacijo (20), motnje v delovanju androgenega sistema pa so povezane s pojavom sindroma policističnih jajčnikov (hiperandrogenizem) ali prezgodnjim prenehanjem delovanja jajčnikov (inaktivacija androgenih receptorjev) (29). Primeri kemikalij, ki motijo androgeni sistem, so predstavljeni v prilogi 3.

1.3 GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM

1.3.1 GLUKOKORTIKOIDI

Glukokortikoidi so steroidni hormoni, ki vsebujejo 21-C-pregnan steroidni skelet in se sintetizirajo v zoni fasciculati skorje nadledvične žleze. Najpomembnejši endogeni glukokortikoid je kortizol, ki ga imenujemo tudi hidrokortizon. Odgovoren je za izvajanje večine (najmanj 95 %) glukokortikoidnih učinkov. Za preostali delež glukokortikoidnih učinkov je odgovoren kortikosteron (30). Sinteza in sproščanje glukokortikoidov je

uravnavano preko osi hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvične žleze (HPA os). Hipotalamus izloča kortikotropin sproščujoči faktor (CRF) in vazopresin, katera aktivirata izločanje adrenokortikotropnega hormona (ACTH) iz hipofize. ACTH nadalje stimulira sintezo in izločanje glukokortikoidov iz skorje nadledvične žleze. Sproščanje ACTH in CRF je inhibirano preko negativne povratne zveze z naraščujočo koncentracijo glukokortikoidov v krvi (20). Večina kortizola v plazmi (90 %) se veže na kortikosteroid vezujoči globulin, medtem ko je preostali kortizol prost ali šibko vezan na albumin in lahko učinkuje na tarčne celice (31).

Glukokortikoidi so pomembni regulatorji metabolizma ogljikovih hidratov, maščob in proteinov (31). Na metabolizem ogljikovih hidratov vplivajo preko stimulacije glukoneogeneze v jetrih ter zmanjšane privzema glukoze v celice, posledica česar je povečanje koncentracije glukoze v krvi. Vpliv glukokortikoidov na metabolizem proteinov se kaže v zmanjšani sintezi proteinov in povečanem katabolizmu proteinov v vseh celicah, razen v jetrih, zmanjšanem transportu aminokislin v ekstrahepatična tkiva in povečanem transportu aminokislin v jetra. Posledično se poveča sinteza proteinov v jetrih in konverzija aminokislin v glukozo. Glukokortikoidi tudi povečajo mobilizacijo maščobnih kislin iz adipoznih tkiv, zaradi česar je v krvi na voljo več prostih maščobnih kislin, ki jih telo namesto glukoze lahko porabi za tvorbo energije (30). Skupni cilj vseh opisanih učinkov glukokortikoidov je povečanje razpoložljivosti glukoze za glukozno odvisna tkiva, kot so možgani in srce v času stradanja. Glukokortikoidi vplivajo tudi na imunski odziv preko regulacije aktivnosti levkocitov, zaviranja tvorbe citokinov in preko vpliva na življenjsko dobo imunskih celic (31,32). Med ostale funkcije glukokortikoidov spadajo tudi vpliv na delovanje centralnega živčnega sistema, prebavnega, renalnega, reproduktivnega in hematopoetskega sistema (31).

1.3.2 GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR

Glukokortikoidi izvajajo svoje fiziološke funkcije preko vezave na glukokortikoidni receptor (GR) (31). GR so steroidni hormonski receptorji, ki jih skupaj z androgenim, estrogenim in mineralokortikoidnim receptorjem uvrščamo v 3 skupino superdružine od ligandov odvisnih transkripcijskih faktorjev - jedrnih receptorjev (12).

Sestava GR vključuje N-terminalno domeno (NTD), DNA-vezavno domeno (DBD) in ligand vezavno domeno (LBD). Vse tri domene imajo ključno funkcijo pri opravljanju transkripcijske aktivnosti GR. NTD vsebuje regijo AF1, preko katere poteka direktna

interakcija s transkripcijskimi faktorji in kofaktorji. Preko DNA vezavne domene poteka vezava na specifično zaporedje DNA, imenovano hormonski odzivni element (HRE). LBD vsebuje žep za vezavo liganda in regijo AF2, preko katere potekajo interakcije s koaktivatorji in korepresorji (12,33). GR se pred vezavo liganda nahajajo v citoplazmi, kjer tvorijo komplekse s proteini toplotnega šoka. Po vezavi liganda na GR pride do aktivacije receptorja, disociacije receptorja od multiproteinskega kompleksa ter do translokacije kompleksa ligand-GR v jedro. Nadalje se homodimeri kompleksa ligand-GR vežejo na zaporedje DNA, ki se imenuje glukokortikoidni odzivni element (GRE). GRE se nahajajo na promoterski regiji tarčnih genov (34). Kompleks ligand-GR se lahko veže na pozitivni GRE, kar vodi do aktivacije transkripcijskega procesa in do ekspresije tarčnega gena. Proces imenujemo transaktivacija. Nasprotno vezava na negativni GRE vodi v represijo ekspresije tarčnega gena (33). Transrepresija poteka tudi preko vezave kompleksa ligand-GR na podenote transkripcijskih faktorjev ter preko kompeticije za jedrne koaktivatorje (34) (Priloga 4). Transaktivacija in transrepresija sodita med genomske mehanizme delovanja glukokortikoidov. Med negenomske mehanizme sodijo vplivi glukokortikoidov na membrane lipidov, proteinov in intracitoplazemskih proteinov ter interakcije z glukokortikoidnimi transporterji (34).

1.3.3 ENDOKRINI MOTILCI GLUKOKORTIKOIDNEGA SISTEMA

Glukokortikoidni odzivi so regulirani preko različnih stopenj, kot so biosinteza, vezava na serumske proteine, celični privzem, vezava na receptor, metabolizem in izločanje iz organizma (35). Na delovanje glukokortikoidov vplivajo tudi faktorji, kot so tip in koncentracija liganda ter ekspresijska stopnja receptorja. Pomemben del predstavlja tudi vezavna afiniteta ligandov do GR in njihova biorazpoložljivost (33). Ksenobiotiki lahko zmotijo posamezne stopnje glukokortikoidne regulacije ali delujejo na različne tarče preko posnemanja glukokortikoidnih molekul (35). Motenje regulacije krvne koncentracije endogenih glukokortikoidov vodi do nastanka endokrinih motenj (33).

Ksenobiotiki, ki motijo razpoložljivost glukokortikoidov ali funkcijo GR, motijo status celične energije s spremembami ekspresije genov, ki so udeleženi v metabolizmu ogljikovih hidratov, lipidov in proteinov. Glukokortikoidi promovirajo zastoj celičnega cikla. Kronična izpostavljenost kemikalijam, ki motijo z glukokortikoidi nadzorovan celični cikel, predstavlja potencialno tveganje za razvoj raka. Pravilna funkcija glukokortikoidov je pomembna v kritičnem oknu med nosečnostjo za regulacijo časa

nosečnosti in poroda. Motnje v sintezi glukokortikoidov, regulaciji HPA osi in 11 β -HSD2 aktivnosti povezujejo s spremenjeno dolžino nosečnosti in poroda (35). Ksenobiotiki, ki inhibirajo 11 β -HSD2, preprečijo inaktivacijo kortizola v zbiralcih in distalnih tubulih ledvic, kar vodi do aktivacije MR s kortizolom in do posledičnega zadrževanja natrija ter nastanka hipertenzije. 11 β -HSD2 ima ključno funkcijo tudi v regulaciji razvoja ploda in varuje plod pred visokimi koncentracijami kortizola matere. Intrauterina izpostavljenost povečanim ravnom glukokortikoidov je povezana z zmanjšano porodno težo, glukozno intoleranco in kardiovaskularnimi komplikacijami kasneje v življenju. Inhibicija 11 β -HSD1 vodi do pomanjkanja glukokortikoidov, kar se kaže v neustreznem imunskem odzivu in vnetnih reakcijah (36). Motenje aktivnosti GR v možganih in spremenjena regulacija HPA osi vodi v nastanek kognitivnih motenj in prispeva k razvoju depresije. Med ostale psihične bolezni, povezane s povečano koncentracijo endogenih glukokortikoidov, spadajo še anksioznost, razdražljivost in psihoze. Kronično povečane ravni glukokortikoidov so povezane tudi z večjo dovzetnostjo za infekcijske bolezni (35). Primeri kemikalij, ki motijo glukokortikoidni sistem, so predstavljeni v prilogi 5.

V diplomski nalogi nas bo zanimal vpliv spojin paracetamola (PAR), diklofenaka (DIC) in njegovega metabolita 4'-hidroksidiklofenaka (4'-OH-DIC) ter piceatanola (PIC) na moduliranje AR in GR. Lastnosti naštetih spojin so predstavljene v nadaljevanju.

1.4 PARACETAMOL

1.4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Paracetamol (4-hidroksiacetanilid, N-acetil-p-aminofenol, acetaminofen, PAR) (37) strukturno spada med derivate anilina in ga skupaj z acetanilidom in fenacetinom uvrščamo med anilinske analgetike (38). Paracetamol se od acetanilida razlikuje po dodatni hidroksi skupini na para mestu benzenskega obroča (38). Po videzu je bel, kristalinični prašek, s tališčem med 168-171 °C in molekulsko maso 151,16 g/mol. Je brez vonja in je rahlo grenkega okusa. Slabo je topen v hladni vodi in etru, dobro topen je v vreli vodi in v alkoholih kot sta metanol in etanol (39).

1.4.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Absorpcija paracetamola iz gastrointestinalnega trakta je hitra in popolna (37), po metabolizmu prvega prehoda znaša biološka uporabnost med 60 in 89 % (38). Terapevtske

plazemske koncentracije paracetamola, ki so potrebne za učinkovito analgetično in antipiretično delovanje, se gibljejo med 10-20 µg/mL (66-132 µmol/L) (40) (Priloga 6). Začetek analgetičnega delovanja je pri posameznikih, ki vzamejo paracetamol na tešče, po približno 0,5 h. Najvišje plazemske koncentracije so po peroralni aplikaciji dosežene v 45-60 min. Volumen distribucije znaša pri odraslih med 1-2 L/kg. Paracetamol se enakomerno porazdeljuje v telesnih tekočinah, prosto prehaja skozi placento in skozi krvno-možgansko bariero (38). Okoli 2 % paracetamola se v urin izloči nespremenjenega, več kot 90 % se ga presnavlja v jetrih preko tvorbe konjugatov z glukuronsko kislino (2/3) in sulfatom (1/3). Med 5 in 9 % paracetamola se presnavlja preko oksidativnega metabolizma z encimom citokromoksidaza, večinoma preko izooblike CYP 2E1. Ob tem se tvori toksičen metabolit N-acetil-p-benzokinonimin (NAPQI), ki pa nadalje hitro reagira z glutationom do tvorbe nereaktivnega metabolita ter se izloči v obliki merkapturne kisline ali konjugata s cisteinom (41). Izločanje paracetamola skoraj popolnoma poteka preko ledvic, majhen odstotek se ga izloči preko žolča. Biološka razpolovna doba znaša med 2 in 4 ure (38).

1.4.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

Paracetamol deluje analgetično in antipiretično (38). Paracetamol je pri klasifikaciji analgetikov pogosto vključen med nesteroidne protivnetne učinkovine (NSAID), saj so njegove analgetične in antipiretične lastnosti podobne NSAID, vendar pa nasprotno z NSAID nima klinično pomembnega protivnetnega delovanja (42). Z razliko od NSAID v priporočenih odmerkih tudi ne povzroča gastrointestinalnih neželenih učinkov in ne izkazuje klinično pomembnega protitrombotnega delovanja (43). Mehanizem analgetičnega delovanja paracetamola še ni natančno razjasnjen. Med predlagane mehanizme delovanja spadajo inhibicija enega ali več ciklooksigenaznih (COX) encimov COX-1, COX-2 in COX-3, centralna inhibicija COX encimov, delovanja paracetamola kot reducenta, ki preprečuje pretvorbo arahidonske kisline v prostaglandin H₂ (PGH₂), inhibicija encima dušikov oksid sintaza (NOS) ter delovanje preko endokannabinoidnega in serotoninskega sistema (43,44). Mehanizem antipiretičnega delovanja paracetamola poteka najverjetneje preko blokade COX-2 encima. Paracetamol zmanjša nastanek prostaglandina E₂ (PGE₂) v cerebrospinalni tekočini in tako prepreči preko PGE₂ povzročeno pirogenozo (45).

1.4.4 TOKSIČNOST

Paracetamol je učinkovito in varno zdravilo, v kolikor se uporablja v priporočenih odmerkih 1-4 g/dan (41). Kljub varnosti zdravila ob pravilni uporabi, se toksičnost paracetamola pojavi ob zaužitju prevelike količine učinkovine (več kot 10-15 g pri odraslih ali več kot 150 mg/kg pri otrocih) (41) in je povezana zlasti s pojavom toksičnosti na jetrih (46). Hepatotoksičnost paracetamola je posledica tvorbe toksičnega metabolita NAPQI, ki se tvori ob oksidaciji paracetamola s CYP450 (37). Pri terapevtskih odmerkih paracetamola se NAPQI tvori v majhnih količinah, ki jih inaktivira glutacion in se izločijo v obliki nereaktivnih metabolitov preko urina (47). Pri prevelikih odmerkih paracetamola se zaradi zasičenja ostalih metaboličnih poti, poveča metabolizem preko CYP2E1 in nastane več toksičnega metabolita NAPQI. Zaradi omejenosti količine glutaciona v jetrih, se presežni NAPQI kovalentno veže na cisteinske skupine hepatocitov in jih uniči (41). Med paciente s povečanim tveganjem za hepatotoksičnost spadajo kronični alkoholiki in pacienti z zmanjšanimi zalogami glutaciona (48). Drugi organ, povezan s toksičnostjo paracetamola, so ledvica. Do poškodbe ledvic lahko pride ob akutnem predoziranju ali ob kroničnem jemanju velikih odmerkov paracetamola (38). Interakcije paracetamola s hormonskim sistemom so predstavljene v prilogi 7.

1.4.5 IZPOSTAVLJENOST PARACETAMOLU

Paracetamol spada danes med najbolj pogosto uporabljene učinkovine za zdravljenje bolečine in vročine. Uvršča se med najbolj pogosto uporabljena zdravila tako med zdravili brez recepta kot tudi med predpisanimi zdravili (49). Uporablja se za zmanjševanje bolečine in vročine pri odraslih in otrocih (38). Široko se uporablja tudi kot zdravilo prve uporabe pri zdravljenju vročine in bolečine v nosečnosti, saj ostala zdravila, kot so ibuprofen in acetilsalicilna kislina v nosečnosti niso smatrana za varna (50). Paracetamol se uporablja za lajšanje akutne bolečine (bolečine pri prehladu, glavobolu, bolečine v mišicah, hrbtu, dismenoreji ter zobobolu) (38) in kronične bolečine (dolgotrajno analgetično zdravljenje blage do srednje močne bolečine, povezane z osteoartritisom ter z bolečinami mišic in kit) (47). Pogostejšo uporabo kot tudi zlorabo paracetamola so opazili pri športnikih (51,52). Paracetamol se uporablja tudi v veterinarski medicini, kjer ni postavljene časovne omejitve uporabe in ni zakonsko predpisanih maksimalnih koncentracij, ki jih meso sme vsebovati (53).

Zaradi široke uporabe paracetamola so nM do μ M koncentracije paracetamola pogosto

zaznane v vodnem okolju (Priloga 8). Prisotnost N-acetil-4-aminofenola (paracetamola) so v širokih koncentracijskih območjih zaznali tudi v urinu splošne populacije (50,53,54). V študiji Modick in sod. (2013) (53) so v urinu vseh preiskovanih zaznali prisotnost N-acetil-4-aminofenola v koncentracijskem območju od 8,7 µg/L do 22120 µg/L. Pri skupini ljudi, ki je trdila, da nikoli ni vzela paracetamola, so bile vrednosti od 59,1 µg/L do 424,5 µg/L. Pri skupini, ki je trdila, da zelo redko vzame paracetamol, vendar ne v zadnjih nekaj tednih, so bile vrednosti od 8,7 do 1700 µg/L. Oseba, ki je vzela paracetamol v zadnjih 24 urah, je imela najvišjo vrednost 22120 µg/L (53). V študiji Nielsen in sod. (54) so testirali vzorce urina otrok, starih med 6 in 11 let in njihovih mater. Paracetamol je bil zaznan v urinu vseh preiskovanih mater (povprečje 120 µg/L) in pri vseh otrocih, razen pri enem (povprečje 27 µg/L) (54).

Poleg neposredne uporabe paracetamola kot analgetika, je splošna populacija lahko izpostavljena tudi posredno, npr. preko izpostavljenosti kemikaliji anilin, ki se v telesu metabolizira do N-acetil-4-aminofenola (paracetamola) (50,53). Znani so tudi endokrini učinki delovanja paracetamola, ki bodo v nadaljevanju predstavljeni skupaj z rezultati diplomske naloge v poglavju Razprava - paracetamol.

1.5 DIKLOFENAK IN METABOLIT 4'-HIDROKSIDIKLOFENAK

1.5.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Diklofenak (2-[2-(2,6-diklorofenilamino)fenil]ocetnakislina) strukturno spada med derivate fenilocetne kisline (55) in ga skupaj z ostalimi analgetiki in antirevmatiki, kot so indometacin in sulindak, uvrščamo v podskupino nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID) - med derivate očetne kisline in sorodne učinkovine (56). Po videzu je diklofenak bel, kristaliničen prašek, s tališčem med 156 - 158 °C in molekulska masa 296,15 g/mol (57). Vrednost pKa znaša 4.0, je praktično netopen v kisljih raztopinah, raztaplja se v intestinalni tekočini in v vodi (55). Uporablja se v obliki soli kot natrijev ali kalijev diklofenak (58).

1.5.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Absorpcija diklofenaka je hitra in popolna (59). Zaradi metabolizma, ki poteče pri prvem prehodu skozi jetra, znaša biološka uporabnost po peroralni uporabi okoli 60 %. Po topikalni uporabi predstavlja absorpcija diklofenaka 6-7 % sistemske biorazpoložljivosti (60). Obširno se veže na plazemske proteine (več kot 99,7 %), večinsko na albumine.

Zaradi obširne vezave ima relativno majhen volumen distribucije (5-10 L). Pripravki v obliki gastrorezistentnih tablet, svečk in raztopin se hitro absorbirajo, z doseženimi maksimalnimi plazemskimi koncentracijami (cmax) nekje med 1.5-2 ure. Primeri maksimalnih plazemskih koncentracij diklofenaka in njegovega metabolita 4'-hidroksidiklofenaka glede na različne tipe farmacevtskih oblik in poti aplikacije so predstavljeni v prilogi 6. Diklofenak dobro prehaja tudi v sinovialno tekočino. Maksimalne koncentracije v sinovialni tekočini so dosežene 2-4 ure po dosegu maksimalnih plazemskih koncentracij v plazmi. Koncentracije diklofenaka v sinovialni tekočini dosegajo 60 do 70 % vrednosti serumske koncentracije (59), vendar je razpolovni čas iz sinovialne tekočine trikrat daljši kot iz plazme (60). Diklofenak je podvržen obširnemu jetrnemu metabolizmu, ki vključuje aromatično hidroksilacijo in konjugacijo z glukuronsko kislino (61). Glavni metabolit pri ljudeh je 4'-hidroksidiklofenak (4'OH-DIC), ki nastane po metabolizmu s CYP2C9. 4'OH-DIC je aktiven metabolit, izkazuje 30 % protivnetnih in antipiretičnih aktivnosti diklofenaka (60). Ostali hidroksi metaboliti 5-hidroksi, 4',5-dihidroksi, 3'-hidroksi, 3'-hidroksi-4'-metoksidiklofenak in njihovi konjugati so zastopani v manjšini (62,63). Večina diklofenaka se izloči z urinom in žolčem kot 4'OH-DIC ali njegov acilglukuronidni derivat (63). Biološka razpolovna doba diklofenaka znaša med 1 in 3 urami (64).

1.5.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

Delovanje diklofenaka je protivnetno, protibolečinsko in protivročinsko (59). Uvrščamo ga med nesteroidna protivnetna zdravila (NSAID). Mehanizem delovanja diklofenaka temelji na inhibiciji encimov ciklooksigenaze (COX) in posledični inhibiciji sinteze prostaglandinov, ki imajo pomembno vlogo pri nastanku vnetja, bolečine in povišane telesne temperature (65). Pogosto se uporablja za zmanjševanje vnetja in bolečine povezane s kroničnimi zdravstvenimi stanji, kot so osteoartritis, revmatoidni artritis, ankilozirajoči spondilitis in za zmanjševanje akutne mišične bolečine (66).

1.5.4 TOKSIČNOST

Uporaba diklofenaka je povezana s povečanim tveganjem za pojav gastrointestinalnih (GIT), kardiovaskularnih (KV) in ledvičnih neželenih učinkov (67). Pojav GIT stranskih učinkov, kot so ulceracije, je lokalno povezan s poškodbo sluznice in sistemsko z inhibicijo encima ciklooksigenaze 1 (COX-1). Inhibicija encima COX-1 zavre tvorbo

prostaglandinov, kar vodi do okrnjene zaščite želodca zaradi zmanjšane sinteze in sekrecije mukusa ter bikarbonatov, zmanjšanja krvnega pretoka sluznice ter zmanjšanja epiteljske proliferacije (68). Povečano tveganje za KV dogodke je povezano z inhibicijo encima ciklooksigenaze 2 (COX-2) in posledično inhibicijo sinteze prostaglandina I₂ (PGI₂), ki deluje kot vazodilatator in inhibitor agregacije. Inhibicija sinteze PGI₂ poveča tveganje za nastanek hipertenzije in tromboze (67). Posledica inhibicije sinteze prostaglandinov vodi tudi do sprememb v mehanizmih na področju ledvic, kot so spremembe tonusa žil, vaskularne permeabilnosti in regulacije ionov (65). Občasno lahko diklofenak povzroči tudi redko, ampak resno poškodbo jeter (61). Idiosinkratična hepatotoksičnost je lahko posledica nastanka rekativnih metabolitov (kinoniminov, acilglukuronidov in izoglukuronidov), oksidativnega stresa ali poškodbe mitohondrijev (61). Interakcije diklofenaka s hormonskim sistemom so predstavljene v prilogi 7.

1.5.5 IZPOSTAVLJENOST DIKLOFENAKU

Diklofenak spada med najpogosteje uporabljena nesteroidna protivnetna zdravila (66). Terapevtsko se pogosto uporablja za zdravljenje kroničnih bolezni, kot je osteoarthritis, kar vodi v vsakodnevno izpostavljenost diklofenaku skozi daljše časovno obdobje (58). Od leta 1993 je diklofenak v Evropski Uniji registriran tudi za namen veterinarske uporabe. V petih državah članicah je dovoljen za uporabo na živalih, ki so namenjene prehrani, kot so govedo, prašiči in konji (69). Diklofenak se iz telesa izloči nespremenjen in v obliki konjugiranih ali nekonjugiranih hidroksi metabolitov z urinom in blatom (70). Posledično diklofenak in njegovi metaboliti tako kot večina farmacevtikov doseže vodno okolje preko domačih odpadkov in komunalnih čistilnih naprav (71). Učinkovitost odstranjevanja diklofenaka iz komunalnih odpadnih vod rangira od 0 do 80 %, večinoma v območju med 21 in 40 % (70). Zaradi široke medicinske in veterinarske uporabe so danes ostanki diklofenaka redno zaznani v površinskih vodah (65). Prisotnost diklofenaka je bila zaznana v površinskih vodah, podtalnicah in v odpadnih vodah v ng/L do µg/L koncentracijskem območju (70) (Priloga 8). Diklofenak se uvršča zato med najpogosteje najdene ostanke zdravil v okoljskih vodah (71,72). Evropski parlament in Svet Evropske unije je v direktivi 2013/39/EU uvrstil diklofenak na seznam snovi, katerih spremljanje je potrebno, saj bi lahko na ravni Unije pomenile znatno tveganje za vodno okolje (73). Znani so tudi endokrini učinki delovanja diklofenaka, ki bodo v nadaljevanju predstavljeni skupaj z rezultati diplomske naloge v poglavju Razprava - diklofenak.

1.6 PICEATANOL

1.6.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Piceatanol (3,5,3',4' – tetrahidroksistilben) je strukturni analog resveratrola, od katerega se razlikuje v dodatni hidroksi skupini na mestu 3' (74). Spada med polifenole, njegova stilbenska struktura je sestavljena iz dveh fenolnih obročev, ki sta povezana z dvojno vezjo in se nahaja v sterično bolj stabilni trans obliki. Piceatanol je po videzu rumenobeli kristalinični prašek, s tališčem med 223-226 °C in molekulsko maso 244,24 g/mol. Je netopen v vodi, topi se v etanolu ali DMSO (74,75).

1.6.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Farmakokinetične študije piceatanola pri ljudeh še niso bile izvedene. Znani so farmakokinetični podatki iz *in vivo* študij na podganah, kjer so piceatanol administrirali intravensko (76,77) ter oralno (76). Študije nakazujejo, da je piceatanol v široki meri izpostavljen metabolizmu II. faze (tvorba glukuronidov in sulfatov), zaradi česar je njegova biološka uporabnost zmanjšana in znaša okoli 10 %. Večjo biološko uporabnost se lahko doseže s stabilizacijo hidroksi skupin preko tvorbe metoksi derivatov, s čimer se biološka uporabnost poveča na 50.7 ± 15.0 % (76). Po oralni administraciji odmerka 10 mg/kg podganam, je maksimalna plazemska koncentracija znašala 710 ± 219 ng/mL ter razpolovni čas 45-120 min (76). Piceatanol se v visoki meri porazdeljuje v tkiva, v večji meri naj bi se izločal ne-renalno, saj je delež urinarnega izločanja znašal le 32,8 % (77).

1.6.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

Piceatanol, podobno kot ostali strukturni analogi resveratrola, izkazuje številne farmakološke aktivnosti, kot so antikancerogeno, protivnetno in antioksidativno delovanje (77). Antikancerogeno delovanje piceatanola, kot so inhibicija rasti in proliferacije rakavih celic ter aktivacija apoptoze rakavih celic, so dokazovali v več študijah na primeru različnih vrst raka (melanom (78), limfom (79), rak prostate (80), črevesja (81), dojke (82) in mehurja (83)). Piceatanol deluje tudi kot neselektivni inhibitor COX-1 in COX-2 encimov, zavira aktivacijo NFkB in izločanje TNF- α ter interleukina 8, kar mu omogoča protivnetno delovanje (75,84). Poleg naštetega, piceatanol deluje tudi protiglivično (85) in protibakterijsko (86), študije pa preiskujejo tudi njegov potencial za preprečevanje nastanka Alzheimerjeve bolezni (87) in srčno-žilnih zapletov (88).

1.6.4 TOKSIČNOST

Raziskave učinkov piceatanola potekajo v smeri odkrivanja številnih pozitivnih farmakoloških učinkov, medtem ko neželeni učinki piceatanola še niso poznani. Na področju potencialne toksičnosti piceatanola so potrebne dodatne raziskave, kar kaže primer spreminjanja učinka piceatanola v odvisnosti od odmerka. Piceatanol je v študiji Vo (2010) (89) v μM koncentracijah izkazoval antikancerogeni učinek, v nižjih nM koncentracijah pa deloval prokancerogeno (89). Piceatanol z razliko od resveratrola vsebuje tudi dodatno OH skupino, kar piceatanol uvršča med spojine s kateholno skupino. Kateholna skupina lahko med oksidacijo vodi v nastanek škodljivih reaktivnih kisikovih spojin (75,90). Interakcije piceatanola s hormonskim sistemom so predstavljene v prilogi 7.

1.6.5 IZPOSTAVLJENOST PICEATANOLU

Piceatanol je naravno prisoten v več rastlinah. Spada med naravno prisotne stilbene, ki se v rastlinah tvorijo kot zaščita proti boleznim, kot so mikrobne in virusne okužbe ter kot zaščita proti izpostavitvi ultravijolični svetlobi (74). Človek je piceatanolu v največji meri izpostavljen preko uživanja grozdja in vina (75). Piceatanol najdemo tudi v ostalih živilih, namenjenih prehrani: ameriška borovnica (91), marakuja (92), mandlji (93), rabarbara (94) ter v pijačah kot so črni, zeleni, kamilični in lipov čaj, jabolčni ter breskov sok (75). Človek je piceatanolu lahko izpostavljen tudi preko uživanja živil in prehrabnih dopolnil, ki vsebujejo resveratrol. Piceatanol nastane kot produkt metabolizma resveratrola preko hidroksilacije z encimi CYP 1A1, 1A2 in 1B1 (95). Primeri koncentracij, v katerih se piceatanol nahaja v živilih in v plazmi po odmerku resveratrola, so predstavljeni v prilogi 9.

Znani so tudi endokrini učinki delovanja piceatanola, ki bodo v nadaljevanju predstavljeni skupaj z rezultati diplomske naloge v poglavju Razprava - piceatanol.

2 NAMEN DELA

V zadnjem času se je število raziskav, ki kažejo na potencialno povezavo med izpostavitvijo kemikalijam, ki motijo endokrini sistem in nastankom endokrinih motenj pri živalih in ljudeh, povečalo. Identificiranje kemikalij, ki tvorijo interakcije z endokrinim sistemom in delujejo kot hormonski motilci, zato ostaja ena izmed prednostnih nalog na področju toksikologije. Več študij se osredotoča na preiskovanje vpliva kemikalij na estrogenski sistem, medtem ko so ostali endokrini sistemi slabše raziskani. V naši raziskavi se bomo osredotočili na preiskovanje potencialnega vpliva spojin paracetamola (PAR), diklofenaka (DIC) in njegovega metabolita 4'-hidroksidiklofenaka (4'OH-DIC) ter piceatanola (PIC) na androgeni in glukokortikoidni sistem. Vsem preiskovanim spojinam je skupno, da v svojih strukturah vsebujejo elemente, ki lahko posnemajo delovanje endogenih steroidnih hormonov. Vse testirane spojine inhibirajo encim ciklooksigenazo, delujejo protivnetno in jih tako v širšem smislu lahko skupno uvrščamo med nesteroidne protivnetne spojine. Pregled strokovnih člankov dosedanjih *in vitro* ter *in vivo* študij je pokazal, da PAR in PIC izkazujeta afiniteto vezave na receptorje endokrinega sistema in izkazujeta potencial, da delujeta kot hormonska motilca. Vpliv DIC na endokrini sistem je še neraziskan, več raziskav pa preučuje njegov toksični vpliv na vodne organizme. PAR in DIC se široko uporabljata v terapevtske namene, preiskovanima spojinama pa smo potencialno lahko izpostavljeni tudi preko okolja, saj številne raziskave kažejo na prisotnost PAR in DIC v nM in μ M koncentracijskem območju v vodnem okolju.

V diplomski nalogi bomo za testiranje morebitnih agonističnih in antagonističnih učinkov na androgenem in glukokortikoidnem receptorju uporabili *in vitro* metodo testiranja spojin s celično linijo MDA-kb2. Prvi del eksperimentalnega dela bo namenjen določanju citotoksičnosti preiskovanih spojin na izbrani celični liniji MDA-kb2 z uporabo MTS testa citotoksičnosti. Drugi del bo namenjen določanju potencialnih agonističnih in antagonističnih učinkov preiskovanih spojin na androgene in glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2 z uporabo luciferaznega testa.

Na podlagi rezultatov določitve prve necitotoksične koncentracije testiranih spojin z MTS testom bomo določili še ostale nižje koncentracije, ki jih bomo uvrstili v nadaljnje testiranje z luciferaznim testom. Pri tem bomo upoštevali, da bomo z izbiro velikostnega razreda testiranih koncentracij pokrili tako območje koncentracij, v katerih se testirane spojine nahajajo v plazmi po terapevtski uporabi (PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC), kot tudi območje koncentracij, v katerih so testirane spojine lahko prisotne v okolju (PAR in DIC).

Namen naše raziskave bo tako ovrednotiti ali testirane spojine v koncentracijah, katerim smo izpostavljeni ob terapevtski uporabi ali ob potencialni izpostavljenosti preko okolja, na androgene in glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2 delujejo agonistično in/ali antagonistično.

Z našo raziskavo bomo poskušali potrditi ali zavrniti naslednje hipoteze:

1. hipoteza: PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC izkazujejo učinke na AR in GR MDA-kb2 celične linije, saj v svoji strukturi vsebujejo elemente (aromatski obroč s prosto hidroksilno skupino, halogenska skupina), s pomočjo katerih lahko tvorijo interakcije z AR in GR ter posledično posnemajo ali preprečujejo delovanje endogenih hormonov.

2. hipoteza: Metabolit 4'OH-DIC bo izkazoval večji učinek na AR in GR kot DIC, saj v primerjavi z DIC na aromatskem obroču vsebuje dodatno prosto hidroksilno skupino, katera lahko pripomore k večji afiniteti vezave na AR in GR.

3. hipoteza: PAR je v dosedanjih toksikoloških študijah izkazoval antiandrogeni potencial, zato predpostavljamo, da bo tudi na AR celične linije MDA-kb2 deloval antagonistično.

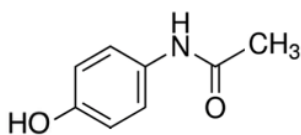
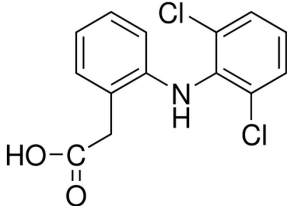
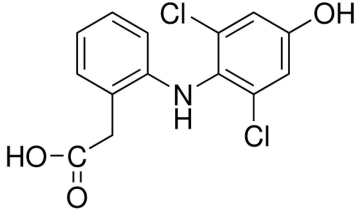
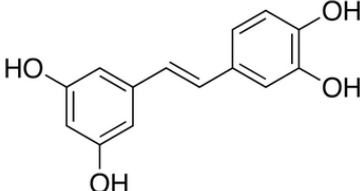
3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

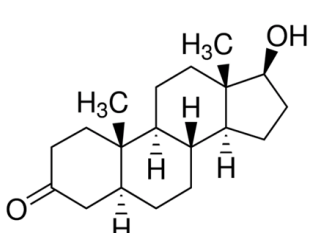
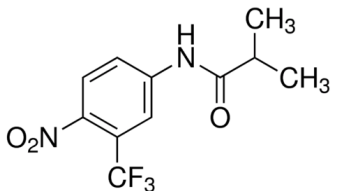
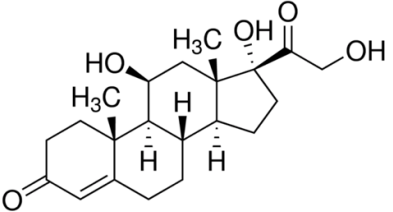
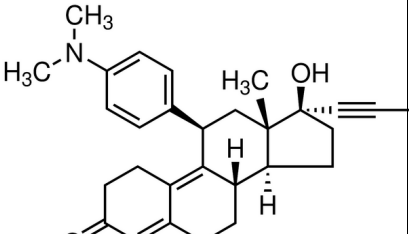
3.1.1 TESTIRANE SPOJINE

Potencialni učinek na androgene receptorje (AR) in glukokortikoidne receptorje (GR) smo preučevali pri spojinah paracetamol (PAR), diklofenak (DIC), 4'-hidroksidiklofenak (4'OH-DIC) in piceatanol (PIC). Kot pozitivne kontrole smo uporabili dihidrotestosteron (DHT), flutamid (FLU), hidrokortizon (HC) in mifepriston (RU-486). Strukturne formule in osnovne informacije uporabljenih testiranih spojin in kontrol so predstavljene v preglednicah I in II.

Preglednica I: Testirane spojine

Ime/Stopnja čistote/ Proizvajalec	Oznaka	Struktura	CAS	M [g/mol]
PARACETAMOL ≥ 99,0 % Sigma-Aldrich, Nemčija	PAR		103-90-2	151,16
DIKLOFENAK > 98,0 % TCI Europe N.V.	DIC		15307-86-5	296,15
4'-HIDROKSIDIKLOFENAK > 98 % Toronto Research Chemicals, Kanada	4'OH-DIC		64118-84-9	312,15
PICEATANOL > 98,0 % TCI Europe N.V.	PIC		10083-24-6	244,25

Preglednica II: Spojine, uporabljene kot pozitivne kontrole (agonisti/antagonisti na AR/GR)

Ime/Stopnja čistote/ Proizvajalec	Oznaka	Struktura	CAS	M [g/mol]
DIHIDROTESTOSTERON ≥ 97,5 % Sigma-Aldrich, Nemčija	DHT		521-18-6	290,44
FLUTAMID ≥ 99 % Sigma-Aldrich, Nemčija	FLU		13311-84-7	276,21
HIDROKORTIZON ≥ 98 % Sigma-Aldrich, Nemčija	HC		50-23-7	362,46
MIFEPRISTON ≥ 98 % Sigma-Aldrich, Nemčija	RU-486		84371-65-3	429,59

3.1.2 REAGENTI

Preglednica III: Uporabljeni reagenti

Okrajšava	Celotno ime/opis reagenta	Proizvajalec
DMSO	Dimetil sulfoksid $\geq 99,9 \%$	Sigma-Aldrich, Nemčija
FBS	Fetalni telečji serum (ang. Fetal bovine serum)	Gibco, USA
L-15 medij	Leibovitz L-15 medij	Sigma-Aldrich, Nemčija
PBS	Fosfatni pufer (ang. Phosphate buffered saline)	Gibco, USA
Penicilin/streptomycin	Raztopina antibiotika penicilina (10000 U/mL) in streptomicina (10000 $\mu\text{g/mL}$)	Gibco, USA
RLB	Pufer za lizo celic (ang. Reporter Lysis 5 \times Buffer)	Promega, Madison, USA
Luciferazni reagent	Luciferazni reagent (ang. Luciferase Assay Reagent, sestavljen iz Luciferase Assay Buffer in Luciferase Assay Substrate)	Promega, Madison, USA
MTS reagent	Reagent MTS; CellTiter 96 $\text{\textcircled{R}}$ AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, USA
Tripan modro	Tripan modro (ang. Trypan blue)	Sigma-Aldrich, Nemčija
Tripsin	Tripsin (ang. Trypsin)	Gibco, USA

3.1.3 LABORATORIJSKI MATERIALI IN APARATURE

Preglednica IV: Uporabljeni laboratorijski materiali in aparature

Laboratorijski material in aparature	Proizvajalec
Analitska tehnica	Mettler Toledo, Švica
Brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra, Slovenija
Centrifuga	Tehtnica, Slovenija (model Centric 322A)
Centrifugirke (15 mL, 50 mL)	TPP, Švica
Čitalec mikrotitrskih plošč	BioTek, USA (model Synergy HT)
Filter za sterilno filtracijo (0,22 μm)	TPP, Švica
Hemocitometer	Brand, Nemčija
Hladilnik (+2 $^{\circ}\text{C}$ do +8 $^{\circ}\text{C}$)	Gorenje, Slovenija
Inkubator (37 $^{\circ}\text{C}$, brez CO_2)	Sanyo, Japan (model MCO-18AIC)
Invertni mikroskop	Olympus, Japan (model CKX41)
Mikrocentrifugirke (epice) (1mL)	TPP, Švica

Mikrotitrne plošče (za MTS test)	TPP, Švica (tip 92096, 96 vdolbinic, prozorne)
Mikrotitrne plošče (za luciferazni test)	Greiner Bio One, Avstrija (tip 655074, Lumitrac 600, 96 vdolbinic, bele)
Nastavki za pipete	TPP, Švica
Pipete 0,5-10 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL	Biohit, Finska (model mLine)
Pipeta, avtomatska multikanalna 10-300 µL	Biohit, Finska (model eLine, 8 Channel)
Plastenke za gojenje celičnih kultur (75 cm ²)	TPP, Švica
Serološke pipete za enkratno uporabo	TPP, Švica
Vibracijski mešalnik	Biosan, Latvija
Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80 °C)	Sanyo, USA

3.2 METODE DELA

3.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

3.2.1.1 Priprava gojitvenega medija

Leibovitz medij v prahu smo ob rahlem mešanju raztopili v 500 mL destilirane vode sobne temperature. Dodali smo 50 mL fetalnega govejega seruma in 5 mL raztopine antibiotikov penicilina in streptomicina. Raztopino smo filtrirali s filtrom za sterilno filtracijo z velikostjo por 0,22 µm v predhodno sterilizirano kvadratno stekleničko za shranjevanje tekočin. Gojitveni medij smo hranili v hladilniku pri +4 °C.

Preglednica V: Sestava gojitvenega medija

Celična linija	Gojitveni medij
MDA-kb2 (ATCC® CRL-7627™, Nemčija)	Leibovitz L-15 medij 10 % FBS 100 U/mL penicilina/ 100 µg/mL streptomicina

3.2.1.2 Priprava RLB (pufer za lizo celic)

Prvotno 5 kratno koncentriran RLB smo razredčili z avtoklavirano destilirano vodo v razmerju 1:5. Raztopino smo pripravili v aseptičnih pogojih v LAF komori v sterilne centrifugirke. Tako pripravljen RLB smo shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.1.3 Priprava 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju

0,1 % DMSO v gojitvenem mediju smo pripravili z redčenjem 99,9 % DMSO z gojitvenim medijem, pri čemer smo 1 μL 99,9 % DMSO dodali v 1 mL gojitvenega medija. 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju smo pripravili v sterilnih centrifugirkah v LAF komori ter ga shranjevali v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.4 Priprava vzorcev testiranih spojin in kontrol

Testirane spojine in kontrole smo natehtali na analitski tehtnici v miligramih ter raztopili v 99,9 % DMSO. Potreben volumen 99,9 % DMSO (μL) smo predhodno preračunali glede na molekulsko maso spojin (g/mol) ter želeno koncentracijo (mM). Raztopljene vzorce smo shranjevali v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter jih pred uporabo razredčili z gojitvenim medijem v razmerju 1:1000, tako da smo dobili koncentracijo v μM . Pri pripravi nižjih koncentracij smo za nadaljnje redčenje uporabili 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Nobena za testiranje pripravljena raztopina tako ni vsebovala DMSO, katerega koncentracija bi bila večja od 0,1 %. Redčitve testiranih spojin so predstavljene v preglednicah VI in VII. Testirane koncentracije pozitivnih kontrol so predstavljene v preglednici VIII. Vse raztopine in vzorce, ki smo jih hranili v hladilniku in zamrzovalniku, smo pred uporabo predhodno segreli v vodni kopeli na približno $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica VI: Priprava testiranih spojin za MTS test

testirana spojina	prvotna konc. [mM]	testirane koncentracije				
		redčenje 1:1000 z gojitvenim medijem [μM]	redčenje z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju [μM]			
PAR	200	200	175	150	125	100
DIC	200	200	175	150	125	100
4'OH-DIC	50	50	25	1	0,75	0,5
PIC	200	200	175	150	125	100

Preglednica VII: Priprava testiranih spojin za Luciferazni test

testirana spojina	prvotna konc. [mM]	testirane koncentracije			
		redčenje 1:1000 z gojitvenim medijem [μM]	redčenje z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju [μM]		
PAR	175	175	17,5	1,75	$1,75 \times 10^{-4}$
DIC	175	175		1,75	$1,75 \times 10^{-5}$
4'OH-DIC	50	50	5	0,5	
PIC	175	175	0,175	$1,75 \times 10^{-2}$	$1,75 \times 10^{-3}$

Preglednica VIII: Uporabljene koncentracije pozitivnih kontrol

kontrola	testirana koncentracija (0,1 % DMSO v gojitvenem mediju)
DHT	0,5 nM
FLU	5 μ M
HC	100 nM
RU-486	100 nM

3.2.2 CELIČNA LINIJA MDA-kb2

Za testiranje potencialnega agonističnega ali antagonističnega učinka PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC na androgene in glukokortikoidne receptorje smo uporabili celično linijo MDA-kb2 (ATCC® CRL-2713™) (96). Metoda testiranja spojin s celično linijo MDA-kb2 spada med *in vitro* presajalne teste in se uvršča v drugi nivo testiranja OECD testov. Predstavlja *in vitro* testni sistem, ki se uporablja za oceno sposobnosti vpliva kemikalij na od androgenov in glukokortikoidov odvisno gensko transkripcijo. Razvita je bila iz celične linije človeških epitelijskih celic raka dojke MDA-MB-453, katere izražajo androgene in glukokortikoidne receptorje. Celice MDA-MB-453 so transformirali z vnosom plazmida, ki vsebuje na androgene in glukokortikoide odzivno MMTV promotorsko zaporedje in reporterski gen za encim luciferazo. Preiskovane spojine, ki delujejo preko androgenega ali glukokortikoidnega receptorja, aktivirajo MMTV promotorsko zaporedje in posledično sprožijo indukcijo ekspresije luciferaznega gena, kar vodi v sintezo encima luciferaze, katerega kvantitativno določamo z merjenjem luminiscence. Med prednosti uporabe celične linije MDA-kb2 spadajo možnost razlikovanja agonističnega in antagonističnega učinka tako na androgenem kot tudi na glukokortikoidnem receptorju, enostavno gojenje in vzdrževanje celične kulture, hitra izvedba testiranja (znotraj 24 ur), visoka občutljivost testiranja ter zagotavljanje ponovljivih rezultatov z minimalno variabilnostjo znotraj ponovitve testov (97).

3.2.3 DELO S CELICAMI

Eksperimentalni del diplomske naloge smo opravili v Celičnem laboratoriju Fakultete za Farmacijo, Univerze v Ljubljani. Delo s celično kulturo je potekalo pod aseptičnimi pogoji v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komora). Za doseganje sterilnih pogojev dela smo LAF komoro pred in po koncu dela razkužili s 70 % etanolom in obsevali za 20 minut z UV svetlobo. Pred vnosom laboratorijskega materiala v LAF

komoro smo laboratorijski material in rokavice razkužili s 70 % etanolom.

3.2.3.1 Odmrzovanje celic

Celice, ki so bile zamrznjene v 1 mL krioviali na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo odtalili v vodni kopeli (T približno 37°C , 1 minuta). V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 9 mL gojitvenega medija, dodali celotno vsebino krioviale ter centrifugirali 5 minut pri 1300 obratih/minuto. Supernatant smo odstranili s pipeto, sedimentu celic dodali 5 mL gojitvenega medija, premešali na vibracijskem mešalniku ter celotno vsebino prenesli v platenko za gojenje celičnih kultur površine 75 cm^2 . V platenko za gojenje celičnih kultur smo dodali še 5 mL gojitvenega medija in jo dali v inkubator ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, brez CO_2).

3.2.3.2 Rast in gojenje celičnih kultur

Celice smo gojili v platenkah za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm^2 , v inkubatorju pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, brez CO_2 , v gojitvenem mediju. Gojitveni medij smo menjavali na 2-3 dni, pri čemer je za eno celično kulturo volumen gojitvenega medija znašal 7-8 mL. Adheriranje celic na podlago, njihovo rast in gostoto smo dnevno spremljali z invertnim mikroskopom. Ko so celice dosegle gostoto, pri kateri bi jim že lahko zmanjkovalo prostora za rast in kar bi posledično vodilo v njihovo odmiranje, smo jih presadili. Presadili smo jih, ko so dosegle približno 80 % konfluenco (80 % prerast dna gojitvene posode).

3.2.3.3 Presajanje celic

Ker spadajo naše celice med adherentne celice, so se le te med rastjo adherirale na podlago (na dno platenke za gojenje celičnih kultur). Postopek presajanja celic zato temelji na odlepljanju celic od podlage, za kar uporabimo proteolitični encim tripsin. Uporabili smo sledeč postopek: S pipeto za enkratno uporabo smo iz platenke za gojenje celičnih kultur najprej odstranili porabljeni gojitveni medij. Celice smo sprali s PBS (5 mL), PBS odstranili, dodali 5 mL 0,01 % tripsina ter platenko za gojenje celičnih kultur inkubirali 5 minut (temperatura $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2). Po inkubaciji smo pod invertnim mikroskopom pogledali ali so se celice uspešno odlepile od podlage. Celoten volumen celične suspenzije smo s pipeto prenesli v 15 mL centrifugirko, dodali 5 mL gojitvenega medija ter premešali na vibracijskem mešalniku. Najprej smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 80 μL vzorec suspenzije celic, ki smo ga kasneje uporabili pri metodi štetja celic. Preostalo suspenzijo celic smo centrifugirali 5 minut pri 1300 obratih/minuto ter po končanem centrifugiranju s

pipeto odstranili supernatant. Celični usedlini smo dodali 5 mL gojitvenega medija in premešali na vibracijskem mešalniku. Dobljeno suspenzijo celic smo prenesli v novo plastenko za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm² ali del volumna suspenzije celic uporabili za nanos celic na mikrotitrne plošče, preostanek pa prenesli v plastenko za gojenje celičnih kultur.

S spiranjem celic s PBS smo odstranili sledove gojitvenega medija in tako preprečili inaktivacijo tripsina, ki poteče ob prisotnosti seruma. Postopek presajanja celic smo izvedli hitro, saj predolga izpostavljenost tripsinu lahko vodi v celično poškodbo (98).

3.2.3.4 Štetje celic

Za štetje celic smo uporabili tradicionalno metodo štetja s hemocitometrom in metodo izključitvenega barvanja z barvilom tripan modro. Hemocitometer je debelo objektno steklece z razvejano komoro natančnih dimenzij, kar omogoča, da se definiran volumen suspenzije celic odlaga v komoro, kjer celice lahko preštejemo (99). Tripan modro je vitalno barvilo, ki se uporablja za oceno celične viabilnosti. Žive celice imajo nepoškodovano celično membrano in se ne obarvajo z barvilom, ki jih obdaja. Nasprotno mrtve celice nimajo nepoškodovane, funkcionalne membrane, zato posledično privzamejo barvilo iz okolice ter se obarvajo modro (100).

Štetje celic smo izvajali pri postopku presajanja celic in pred nanosom celic na mikrotitrsko ploščo. S konstantnim številom celic vzdržujemo optimum za rast celic in pripomoremo k standardizaciji postopka uporabe celične kulture (98). Za štetje celic smo uporabili 80 µL vzorec suspenzije celic, ki smo ga pridobili po predhodno izvedenem postopku odlepljanja celic od podlage, opisanem v podpoglavju 2.2.3 Presajanje celic.

V mikrocentrifugirko smo 80 µL vzorcu suspenzije celic dodali 80 µL barvila tripan modro ter vsebino rahlo premešali s pomočjo pipete. Suspenzijo smo nanесли pod krovno steklece na hemocitometer in pod svetlobnim mikroskopom prešteli število živih, neobarvanih celic.

Celično gostoto oziroma število živih celic/mL smo določili z uporabo spodnjih izračunov:

$$N = \frac{A+B+C+D}{4} \times 10^4 \times \text{faktor redčenja} \times V$$

N - celokupno število živih celic v celotnem volumnu suspenzije

$(A+B+C+D)/4$ – povprečno število živih celic na 1 kvadrat; A, B, C, D = število prešteti živih celic v posameznem kvadratu; 4 – število velikih kvadratov hemocitometra, v katerih smo celice šteli

10^4 - korekcijski faktor; volumen kvadrata hemocitometra, v katerem štejemo celice, znaša 10^{-4} mL. Da dobimo število živih celic/mL vrednost pomnožimo z 10^4 .

faktor redčenja - vzorec suspenzije celic smo redčili z barvilom tripan modro v razmerju 1:1; faktor redčenja je enak 2

V = celotni volumen suspenzije [mL]

3.2.3.5 Nanos celic na mikrotitrsko ploščo

Iz gojene celične kulture smo pripravili suspenzijo celic po postopku, opisanem v poglavju 2.2.3 Presajanje celic. Pred vsakim nanosom celic na mikrotitrsko ploščo, smo celice prešteli s hemocitometrom ter po spodnjih enačbah izračunali, koliko volumna suspenzije celic in volumna gojitvenega medija potrebujemo, da dobimo suspenzijo celic z ustrezno gostoto celic za nasajanje.

$$\text{Volumen suspenzije celic} = \frac{\text{priporočena celična gostota} \times \text{celotni volumen}}{\text{izračunana celična gostota}}$$

$$\text{Volumen gojitvenega medija} = \text{celotni volumen} - \text{volumen suspenzije celic}$$

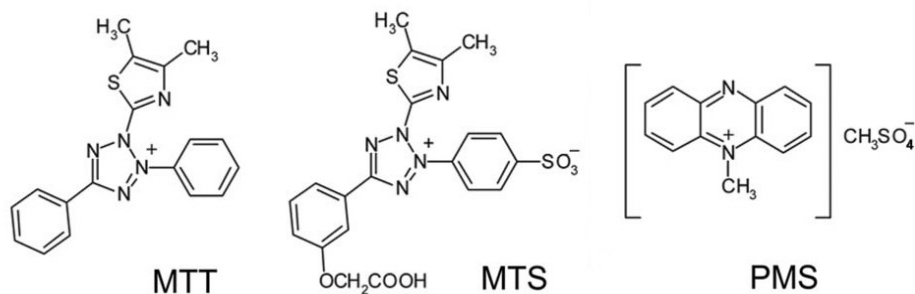
Za testiranje spojin smo v vsako vdolbinico mikrotitrške plošče nanесли 100 μ L suspenzije celic s celično gostoto 1×10^5 celic/mL, kar ustreza priporočeni gostoti celic za nasajanje, ki znaša 1×10^4 celic/vdolbinico. Celice smo nasajali z avtomatsko multikanalno pipeto na mikrotitrške plošče s 96 vdolbinicami. Celoten volumen, ki smo ga potrebovali za nanos, je tako znašal 9600 μ L (100 μ l x število vdolbinic na mikrotitrski plošči) + 3 mL prebitka (izgube pri pipetiranju in nanosu celic na mikrotitrsko ploščo). Po nasaditvi celic na mikrotitrsko ploščo smo ploščo inkubirali 24 ur (37 °C, brez CO₂).

3.3 TESTIRANJE SPOJIN

3.3.1 TEST CITOTOKSIČNOSTI

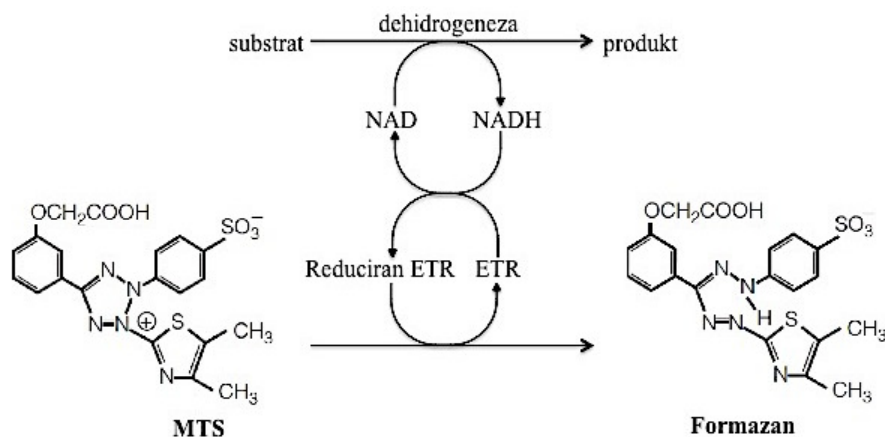
S testom citotoksičnosti določimo ali je testirana spojina toksična za celice v kulturi. Običajna metoda testiranja citotoksičnosti je določanje števila preostalih viabilnih celic po definirani inkubacijski dobi celic s testirano spojino (101). Značilen način določanja celične viabilnosti je merjenje biokemijskega dogodka, ki se pojavlja v živih celicah in se ustavi po celični smrti (102). V uporabi je širok spekter različnih direktnih in indirektnih metod. Primer direktne metode je izključitveno barvanje, s katerim določimo integriteto membrane, medtem ko z indirektnimi metodami določimo metabolično sposobnost živih celic. Primeri indirektnih metod so merjenje sposobnosti celice, da reducira spojine, kot so XTT, MTS, SRB, AlamarBlue ali merjenje sposobnosti celice, da proizvede ATP (103).

Za testiranje citotoksičnosti smo uporabili indirektno metodo s tetrazolijevo soljo MTS, tako imenovani MTS test. Prva metoda s tetrazolijevo soljo, primerna za uporabo testiranja večjega števila vzorcev na mikrotitrski plošči, je bila metoda z MTT (104). MTT tvori oborjen produkt, ki ga moramo pred merjenjem s spektrofotometrom raztopiti. Kasneje razvite tetrazolijeve soli (MTS, XTT, WTS; slika 1) tvorijo topen produkt, ki ga lahko merimo direktno, brez predhodnih korakov raztapljanja (101). Večjo topnost so dosegli z dodatkom negativno nabitih sulfonatnih skupin, ki pa posledično zmanjšajo vstop spojin v celico. Reagenti za izvedbo MTS testa zato poleg tetrazolijeve soli MTS vsebujejo še spojino, ki služi kot vmesni akceptor elektronov. Primer vmesnega akceptorja elektronov je fenazin metosulfat (PMS). PMS sprejema elektrone, jih nadalje prenese na tetrazolijevo sol ter jo reducira (105).



Slika 1: Kemijske strukture tetrazolijevih soli MTT in MTS ter vmesnega akceptorja elektronov PMS.

Po redukciji tetrazolijeve soli pride do prekinitve vezi v tetrazolskem obroču, zaradi česar se predhodno brezbarvne ali šibko obarvane tetrazolijeve soli pretvorijo v obarvan produkt formazan (slika 2). Redukcija poteče v metabolno aktivnih celicah preko NAD(P)H odvisnih oksidoreduktaz in dehidrogenaz (105). Količino nastalega obarvanega formazana merimo spektrofotometrično, pri čemer je izmerjena količina formazana direktno proporcionalna številu živih celic v kulturi (106).



Slika 2: Pretvorba tetrazolijeve soli MTS v obarvan produkt formazan. ETR je angleška kratica za reagent za prenos elektronov (electron transfer reagent), v našem primeru PMS.

3.3.1.1 Postopek izvedbe MTS testa

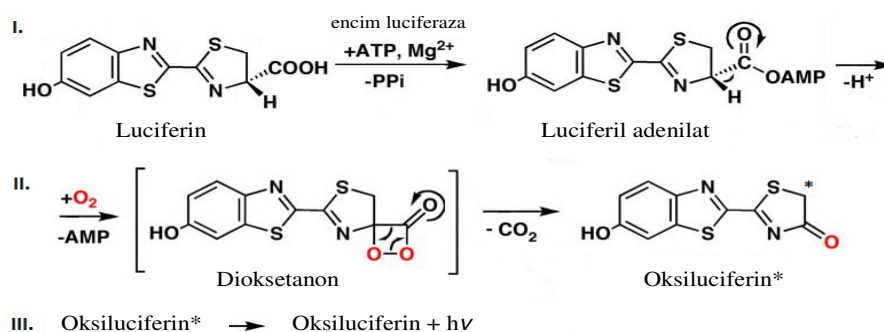
Celice MDA-kb2 smo nasadili na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami s prozornim dnom, ki omogoča merjenje transmisije. V vsako vdolbinico smo dali 100 μL celične suspenzije z gostoto 1×10^5 celic/mL, kar ustreza gostoti 1×10^4 celic/vdolbinico. Nasajeno ploščo smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, brez CO₂. Po 24 urni inkubaciji smo iz vdolbinic odpipetirali gojitveni medij ter celicam dodali 100 μL pripravljenih raztopin testiranih spojin. Celice smo izpostavili naslednjim spojinam: paracetamolu, piacetanolu in diklofenaku v koncentracijah 200, 175, 150, 125, 100 μM ter 4'-hidroksidiklofenaku v koncentracijah 50, 25, 1, 0,75, 0,50 μM . Vse testirane spojine so bile raztopljene v 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Za kontrolo medija smo celicam dodali 100 μL gojitvenega medija, za kontrolo topila pa 100 μL 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Po nanosu vseh testiranih spojin in kontrol smo celice dali v inkubator za 24 h pri 37 °C, brez CO₂. Po končani inkubaciji smo v vse vdolbinice mikrotitrskih plošč dodali 10 μL reagenta MTS ter celice inkubirali 3 ure pri 37 °C, brez CO₂. S čitalcem mikrotitrskih plošč smo izmerili absorbanco pri 492 nm. Od dobljenih rezultatov smo odšteli absorbanco ozadja (0,1 %

DMSO v gojitvenem mediju brez celic) ter rezultat podali v odstotkih preživetja celic glede na kontrolo (celice, izpostavljene le 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju).

3.3.2 LUCIFERAZNI TEST

Za testiranje morebitnih agonističnih ali antagonističnih androgenih in glukokortikoidnih učinkov paracetamola, diklofenaka, 4'-hidroksidiklofenaka in piceatanola smo uporabili luciferazni test z reporterskim genom, ki beleži transkripcijo specifičnih genov v celicah preko detekcije svetlobe, ki jo proizvede encim luciferaza. Luciferaza je splošno ime za družino encimov, ki katalizirajo oksidacijo substratov in pri tem tvorijo fotone vidne svetlobe z emisijskim spektrom med 400 in 620 nm. Danes se kot reporterski geni v sesalčjih celicah najpogosteje uporabljajo klonirani geni luciferaze iz kresničke (*Photinus pyralis*) (107).

V prvem delu reakcije encim luciferaza ob prisotnosti Mg^{2+} in ATP katalizira nastanek luciferil adenilatne vezi, pri čemer se sprosti pirofosfat. V drugem delu poteče oksigenacija z O_2 , kar preko intermediata dioksetanona vodi do nastanka vzbujenega stanja oksiluciferina. Emisija svetlobe, ki jo merimo, nastane ob relaksaciji vzbujenega stanja oksiluciferina do pripadajočega osnovnega stanja (slika 3) (108).



Slika 3: Mehanizem reakcije kresničkine luciferaze (Prirejeno po 108).

3.3.2.1 Postopek izvedbe luciferaznega testa

Celice MDA-kb2 smo nasadili na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami z belim dnom. Celice smo nasadili z gostoto 1×10^4 celic/vdolbinico. Nasajeno ploščo smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, brez CO_2 . Po inkubaciji smo iz vdolbinic mikrotitrške plošče odstranili gojitveni medij ter celice izpostavili pripravljenim vzorcem testiranih spojin in kontrol. Celice smo izpostavili naslednjim koncentracijam testiranih spojin: Paracetamol 175; 17,5; 1,75;

1,75x10⁻⁴ μM, diklofenak 175; 1,75; 1,75x10⁻⁵ μM, 4'-hidroksidiklofenak 50; 5; 0,5 μM in piceatanol 175; 0,175; 1,75x10⁻²; 1,75x10⁻³ μM. Za kontrole smo uporabili 0,5 nM DHT (agonist na AR), 100 nM HC (agonist na GR), 5 μM FLUT (antagonist na AR), 100 nM RU-486 (antagonist na GR), 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (kontrola topila) in medij (kontrola medija). Vsi vzorci spojin in kontrol so bili raztopljeni v 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju.

Celice MDA-kb2 izražajo tako androgene kot tudi glukokortikoidne receptorje. Glede na tip testiranja (ugotavljanje agonističnih ali antagonističnih učinkov) in tip receptorja (androgeni ali glukokortikoidni receptor) smo celice izpostavili testiranim spojinam po naslednjem zaporedju:

I. Agonistični test na androgenih receptorjih

V vsako vdolbinico mikrotitrne plošče smo dodali 50 μL 100 nM raztopine RU-486 ter inkubirali 30 minut pri 37° C, brez CO₂. RU-486 kot antagonist na glukokortikoidnem receptorju zasede glukokortikoidne receptorje ter omogoči, da testirane spojine izrazijo svoj učinek le preko androgenih receptorjev. Po končani inkubaciji smo dodali 50 μL raztopine testirane spojine, v vdolbinice namenjene kontroli pa 50 μL raztopine kontrole (0,5 nM DHT; 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju; gojitveni medij).

II. Antagonistični test na androgenih receptorjih

Celicam smo dodali 50 μL raztopine testirane spojine ali raztopine kontrole (5 μM FLUT; 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju; gojitveni medij) ter jih inkubirali 30 minut pri 37 °C, brez CO₂. Zatem smo dodali po 50 μl 0,5 nM raztopine DHT. DHT kot agonist na androgenem receptorju stimulira ekspresijo encima luciferaze. V kolikor predhodno izpostavljena testirana spojina na androgene receptorje deluje antagonistično, bo ekspresija encima luciferaze po dodatku DHT zmanjšana.

III. Agonistični test na glukokortikoidnih receptorjih

Celicam smo dodali 50 μL 5 μM raztopine FLUT ter jih inkubirali 30 minut pri 37 °C, brez CO₂. FLUT kot antagonist na androgenih receptorjih predhodno zasede androgene receptorje. Testirane spojine tako svoj učinek izrazijo le preko glukokortikoidnih receptorjev. Po inkubaciji z raztopino FLUT smo celicam dodali 50 μL raztopine testirane spojine ali raztopine kontrole (100 nM HC; 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju; gojitveni medij).

IV. Antagonistični test na glukokortikoidnih receptorjih

Celice smo dodali 50 μ L raztopine testirane raztopine ali raztopine kontrole (100 nM RU-486; 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju; gojitveni medij) ter jih inkubirali 30 minut pri 37 °C, brez CO₂. Po končani inkubaciji smo dodali 50 μ L 500 nM raztopine HC. HC deluje kot agonist na glukokortikoidnem receptorju in stimulira ekspresijo encima luciferaze. Če predhodno izpostavljena testirana spojina na glukokortikoidne receptorje deluje antagonistično, bo ekspresija encima luciferaze po dodatku HC zmanjšana.

Po nanosu vseh raztopin testiranih spojin in kontrol smo celice dali v inkubator za 24 ur pri 37 °C, brez CO₂. Po 24 urni inkubaciji smo iz vdolbinic mikrotitrne plošče odpipetirali raztopine testiranih spojin in kontrol ter zaostanke sprali z dodatkom 100 μ L PBS. PBS smo odpipetirali in dodali 20 μ L RLB/vdolbinico. Za doseg popolne lize celic smo celice izpostavili ciklu menjave zamrzovanja in odtaljevanja. Eni uri zamrznitve celic v zamrzovalniku na -80° C je sledila ena ura odtaljevanja celic na sobni temperaturi. Cikel zamrzovanja in odtaljevanja smo ponovili dvakrat ter zatem v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče dodali po 35 μ L luciferaznega reagenta. Aktivnost encima luciferaze smo določili z merjenjem luminiscence s čitalcem mikrotitrskih plošč (občutljivost 135, integracijski čas 1 sekunda).

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Podatke smo statistično analizirali s Student t-testom v programu Excel, pri čemer smo kot signifikantne vrednosti upoštevali rezultate, kjer je bila verjetnost, da sta vzorec in kontrola enaka, manjša od 5 % (*p < 0,05), 1% (**p < 0,01) ali 0,1 % (**p < 0,001). Rezultati, predstavljeni v tej študiji, so podani kot povprečje \pm SD rezultatov iz treh ločenih, neodvisnih ponovitev testov. V posameznem testu smo preiskovano spojino in kontrole (0,5 nM DHT (agonist na AR), 100 nM HC (agonist na GR), 5 μ M FLUT (antagonist na AR), 100 nM RU-486 (antagonist na GR), 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (kontrola topila) in medij (kontrola medija)) testirali vsaj v duplikatu. Vsi rezultati so predstavljeni glede na odziv celic, izpostavljenih 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju, kar predstavlja 100 %. V luciferaznem testu so rezultati podani v odstotkih kot izzvana luciferazna aktivnost (testirana spojina)/luciferazna aktivnost (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju) * 100. Če testirana spojina ne izkazuje nobene aktivnosti, je dobljena luciferazna aktivnost enaka 100 %. V kolikor ima testirana spojina AR ali GR agonistično aktivnost,

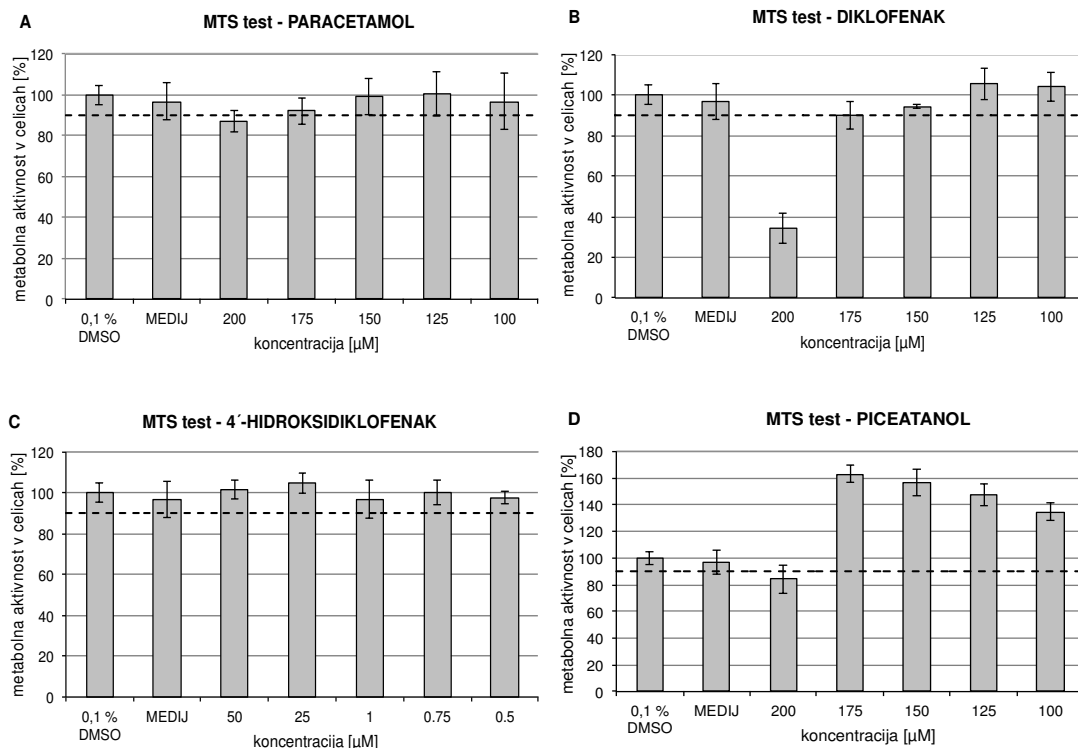
se luciferazna aktivnost poveča (je večja od 100 %). Če nasprotno testirana spojina izkazuje na AR ali GR antagonistično aktivnost, se luciferazna aktivnost zmanjša (je manjša od 100 %). V testu citotoksičnosti smo kot citotoksične koncentracije upoštevali vrednosti, ki so zmanjšale celično viabilnost pod mejo 90 %.

4 REZULTATI

4.1 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Pred samim testiranjem preiskovanih spojin na androgeni in glukokortikoidni učinek na humani celični liniji MDA-kb2, smo s testom citotoksičnosti preverili, katere koncentracije spojin so primerne za nadaljnje testiranje in ne povzročajo citotoksičnega učinka na celice. Celice smo za 24 ur izpostavili testiranim spojinam ter ugotavljali vpliv testiranih spojin na preživelost celic v primerjavi s kontrolo. Kontrolo so predstavljale celice, ki so bile izpostavljene topilu - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Kot necitotoksične koncentracije smo upoštevali koncentracije testiranih spojin, ki preživetja celic niso zmanjšale za več kot 90 %. Kontrola gojitvenega medija je služila kot negativna kontrola. S primerljivostjo rezultatov odziva celic, izpostavljenim 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju ter celic, izpostavljenim gojitvenem mediju, smo potrdili necitotoksičnost 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju ter izključili njegov vpliv na rezultate.

Za določitev prve necitotoksične koncentracije smo paracetamol, diklofenak in piceatanol testirali pri koncentracijah 200, 175, 150, 125 in 100 μM . Zaradi slabe topnosti in posledičnega obarjanja 4'-hidroksidiklofenaka v topilu smo 4'-hidroksidiklofenak testirali pri nižjih koncentracijah 50, 25, 1, 0,75 in 0,5 μM . Velikostne razrede koncentracij, ki smo jih uvrstili v testiranje prve necitotoksične koncentracije, smo izbrali na podlagi upoštevanja velikostnega razreda terapevtskih plazemskih koncentracij testiranih spojin. Rezultate meritev smo grafično predstavili kot odstotek preživelih celic glede na 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (graf 1). Na podlagi rezultatov določitve prve necitotoksične koncentracije testiranih spojin na celični liniji MDA-kb2 smo nadalje določili še ostale velikostne razrede koncentracij preiskovanih spojin, ki smo jih uvrstili v testiranje z luciferaznim testom. Ob tem smo upoštevali, da smo z izbiro velikostnega razreda testiranih koncentracij pokrili tako območje običajnih plazemskih terapevtskih koncentracij testiranih spojin kot tudi območje koncentracij, v katerih so testirane spojine lahko prisotne v okolju.



Graf 1: MTS test - Preživelost celic glede na 0,1% DMSO v gojitvenem mediju (%).

Celice MDA-kb2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam testiranih spojin A) Paracetamol (200, 175, 150, 125 in 100 µM), B) Diklofenak (200, 175, 150, 125 in 100 µM), C) 4'-hidroksidiklofenak (50, 25, 1, 0,75 in 0,25 µM) in D) Piceatanol (200, 175, 150, 125 in 100 µM). Rezultate smo podali kot odstotek živih celic glede na 0,1% DMSO v gojitvenem mediju ± SD. S črtkano črto je označena še sprejemljiva spodnja meja metabolne aktivnosti celic, to je 90%. (0,1 % DMSO - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju; MEDIJ - gojitveni medij).

Iz grafa 1A vidimo, da je paracetamol na celični liniji MDA-kb2 deloval kot citotoksičen le v najvišji testirani koncentraciji 200 µM, kjer je celična viabilnost padla pod 90 %. Ostale nižje testirane koncentracije so izkazovale celično viabilnost višjo ali enako 90 % in jih tako lahko smatramo kot necitotoksične. V nadaljnje testiranje paracetamola z luciferaznim testom smo uvrstili prvo necitotoksično koncentracijo 175 µM ter koncentracije 17,5; 1,75 in $1,75 \times 10^{-4}$ µM.

Podoben trend citotoksičnosti, ki smo jo na celični liniji MDA-kb2 zaznali pri paracetamolu, sta izkazovala tudi diklofenak in piceatanol. Na grafu 1B in 1D vidimo, da sta diklofenak in piceatanol v najvišji testirani koncentraciji 200 µM, prav tako delovala citotoksično. Ostale nižje testirane koncentracije diklofenaka in piceatanola so se izkazale za necitotoksične, saj je bila celična viabilnost pri vseh nižjih testiranih koncentracijah

višja od 90 %. V nadaljnje testiranje z luciferaznim testom, smo tako v primeru diklofenaka uvrstili koncentracije 175; 1,75 in $1,75 \times 10^{-5}$ μM , v primeru piceatanola pa koncentracije 175; 0,175; $1,75 \times 10^{-2}$ in $1,75 \times 10^{-3}$ μM .

Rezultate testiranja citotoksičnosti 4'-hidroksidiklofenaka smo predstavili na grafu 1C. Rezultati kažejo, da nobena izmed testiranih koncentracij 4'-hidroksidiklofenaka (50, 25, 1, 0,75 in 0,25 μM) ni zmanjšala preživelost celic pod mejo 90 %. 4'-hidroksidiklofenak tako v testiranih koncentracijah, ki so enake ali manjše od 50 μM , na celično linijo MDA-kb2 ne deluje citotoksično. V nadaljnje testiranje 4'-hidroksidiklofenaka z luciferaznim testom smo uvrstili koncentracije 50, 5 in 0,5 μM .

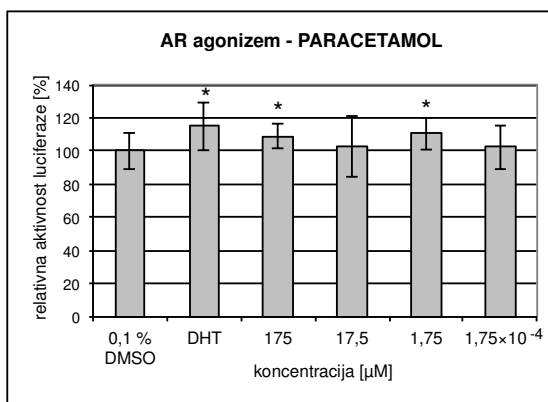
4.2 DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA ANDROGENEM RECEPTORJU

4.2.1 DOLOČANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA NA AR

Za testiranje potencialne androgene aktivnosti paracetamola, diklofenaka, 4'-hidroksidiklofenaka ter piceatanola smo uporabili humano celično linijo MDA-kb2. Ta izraža tako endogene androgene kot tudi glukokortikoidne receptorje in ima izražen na androgene in glukokortikoide odziven luciferazni reporterski gen. Ob izpostavitvi preiskovanih spojin celicam MDA-kb2 se tako v primeru agonističnega delovanja testiranih spojin, povečanje luciferazne aktivnosti izrazi tako ob prisotnosti androgenih agonistov kot tudi v prisotnosti glukokortikoidnih agonistov. Za selektivno določitev učinkovanja testiranih substanc le na androgenem receptorju, smo zato glukokortikoidne receptorje najprej predhodno zasedli z antagonistom glukokortikoidega receptorja – 100 nM RU-486. Rezultate agonističnega delovanja testiranih spojin na androgenem receptorju smo predstavili grafično (graf 2, 3, 4 in 5). Rezultati so podani kot izzvana luciferazna aktivnost testirane spojine v primerjavi z izzvano luciferazno aktivnostjo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju v odstotkih (%): $\text{intenziteta signala (testirana spojina) / intenziteta signala (0,1 \% DMSO v gojitvenem mediju) * 100}$. Če testirana spojina ne izkazuje nobene aktivnosti, je dobljena luciferazna aktivnost enaka aktivnosti 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju, torej je enaka 100 %. V kolikor testirana spojina deluje na androgenih receptorjih agonistično, se luciferazna aktivnost poveča in je večja od 100 %. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 0,5 nM DHT, ki je kot znan agonist na androgenih receptorjih služil preverjanju odzivnosti testa.

Paracetamol

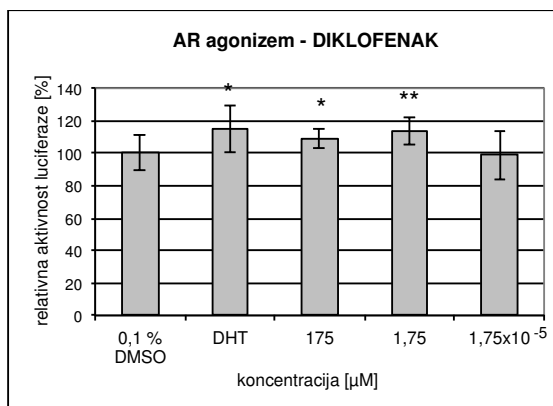
Paracetamol je statistično značilno povečal aktivnost luciferaze v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju pri koncentracijah 175 μM (8,9 % povečanje) in 1,75 μM (10,5 % povečanje). Pri vmesni koncentraciji 17,5 μM in najnižji testirani koncentraciji $1,75 \times 10^{-4}$ μM paracetamol ni izkazoval signifikantnega vpliva na androgeni receptor.



Graf 2: Rezultati določanja agonističnega učinka paracetamola na androgenem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Diklofenak

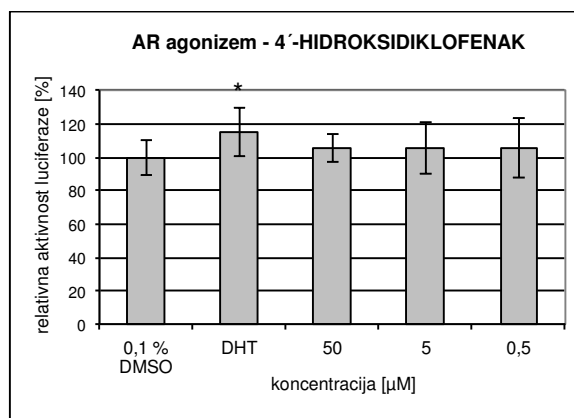
Diklofenak je statistično značilno povečal aktivnost luciferaze v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju pri koncentracijah 175 μM (8,9 % povečanje) in 1,75 μM (13,5 % povečanje). Pri najnižji testirani koncentraciji $1,75 \times 10^{-5}$ μM diklofenak ni izkazoval signifikantnega vpliva na androgeni receptor.



Graf 3: Rezultati določanja agonističnega učinka diklofenaka na androgenem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4'-hidroksidiklofenak

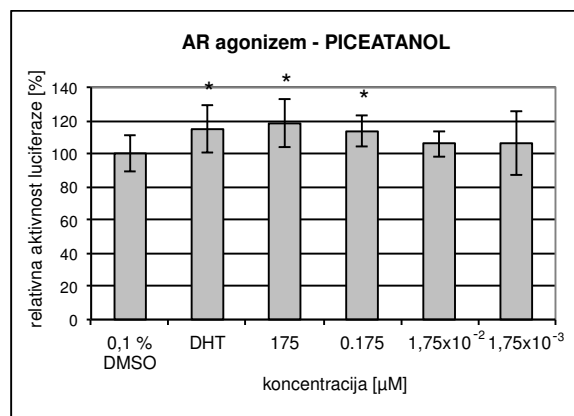
Metabolit diklofenaka 4'-hidroksidiklofenak pri nobeni izmed testiranih koncentracij ni izkazoval agonističnega delovanja na androgenem receptorju.



Graf 4: Rezultati določanja agonističnega učinka 4'-hidroksidiklofenaka na androgenem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Piceatanol

Piceatanol je statistično značilno povečal aktivnost luciferaze v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju pri koncentracijah 175 μ M (18,0 % povečanje) in 0,175 μ M (13,4 % povečanje). Pri nižjih testiranih koncentracijah $1,75 \times 10^{-2}$ μ M in $1,75 \times 10^{-3}$ μ M piceatanol ni izkazoval signifikantnega vpliva na androgeni receptor.



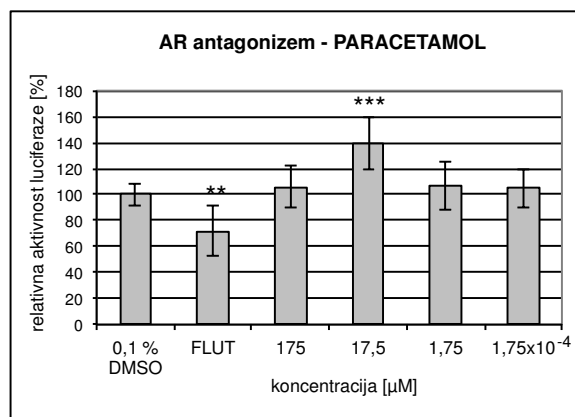
Graf 5: Rezultati določanja agonističnega učinka piceatanola na androgenem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.2.2 DOLOČANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA NA AR

Antagonistično delovanje testiranih spojin na androgenem receptorju smo ocenjevali glede na sposobnost spojine, da zmanjša jakost učinka 0,5 nM DHT na androgenem receptorju. DHT deluje kot agonist na glukokortikoidnem receptorju in stimulira ekspresijo encima luciferaze. Če predhodno izpostavljena testirana spojina na androgene receptorje deluje antagonistično, bo ekspresija encima luciferaze ob dodatku DHT zmanjšana. Rezultate antagonističnega delovanja testiranih spojin na androgenem receptorju smo predstavili v grafih 6, 7, 8 in 9. Rezultati so podani kot izzvana luciferazna aktivnost testirane spojine v primerjavi z izzvano luciferazno aktivnostjo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju v odstotkih (%). Statistično značilno zmanjšana luciferazna aktivnost v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju pomeni, da testirana spojina na androgenem receptorju celične linije MDA-kb2 deluje antagonistično. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 5 μ M FLUT, ki je kot znan antagonist na androgenih receptorjih služil preverjanju odzivnosti testa.

Paracetamol

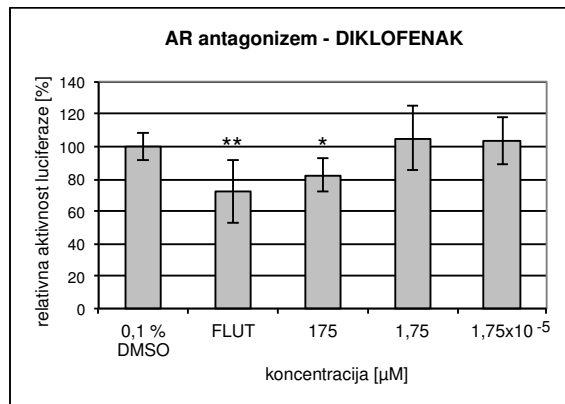
Paracetamol pri nobeni izmed testiranih koncentracij ni izkazoval antagonističnega učinka na androgenem receptorju. Pri koncentraciji 17,5 μ M je paracetamol nasprotno celo signifikantno povečal aktivnost luciferaze glede na 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju.



Graf 6: Rezultati določanja antagonističnega učinka paracetamola na androgenem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Diklofenak

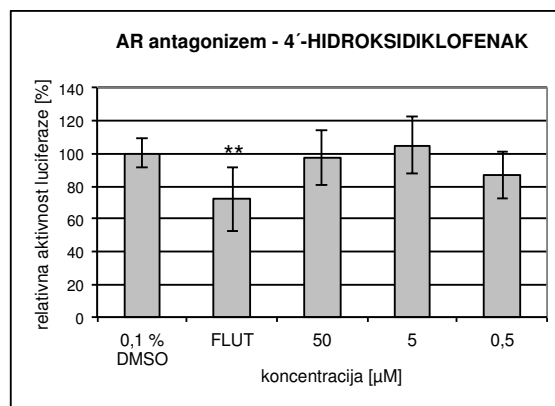
Diklofenak je izkazoval antagonistični učinek na androgenem receptorju le pri najvišji testirani koncentraciji 175 μM . Aktivnost luciferaze je v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju statistično značilno zmanjšal za 13,9 %.



Graf 7: Rezultati določanja antagonističnega učinka diklofenaka na androgenem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4' - hidroksidiklofenak

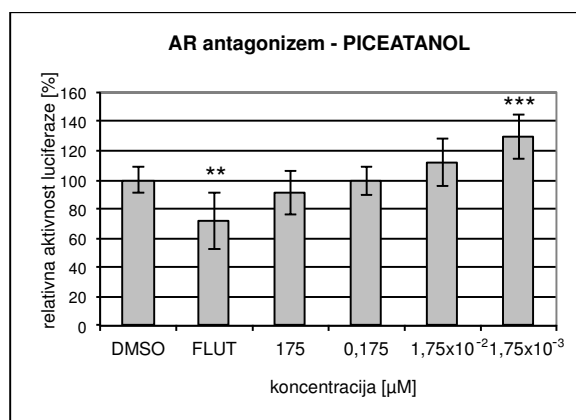
4'-hidroksidiklofenak pri nobeni izmed testiranih koncentracij (50, 5, 0,5 μM) na androgeni receptor ni deloval antagonistično. Na grafu 8 vidimo, da se delovanje diklofenaka na androgenem receptorju pri nobeni izmed testiranih koncentracij ni statistično značilno razlikovalo od 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju.



Graf 8: Rezultati določanja antagonističnega učinka 4'-hidroksidiklofenaka na androgenem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Piceatanol

Piceatanol pri nobeni izmed testiranih koncentracijah ni izkazoval antagonističnega učinka na androgenem receptorju, saj pri nobeni izmed testiranih koncentracij ni statistično značilno zmanjšal aktivnost luciferaze glede na 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju. Pri koncentraciji $1,75 \times 10^{-3}$ μM je nasprotno celo statistično značilno povečal aktivnost luciferaze glede na 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju.



Graf 9: Rezultati določanja antagonističnega učinka piceatanola na androgenem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

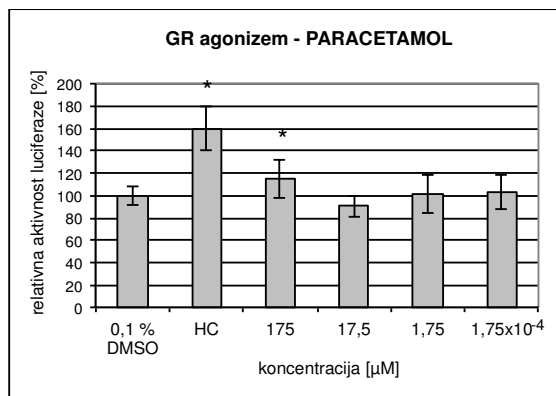
4.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA GLUKOKORTIKOIDNEM RECEPTORJU

4.3.1 DOLOČANJE AGONISTIČNEGA UČINKA NA GR

Za določitev aktivnosti testiranih spojin na glukokortikoidnem receptorju, smo androgene receptorje predhodno zasedli z dodatkom antagonista na androgenih receptorjih $5 \mu\text{M}$ FLUT. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 100 nM HC, ki je kot znan agonist na glukokortikoidnem receptorju služil preverjanju odzivnosti testa. Rezultati agonističnega delovanja testiranih spojin na glukokortikoidnem receptorju so predstavljeni v grafih 10, 11, 12 in 13. Rezultati so podani kot izzvana luciferazna aktivnost testirane spojine v primerjavi z izzvano luciferazno aktivnostjo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju v %. Statistično značilno povečana luciferazna aktivnost v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju pomeni, da testirana spojina na glukokortikoidnem receptorju celične linije MDA-kb2 deluje agonistično.

Paracetamol

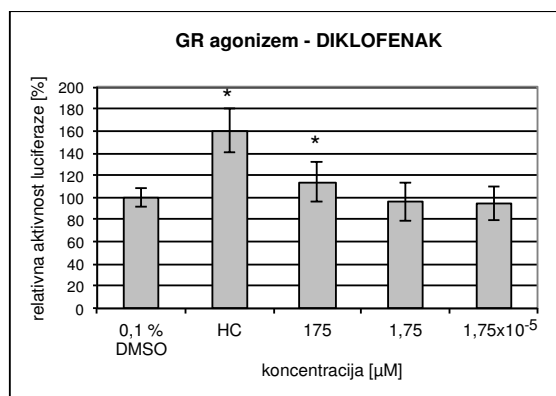
Paracetamol je v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju statistično značilno povečal luciferazno aktivnost le pri najvišji testirani koncentraciji 175 μM . Aktivnost luciferaze je povečal za 15,1 % (* $p < 0,05$). Pri nižjih testiranih koncentracijah (17,5; 1,75 in $1,75 \times 10^{-4}$ μM) paracetamol v primerjavi s kontrolo ni deloval signifikantno.



Graf 10: Rezultati določanja agonističnega učinka paracetamola na glukokortikoidnem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Diklofenak

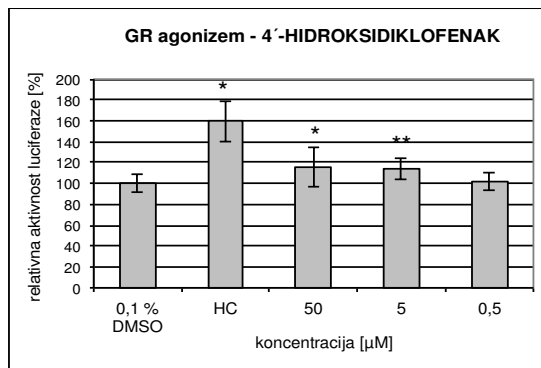
Diklofenak je v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju statistično značilno povečal luciferazno aktivnost le pri najvišji testirani koncentraciji 175 μM . Aktivnost luciferaze je povečal za 13,8 % (* $p < 0,05$). Pri nižjih koncentracijah (1,75 in $1,75 \times 10^{-5}$ μM) diklofenak ni izkazoval signifikantnega vpliva na glukokortikoidni receptor.



Graf 11: Rezultati določanja agonističnega učinka diklofenaka na glukokortikoidnem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4'-hidroksidiklofenak

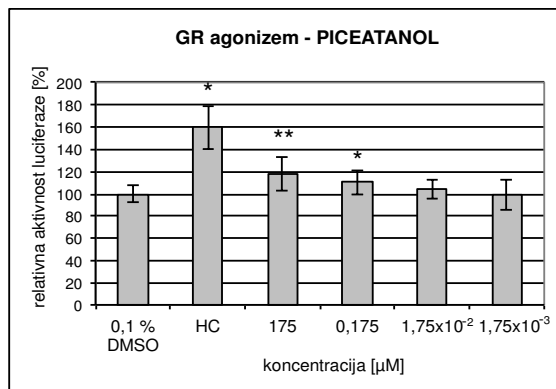
V primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju je 4'-hidroksidiklofenak statistično značilno povečal luciferazno aktivnost v testiranih koncentracijah 50 in 5 μM . Pri koncentraciji 50 μM je aktivnost luciferaze povečal za 15,0 % (* $p < 0,05$), pri koncentraciji 5 μM pa za 13,8 % (** $p < 0,01$). Pri koncentraciji 0,5 μM 4'-hidroksidiklofenak ni izkazoval signifikantnega odziva.



Graf 12: Rezultati določanja agonističnega učinka 4'-hidroksidiklofenaka na glukokortikoidnem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Piceatanol

V primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju je piceatanol statistično značilno povečal luciferazno aktivnost v testiranih koncentracijah 175 in 0,175 μM . Pri koncentraciji 175 μM je aktivnost luciferaze povečal za 18,1 % (** $p < 0,01$), pri koncentraciji 0,175 μM pa za 10,5 % (* $p < 0,05$). Pri nižjih koncentracijah $1,75 \times 10^{-2}$ in $1,75 \times 10^{-3}$ μM piceatanol ni izkazoval signifikantnega vpliva na glukokortikoidni receptor.



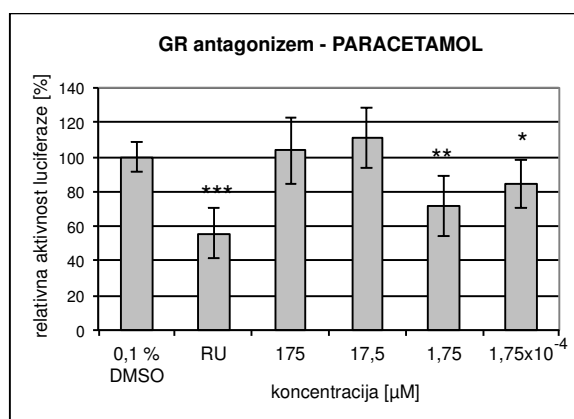
Graf 13: Rezultati določanja agonističnega učinka piceatanola na glukokortikoidnem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.2 DOLOČANJE ANTAGONISTIČNEGA UČINKA NA GR

Antagonistično delovanje testiranih spojin na glukokortikoidnem receptorju smo ocenjevali glede na sposobnost spojine, da zmanjša jakost učinka 500 nM HC na glukokortikoidnem receptorju. HC deluje kot agonist na glukokortikoidnem receptorju in stimulira ekspresijo encima luciferaze. Če predhodno izpostavljena testirana spojina na glukokortikoidni receptor deluje antagonistično, bo ekspresija encima luciferaze po dodatku HC zmanjšana. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 100 nM RU-486, ki je kot znan antagonist na glukokortikoidnem receptorju služil preverjanju odzivnosti testa. Rezultati antagonističnega delovanja testiranih spojin na glukokortikoidnem receptorju so predstavljeni v grafih 14, 15, 16 in 17. Rezultati so podani kot izzvana luciferazna aktivnost testirane spojine v primerjavi z izzvano luciferazno aktivnostjo 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju v odstotkih (%). Statistično značilno zmanjšana luciferazna aktivnost v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju pomeni, da testirana spojina na glukokortikoidnem receptorju celične linije MDA-kb2 deluje antagonistično.

Paracetamol

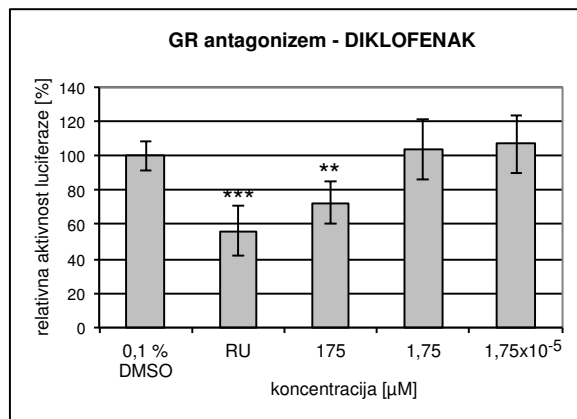
Paracetamol je statistično značilno zmanjšal aktivnost luciferaze v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju pri najnižjih testiranih koncentracijah 1,75 μ M (28,7 % zmanjšanje, ** $p < 0,01$) in $1,75 \times 10^{-4}$ μ M (15,7 % zmanjšanje, * $p < 0,05$). Pri višjih koncentracijah 17,5 μ M in 175 μ M, paracetamol ni izkazoval signifikantnega antagonističnega vpliva na glukokortikoidni receptor.



Graf 14: Rezultati določanja antagonističnega učinka paracetamola na glukokortikoidnem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Diklofenak

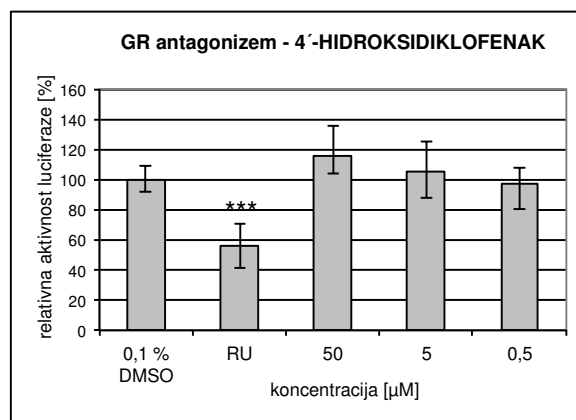
Diklofenak je statistično značilno zmanjšal aktivnost luciferaze v primerjavi z 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju le pri najvišji testirani koncentraciji 175 μM (27,2 % zmanjšanje, $**p < 0,01$).



Graf 15: Rezultati določanja antagonističnega učinka diklofenaka na glukokortikoidnem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

4'-hidroksidiklofenak

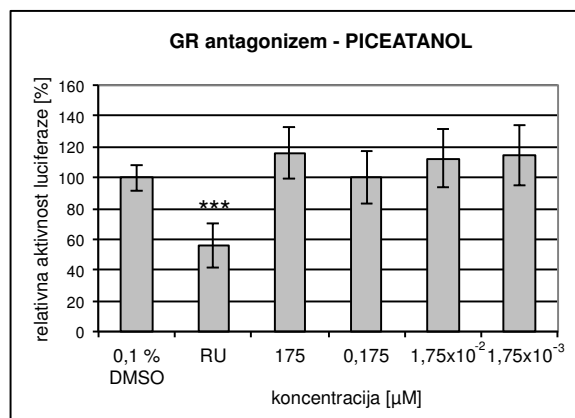
4'-hidroksidiklofenak pri nobeni izmed testiranih koncentracij (50, 5 in 0,5 μM) ni izkazoval antagonističnega učinka na glukokortikoidnem receptorju.



Graf 16: Rezultati določanja antagonističnega učinka 4'-hidroksidiklofenaka na glukokortikoidnem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

Piceatanol

Piceatanol pri nobeni izmed testiranih koncentracij (175; 0,175; $1,75 \times 10^{-2}$; $1,75 \times 10^{-3}$ μM) ni izkazoval antagonističnega učinka na glukokortikoidnem receptorju.



Graf 17: Rezultati določanja antagonističnega učinka piceatanola na glukokortikoidnem receptorju. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev luciferaznega testa \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo (celice, izpostavljene 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5 RAZPRAVA

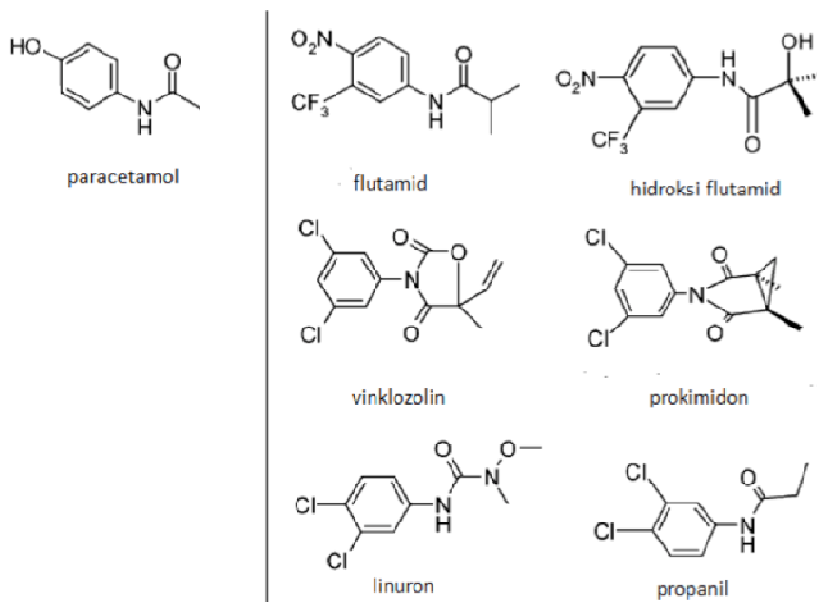
5.1 PARACETAMOL

Uporaba paracetamola je sicer splošno znana kot varna do terapevtskih odmerkov 4 g/dan (109). Zadnja dognanja navajajo, da ima paracetamol potencial endokrinega motilca, saj nedavne študije opisujejo antiandrogeni učinek paracetamola (110–114). Neodvisne epidemiološke študije navajajo obstoj signifikantnih povezav med uporabo paracetamola med nosečnostjo in povečanim tveganjem za pojav kriporhizma pri novorojenih fantkih (111,112,114). Antiandrogeni učinek paracetamola opisujejo tudi v študijah Kristensen in sod. (2012) in Albert in sod. (2013), kjer je paracetamol v primerjavi s kontrolo signifikantno znižal sekrecijo testosterona iz Leydigovih celic (110,113).

Glede na našete študije, ki opisujejo antiandrogeni potencial paracetamola, bi zato pričakovali, da bodo rezultati našega testiranja aktivnosti paracetamola na androgenem receptorju kazali podoben trend. Nasprotno rezultati našega *in vitro* testiranja učinkovanja paracetamola na androgene receptorje celične linije MDA-kb2 kažejo, da paracetamol pri nobeni izmed testiranih koncentracijah ni deloval antagonistično, temveč je pri koncentracijah 175 μM in 1,75 μM na androgene receptorje deloval agonistično. Agonistični učinek delovanja paracetamola se je pokazal tudi pri koncentraciji 17,5 μM , kjer je paracetamol v kombinaciji z DHT deloval sinergistično in povečal agonistični učinek DHT. Rezultati našega testiranja tako kažejo, da je paracetamol na androgene receptorje celične linija MDA-kb2 deloval agonistično po različnih mehanizmih - sam ali v kombinaciji z DHT. Takšen način delovanja spojine kot endokrinega motilca ni neznan. Podoben način sinergističnega delovanja opisujejo v članku Chen in sod. (2008), kjer je triklokarban sam izkazoval šibko ali nično androgeno delovanje, v kombinaciji s testosteronom pa je povečal s testosteronom inducirano transkripcijsko aktivnost androgenega receptorja in tako povečal agonistični učinek testosterona (115).

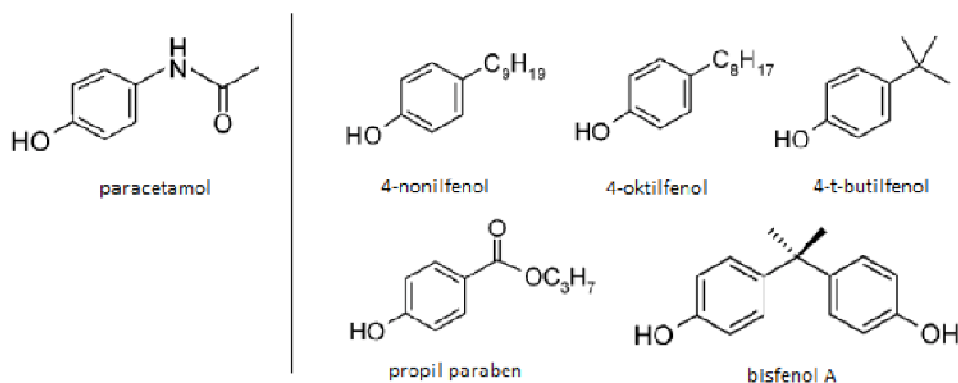
Antiandrogeni potencial paracetamola bi pričakovali tudi glede na primerjavo kemijske strukture paracetamola z ostalimi spojinami, ki se vežejo na androgene receptorje in izkazujejo aktivnost na androgenem receptorju. Glede na skupne strukturne značilnosti lahko paracetamol primerjamo s skupino flutamidu podobnih spojin (slika 4). Paracetamol enako kot flutamid vsebuje strukturni fragment Ph-N-C=O, ki je lahko pomemben za vezavo na androgeni receptor. Med spojine, ki v svojem delu kemijske strukture prav tako vsebujejo strukturni fragment Ph-N-C=O, spadajo tudi pesticidi vinklozolin, prokimidon,

linuron, propanil in metolaklor. Slednji so v študiji Fang in sod. (2003), kjer so testirali afiniteto vezave na androgeni receptor 202 naravnih, sinteznih in okoljskih kemikalij, izkazovali šibko do zmerno afiniteto za vezavo na androgeni receptor (116). Paracetamol v svoji strukturi vsebuje enak strukturni fragment kot omenjene spojine, kar nakazuje na potencial, da lahko tudi sam izkazuje afiniteto vezave na androgeni receptor, kar smo v okviru naše študije na celični liniji MDA-kb2 tudi potrdili. Rezultati naše študije, da paracetamol na androgene receptorje celične linije MDA-kb2 v testiranih koncentracijah 175 in 1,75 μM deluje agonistično, pa so v nasprotju z delovanjem flutamida in flutamidu podobnih spojin. V študiji Tamura in sod. (2006), kjer so preučevali vpliv kemikalij z aktivnostjo na androgenem receptorju na MDA-kb2 človeških celicah raka dojke, so flutamid, vinklozolin, prokimidon in linuron na androgenem receptorju delovali antagonistično. Vrednosti IC_{50} so znašale 2,1 μM in 7,2 μM za flutamid in linuron, med še močnejše antagoniste na androgenem receptorju pa sta se z vrednostmi 0,4 μM in 0,8 μM uvrstila vinklozolin in prokimidon (117). Lahko torej sklepamo, da strukturni fragment paracetamola Ph-N-C=O pripomore k afiniteti vezave na androgeni receptor, medtem ko so za to ali bo spojina na androgeni receptor delovala agonistično ali antagonistično, ključne še druge funkcionalne skupine oziroma kemične karakteristike spojine. Na sliki 4 vidimo, da ostale spojine v nasprotju s paracetamolom vsebujejo dodatne elektronegativne skupine na aromatskem obroču in pa Cl, kar lahko prispeva k njihovemu antagonističnemu delovanju.



Slika 4: Strukturna primerjava paracetamola s flutamidu podobnim spojinam. Delijo si skupni strukturni fragment (Ph-N-C=O), ki je lahko pomemben za vezavo na androgeni receptor.

Poleg strukturnega fragmenta Ph-N-C=O vsebuje paracetamol v svoji strukturi tudi fenol, ki lahko pomembno vpliva k delovanju na androgeni receptor. Fenolna skupina je namreč pogosta pri spojinah, ki delujejo kot endokrini motilci tako na estrogenih kot tudi na androgenih receptorjih (115). Med fenoli, ki se vežejo na androgeni receptor, najdemo industrijske kemikalije, katerih proizvodnja in uporaba je zelo visoka. To so bisfenol A, 4-nonilfenol, 4-oktilfenol, 4-izo- in tercpentilfenol, metilparaben, butilparaben, propilparaben in triklosan (115,117,118). Za naštete fenole je značilno, da v *in vitro* študijah na androgenih receptorjih delujejo antagonistično, pri čemer je za samo delovanje pomembna para pozicija OH skupine v obroču, ki poveča antagonistično aktivnost na androgenem receptorju (117). Paracetamol v primerjavi z naštetimi fenoli prav tako vsebuje OH skupino na para poziciji v obroču, vendar v našem testiranju na MDA-kb2 celični liniji pri nobeni izmed testiranih koncentracij ni izkazoval antagonističnega učinka na androgenem receptorju. Paracetamol se v primerjavi z ostalimi fenoli, ki delujejo antagonistično na androgenem receptorju, razlikuje v tem, da ima večina ostalih fenolov na para poziciji benzenskega obroča substituirano alkalno verigo in je tako sposobna tvoriti le eno H-vez z androgenim receptorjem (slika 5).



Slika 5: Strukturna primerjava paracetamola s fenoli, ki se vežejo na androgeni receptor

Za vezavo spojine v ligand vezavno domeno androgenega receptorja (LBD-AR) so sicer potrebne določene strukturne značilnosti spojine, ki omogočajo tvorbo interakcij med spojino in vezavno domeno androgenega receptorja. Z določitvijo kristalne strukture vezave dihidrotestosterona (DHT) na podganji androgeni receptor in metribolona na človeški androgeni receptor so ugotovili, da so za interakcijo med ligandom in LBD-AR ključne aminokisljine Arg752, Asn705 in Thr877 (119). Da spojina na androgenem receptorju deluje agonistično, mora tako vsebovati funkcionalne spojine, ki posnemajo 3-

keto in 17β -hidroksilno skupino DHT in so z LBD-AR zmožne tvoriti možno vodikovo vez in/ali elektrostatske interakcije. Ker paracetamol v naši raziskavi na androgene receptorje deluje agonistično, lahko sklepamo, da funkcionalne skupine paracetamola omogočajo pravilno umestitev paracetamola v vezavno mesto in ustrezno tvorbo vodikovih vezi oz. elektrostatskih interakcij z LBD-AR, kar vodi v aktivacijo transkripcijskega procesa. Lahko sklepamo, da so za agonistično delovanje paracetamola ključne OH skupina na para mestu benzenskega obroča, NH-C=O skupina ter aromatski obroč. Funkcionalni skupini OH in NH-C=O z vezavnim mestom androgenega receptorja tvorita ustrezne vodikove oz. elektrostatske vezi, medtem ko aromatski obroč paracetamola prispeva k hidrofobnosti, ki je potrebna za ustrezno umestitev spojine v hidrofobni žep vezavne domene AR. Za prileganje vezavnemu mestu je pomembna tudi ustrezna razdalja med obema funkcionalnima skupinama, ki naj bi bila blizu 10 \AA . Nasprotno naj bi bila v primeru antagonista na AR dolžina spojine manjša ali večja od 10 \AA , zato pri umeščanju antagonista v LBD-AR ne pride do tvorbe ustreznih vodikovih ali elektrostatskih interakcij, ki bi aktivirale transkripcijo. Antagonisti ob umeščanju v vezavno domeno AR pogosto tudi vzpostavijo kontakt z eno ali več ključnimi aminokislinami (Arg, Asn, Thr), kar blokira nastanek transkripcijsko aktivnega AR-ligand kompleksa (117).

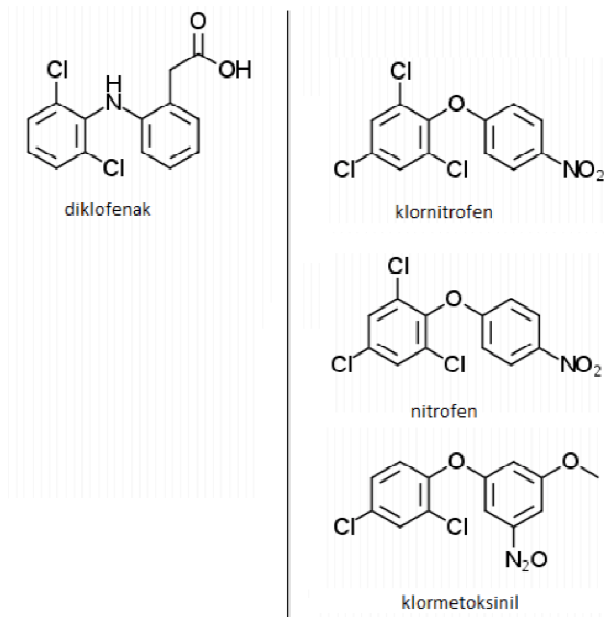
Večina raziskav o endokrinih motilcih se osredotoča na estrogene in androgene receptorje, zato je malo znanega o endokrinih motilcih, ki delujejo na glukokortikoidnem receptorju. Delovanje paracetamola na glukokortikoidni sistem je še neraziskano. Na podlagi rezultatov naše študije lahko povzamemo, da je delovanje paracetamola na glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2 koncentracijsko odvisno. V nižjih testiranih koncentracijah $1,75$ in $1,75 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ je paracetamol na glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2 deloval šibko antagonistično, medtem ko je pri najvišji testirani koncentraciji $175 \mu\text{M}$ deloval šibko agonistično. Gre za nemonotonost v odzivu v odvisnosti od koncentracije, ki je značilna za ligande v endokrinem sistemu (13).

5.2 DIKLOFENAK

Zaradi široke uporabe je diklofenak ena izmed najpogosteje identificiranih farmacevtskih spojin v vodnem okolju (120–122). V zadnjem času zato več raziskav preučuje toksični vpliv prisotnosti diklofenaka na vodne organizme (122–127). V naši raziskavi smo preučevali vpliv diklofenaka na androgene in glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2. Rezultati naše študije kažejo, da je učinkovanje diklofenaka na androgenih in

glukokortikoidnih receptorjih odvisno od odmerka. Pri dovolj visoki koncentraciji, v našem primeru pri najvišji testirani koncentraciji 175 μM , je diklofenak na androgene receptorje deloval tako agonistično kot tudi antagonistično. Takšno delovanje spojin kot mešanih agonistov in antagonistov ni nenavadno, specifičnost njihovega delovanja pa je odvisna od koncentracije spojin in prisotnosti kompetitorjev (97). Primer že opisanega delovanja mešanega agonista in antagonista na enaki celični liniji MDA-kb2 predstavlja kloronitrofen, ki je pri testiranju izkazoval močno antagonistično delovanje na AR, hkrati pa je pri višjih testiranih koncentracijah na AR deloval tudi agonistično (117). Znana primera spojin, ki delujeta antagonistično na AR, ob višji koncentraciji (10 μM) pa delujeta agonistično, sta tudi hidroksiflutamid in metabolit vinklozolina (97,128). V primeru našega testiranja je bila za delovanje diklofenaka kot mešanega agonista in antagonista na androgenem receptorju potrebna koncentracija 175 μM . Testirana koncentracija 175 μM je bila izbrana kot prva necitotoksična koncentracija in je sicer višja od terapevtskih plazemskih koncentracij diklofenaka in koncentracij diklofenaka v vodnem okolju. Diklofenak pa je v našem testiranju izkazoval učinek na androgene receptorje tudi v območju terapevtskih plazemskih koncentracij. Pri koncentraciji 1,75 μM je na androgeni receptor celične linije MDA-kb2 deloval agonistično. Pri nižjih testiranih koncentracijah, ki so prisotne v okolju, diklofenak ni izkazoval delovanja na androgeni receptor.

Rezultati našega testiranja, da ima diklofenak potencial mešanega agonista/antagonista na androgenih receptorjih, se ujemajo tudi s strukturno primerjavo diklofenaka z ostalimi spojinami, ki izkazujejo učinek na androgenem receptorju. Izmed hormonskih motilcev, ki izkazujejo učinek na androgenem receptorju, lahko diklofenak glede na strukturne značilnosti primerjamo z difeniletri. Diklofenak si z difeniletri deli skupni strukturni fragment Ph-X-Ph, kjer X predstavlja elektronegativni atom, ki je v primeru difeniletrov kisik, v primeru diklofenaka pa dušik. Med difeniletre, ki jih strukturno lahko primerjamo z diklofenakom, spadajo kloronitrofen, nitrofen in klormetoksinil. Poleg strukturnega fragmenta Ph-X-Ph v svoji strukturi enako kot diklofenak vsebujejo tudi atome klora na enem izmed fenolnih obročev (slika 6). Klornitrofen, nitrofen in klormetoksinil so na MDA-kb2 celični liniji učinkovali kot mešani AR antagonisti/agonisti, kar se ujema z rezultati našega testiranja diklofenaka.



Slika 6: Strukturna primerjava diklofenaka z difeniletri, ki se vežejo na androgeni receptor. Delijo si skupni stuktorni fragment Ph-X-Ph in atome Cl.

Poleg strukturnega fragmenta Ph-X-Ph lahko k afiniteti vezave diklofenaka na androgeni receptor prispevata tudi funkcionalni skupini klor in kisik. Med spojinami, ki se vežejo na androgeni receptor, namreč veliko spojin v svoji strukturi vsebuje klor ali oba heteroatoma klor in kisik. V študiji Fang in sod. (2003) se je na androgeni receptor vezalo 12 izmed 15 testiranih kemikalij, ki so v svoji strukturi vsebovale klor. Medtem ko se je izmed spojin, ki so v svoji strukturi vsebovale oba heteroatoma Cl in O, na androgeni receptor aktivno vezalo 20 izmed 22 preiskovanih spojin. Klor deluje kot šibek akceptor vodikove vezi in poveča hidrofobnost spojine, medtem ko je kisik pogosto povezan s tvorbo vodikove vezi z aktivnim mestom androgenega receptorja. Tvorba specifičnih vodikovih vezi in pravilno območje hidrofobnosti namreč igra pomembno vlogo pri vezavi na androgeni receptor (116).

Področje delovanja diklofenaka na glukokortikoidni sistem je še neraziskano. Na podlagi rezultatov naše študije lahko povzamemo, da diklofenak na glukokortikoidnih receptorjih celične linije MDA-kb2 izkazuje podoben trend delovanja kot na androgenih receptorjih. V najvišji testirani (prvi necitotoksični) koncentraciji 175 μM je tudi na glukokortikoidne receptorje deloval kot mešan agonist/antagonist. V območju terapevtskih plazemskih koncentracij in koncentracij, v katerih se lahko nahaja v okolju, diklofenak na glukokortikoidni receptor ni izkazoval učinka.

5.3 4'-HIDROKSIDIKLOFENAK

Diklofenak se v telesu večinoma metabolizira v hidroksilirane derivate, izmed katerih je v največji meri zastopan 4'-hidroksidiklofenak, katerega so identificirali v plazmi in v urinu človeka ter tudi v vodnem okolju (129,130). Poleg preučevanja vplivov starševske spojine, je pomembno tudi preučevanje metabolitov spojine, saj je vpliv metabolitov na organizem lahko bolj toksičen od same starševske spojine (130). Dodatna OH skupina na strukturi metabolita lahko prispeva k večji afiniteti vezave na receptor in s tem k večjemu učinku metabolita. Med znane primere hidroksimetabolitov, ki na receptorje učinkujejo močnejše kot starševske spojine, spadata metabolit flutamida - hidroksiflutamid in metabolit vinklozolina - M2 (128).

Poleg starševske spojine diklofenaka smo tako v naši raziskavi preučevali tudi vpliv njegovega metabolita 4'-hidroksidiklofenaka na glukokortikoidne in androgene receptorje celične linije MDA-kb2. Rezultati naše študije kažejo, da v nasprotju z učinkovanjem diklofenaka na androgenem receptorju, njegov metabolit 4'-hidroksidiklofenak pri nobeni izmed testiranih koncentracij ne izkazuje učinka na androgenem receptorju. 4'-hidroksidiklofenak je izkazoval učinek le pri testiranju na glukokortikoidnem receptorju, kjer je enako kot diklofenak izkazoval trend agonističnega delovanja, medtem ko v nasprotju z diklofenakom na glukokortikoidnem receptorju ni izkazoval antagonističnega učinka.

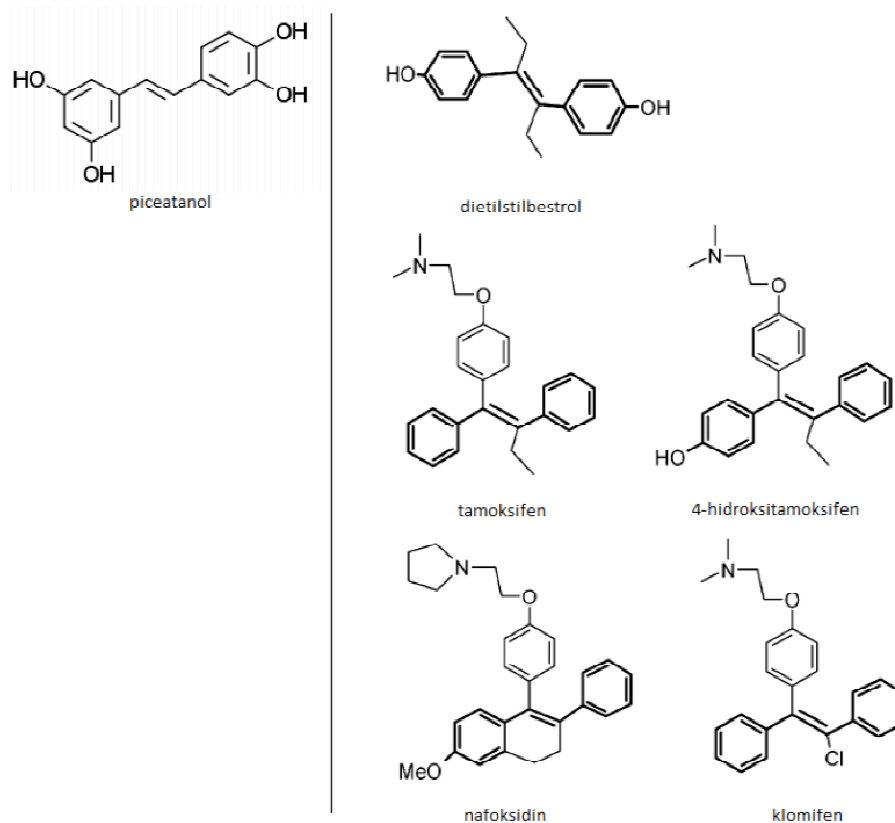
Rezultati naše študije tako kažejo, da ima metabolit 4'-hidroksidiklofenak na androgene in glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2 manjši učinek kot diklofenak. Na podlagi rezultatov naše študije lahko sklepamo, da dodatna OH skupina na 4' mestu B obroča diklofenaka ne prispeva k večji afiniteti vezave na androgeni in glukokortikoidni receptor in ne poveča učinka spojine. Ob tem moramo upoštevati dejstvo, da je bila zaradi slabe topnosti 4'-hidroksidiklofenaka, prva testirana koncentracija (50 μM) nižja od prve testirane koncentracije diklofenaka (175 μM). Za povsem korektno primerjavo rezultatov učinkovanja diklofenaka in 4'-hidroksidiklofenaka, bi bilo tako potrebno ne le testiranje v podobnih koncentracijskih velikostnih razredih kot v našem primeru, ampak testiranje v povsem enakih koncentracijah.

5.4 PICEATANOL

Delovanje piceatanola na androgene in glukokortikoidne receptorje je slabše raziskano. Več študij je znanih v povezavi s strukturnim analogom piceatanola resveratrolom. Za resveratrol je znano, da inhibira funkcijo androgenega receptorja. Rezultati študij, ki so preučevale vpliv resveratrola na humani celični liniji raka prostate LNCaP, so pokazali, da resveratrol blokira delovanje androgenov na androgenem receptorju, zmanjša izražanje na androgene odzivnih genov, zmanjša transkripcijsko aktivnost androgenega receptorja in inhibira z androgeni spodbujeno rast in proliferacijo celic raka prostate (131–133). Podobne rezultate delovanja resveratrola so potrdili tudi na celični liniji HeLa, kjer je resveratrol zmanjšal s sintetičnim androgenom spodbujeno transkripcijsko aktivnost na androgenem receptorju in zmanjšal izražanje na androgene odzivnega gena PSA (134). Piceatanol se od resveratrola razlikuje le v dodatni OH skupini, zato bi pričakovali, da bo učinek delovanja piceatanola podoben delovanju resveratrola. Potencialno antiandrogeno delovanje piceatanola je bilo opisano tudi v študijah Iguchi in sod. (2012) in Kumar in sod. (2014), kjer je piceatanol na celični liniji LNCaP zmanjšal izražanje na androgen odzivni gen NKX3 (133), inhibiral z androgeni spodbujeno rast celic raka prostate 22Rv1 in zmanjšal stopnjo ekspresije androgenih receptorjev (135). Glede na obstoječe študije o antiandrogenem učinku resveratrola in piceatanola bi zato pričakovali, da bo piceatanol tudi v primeru našega testiranja na androgene receptorje celične linije MDA-kb2 deloval antagonistično. Nasprotno rezultati našega testiranja piceatanola na celični liniji MDA-kb2 kažejo, da piceatanol pri koncentracijah 175 in 0,175 μM na androgene in glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2 deluje agonistično. Medtem ko pri nobeni izmed testiranih koncentracij piceatanol na androgene ali glukokortikoidne receptorje ni deloval antagonistično. V testirani koncentraciji $1,75 \times 10^{-3}$ μM je ob prisotnosti agonista celo statistično značilno povečal aktivnost luciferaze glede na kontrolo in povečal agonistični učinek DHT. Ena izmed možnih razlag agonističnega delovanja piceatanola je lahko uporaba druge celične linije in s tem drugačna občutljivost celic na spojino piceatanol. Primerljive rezultate našim so na enaki celični liniji MDA-kb2 prav tako dobili tudi v okviru magistrskega dela (136), kjer so preučevali (anti)androgeni vpliv resveratrola in njegovih strukturnih analogov. Tako kot v našem primeru so rezultati študije magistrskega dela pokazali agonistično delovanje resveratrola in njegovih strukturnih analogov, medtem ko nobena izmed testiranih spojin ni izkazovala antiandrogenega delovanja (136). Razlog za agonistično delovanje piceatanola na celični

liniji MDA-kb2 lahko iščemo tudi v različnih poteh in mehanizmih delovanja, saj je natančen mehanizem delovanja resveratrola oz. piceatanola na androgeni sistem še nepojasnen.

Rezultati naše študije kažejo, da piceatanol izkazuje potencial hormonskega motilca tako na androgenem kot tudi na glukokortikoidnem receptorju. Razlog, da piceatanol izkazuje afiniteto vezave na omenjene hormonske receptorje, lahko iščemo v njegovi strukturi. Piceatanol v svoji strukturi vsebuje stilben, ta strukturni element pa je značilen tudi za druge spojine, ki delujejo kot hormonski motilci. Znan primer spojine, ki v svoji strukturi vsebuje stilben in ga strukturno lahko primerjamo s piceatanolom, je dietilstilbestrol (DES). Ostali primeri spojin, ki v svoji strukturi vsebujejo stilben in so prav tako sposobni šibke do zmerne vezave na androgeni receptor, so še tamoksifen, 4-hidroksitamoksifen, nafoksidin in klomifen (slika 7) (116).



Slika 7: Piceatanol lahko strukturno primerjamo z ostalimi stilbeni, ki so sposobni šibke do zmerne vezave na androgenem receptorju. Ta strukturni razred vsebuje dva benzenova obroča, ki sta med seboj ločena z dvema ogljikoma z dvojno vezjo.

Dietilstilbestrol je znan kot močan estrogenski hormonski motilec (137). Poleg agonističnega delovanja na estrogenski receptor pa izkazuje tudi šibko do zmerno afiniteto vezave na

androgenem receptorju, kjer pa deluje antagonistično (117). Študije kažejo, da piceatanol na estrogeni receptor prav tako deluje agonistično (138,139), medtem ko je delovanje piceatanola na androgeni receptor še zelo neraziskano. Na androgene receptorje celične linije MDA-kb2 je dietilstilbestrol deloval antagonistično (117), medtem ko rezultati naše študije kažejo, da piceatanol na androgene receptorje celične linije MDA-kb2 deluje agonistično. DES vsebuje dve OH skupini, preko katerih bi lahko tvoril H-interakcije z aktivnim mestom androgenega receptorja, medtem ko njegovi etilni skupini gledata ven iz ligand vezavne domene AR, kar otežuje interakcije DES z AR in je verjetno vzrok njegovi antagonistični aktivnosti (117). Ker nasprotno piceatanol na mostu med obema benzenovima obročema ne vsebuje nobene dodatne stranske verige, ki bi lahko motila umestitev in interagiranje z aktivnim mestom ligand vezavne domene AR, lahko sklepamo, da mu to omogoča pravilno umestitev v vezavno domeno in posledično agonistično delovanje.

Tako kot omenjeno že pri ostalih testiranih spojinah je tudi za primer piceatanola delovanje na glukokortikoidnih receptorjih še povsem neraziskano. Na osnovi naših rezultatov piceatanol v koncentracijah 175 in 0,175 μM na glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2 deluje agonistično.

Pri interpretaciji rezultatov naše raziskave delovanja piceatanola na androgene in glukokortikoidne receptorje celične linije MDA-kb2 moramo upoštevati, da je na dobljene rezultate lahko vplivalo tudi obnašanje piceatanola v testu MTS. Piceatanol je v MTS testu pri koncentracijah 175, 150, 125 in 100 μM zelo povečal odzivnost sistema (graf 1D), kar je lahko posledica stimulacije proliferacije celic ali pa vzrok lahko leži v samih fiz.-kem. lastnostih spojine pri višjih koncentracijah. V kolikor je vzrok proliferacija celic, je učinek povezan tudi z večjim številom celic in posledičnim večjim odzivom. Za dokončno potrditev vplivov delovanja piceatanola na androgene in glukokortikoidne receptorje bodo tako potrebne še dodatne raziskave.

6 SKLEP

Na podlagi rezultatov eksperimentalnega dela diplomske naloge preučevanja potencialnega učinkovanja PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC na AR in GR celične linije MDA-kb2 lahko povzamemo, da:

- je prvotna izbrana testirana koncentracija 200 μM v MTS testu delovala citotoksično pri testiranih spojinah PAR, DIC in PIC. V nadaljnje testiranje z luciferaznim testom smo uvrstili prve necitotoksične koncentracije, ki so znašale za PAR, DIC in PIC 175 μM ter zaradi omejitve topnosti 50 μM za 4'OH-DIC.
- so spojine PAR, DIC in PIC izkazovale učinek na AR celične linije MDA-kb2.
- so vse testirane spojine PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC izkazovale učinek na GR celične linije MDA-kb2.
- so spojine PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC izkazovale aktivnost na AR in/ali GR v prvi necitotoksični koncentraciji (PAR kot agonist na AR in GR; DIC kot mešani agonist/antagonist na AR in GR; 4'OH-DIC kot agonist na GR in PIC kot agonist na AR in GR).
- so spojine PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC izkazovale aktivnost na AR in/ali GR v velikostnih razredih koncentracij, katere se nahajajo v plazmi po terapevtski uporabi (PAR sam ali v kombinaciji z DHT kot agonist na AR ter kot antagonist na GR; DIC kot agonist na AR, 4'OH-DIC kot agonist na GR in PIC v kombinaciji z DHT kot agonist na AR)
- je PAR v velikostnih razredih koncentracij, katerim smo potencialno lahko izpostavljeni neposredno preko okolja, izkazoval antagonistični učinek na GR.

Iz dobljenih rezultatov lahko potrdimo postavljeno 1. hipotezo, da preiskovane spojine PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC izkazujejo učinke na AR in GR MDA-kb2 celične linije. V okviru naše raziskave smo potrdili, da je smiselno testiranje spojin, ki vsebujejo podobne strukturne elemente kot že znani hormonski motilci, saj ti strukturni elementi lahko pripomorejo k tvorbi interakcij spojin z receptorji endokrinega sistema in tako motijo endokrino delovanje. V razpravi smo s strukturno primerjavo preiskovanih spojin z ostalimi spojinami, ki na enaki celični liniji MDA-kb2 delujejo kot hormonski motilci, pokazali, da so za afiniteto vezave do AR lahko ključne OH skupina na para mestu

benzenskega obroča, NH-C=O skupina ter aromatski obroč v strukturi paracetamola, Ph-X-Ph skupina ter atomi klora v strukturi diklofenaka ter stilbenski skelet v strukturi piceatanola. Na podlagi rezultatov naše študije pa ne moremo potrditi postavljenih 2. in 3. hipoteze. V naši raziskavi dodatna OH skupina na aromatskem obroču v strukturi 4'OH-DIC ni pripomogla k večji afiniteti vezave oziroma k večjemu izkazovanju učinka na AR in/ali GR v primerjavi s starševsko spojino DIC. 4'OH-DIC je v primerjavi z DIC izkazoval učinek le na GR. Prav tako paracetamol v naši raziskavi na AR celične linije MDA-kb2 ni deloval antagonistično, ampak je v velikostnih razredih koncentracij, katerim smo izpostavljeni ob terapevtski uporabi, na AR deloval agonistično.

Rezultati naše *in vitro* raziskave na AR in GR celične linije MDA-kb2 kažejo, da preiskovane spojine PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC lahko izkazujejo potencial hormonskega motilca. Zaradi široke uporabe testiranih spojin v terapevtske namene in neposredne potencialne izpostavljenosti spojinam preko okolja, je smotrno nadaljnje vrednotenje potencialnega vpliva PAR, DIC, 4'OH-DIC in PIC na endokrini sistem.

7 VIRI

1. De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *J Environ Public Health*. 2012; 2012:52
2. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(3–5):204–15.
3. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety (2002) Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization (WHO/PCS/EDC/02.2). World Health Organization, Geneva, Switzerland;
http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/
Dostop: 6.11.2015
4. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:135–62.
5. Mazaud-Guittot, Séverine, et al. "Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013; 98(11):E1757-E1767.
6. Okazaki K, Okazaki S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Wakabayashi S, et al. A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the "Enhanced OECD Test Guideline 407" for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol*. 2002;76(10):553–9.
7. Endocrine Disruptors - National Institute of Environmental Health Sciences;
https://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf
Dostop: 6.11.2015
8. Roig B, Mnif W, Hassine AIH, Zidi I, Bayle S, Bartegi A, et al. Endocrine Disrupting Chemicals and Human Health Risk Assessment: A Critical Review. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2013;43(21):2297–351.
9. The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments – The Weybridge+15 (1996–2011) report; <http://www.eea.europa.eu/publications/the-impacts-of-endocrine-disruptors> Dostop: 6.11.2015
10. Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, R. T. State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals. *Toxicology Letters*. 2012;211:S3.
11. Swedenborg E, Rüegg J, Mäkelä S, Pongratz I. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J Mol Endocrinol*. 2009;43(1):1–10.
12. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):685–704.

13. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 2012;33(3):378–455.
14. Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology.* 2012;153(9):4097–110.
15. Kortenkamp A. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect.* 2007;115(1):98–105.
16. Hecker M, Hollert H. Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs. *Environ Sci Eur.* 2011;23(1):1–14.
17. Bachmann G, Bancroft J, Braunstein G, Burger H, Davis S, Dennerstein L, et al. Female androgen insufficiency: the princeton consensus statement on definition, classification, and assessment. *Fertil Steril.* 2002;77(4):660–5.
18. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, et al. International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):782–97.
19. Heemers HV, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgen Activation of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein Pathway: Current Insights. *Mol Endocrinol.* 2006;20(10):2265–77.
20. Rang HP. Rang & Dale's Pharmacology. 7 edition. Churchill Livingstone; 2011. 792 p.
21. Koeppen BM, Stanton BA. Berne & Levy Physiology, 6th Updated Edition, with Student Consult Online Access. 6th edition. Philadelphia, PA: Mosby; 2009. 848 p.
22. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and Actions of Estrogens. *N Engl J Med.* 2002;346(5):340–52.
23. Pereira de Jésus-Tran K, Côté P-L, Cantin L, Blanchet J, Labrie F, Breton R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Sci.* 2006;15(5):987–99.
24. Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas.* 2009;63(2):142–8.
25. Nahleh Z. Functional and structural analysis of androgen receptors for anti-cancer drug discovery. *Cancer Ther.* 2008;6:439–44.
26. Michels G, Hoppe UC. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(2):182–98.
27. Luccio-Camelo DC, Prins GS. Disruption of androgen receptor signaling in males by

- environmental chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(1–2):74–82.
28. Janošek J, Hilscherová K, Bláha L, Holoubek I. Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicol In Vitro.* 2006;20(1):18–37.
 29. Kimura S, Matsumoto T, Matsuyama R, Shiina H, Sato T, Takeyama K, et al. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(5):183–9.
 30. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.* The 12th edition. Elsevier Health Sciences; 2010. 5635 p.
 31. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, et al. International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):782–97.
 32. Juruena MF, Cleare AJ, Pariante CM. The Hypothalamic Pituitary Adrenal axis, Glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26(3):189–201.
 33. van der Laan S, Meijer OC. Pharmacology of glucocorticoids: Beyond receptors. *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2–3):483–91.
 34. Stahn C, Buttgereit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Rev Rheumatol.* 2008;4(10):525–33.
 35. Odermatt A, Gummy C. Glucocorticoid and mineralocorticoid action: Why should we consider influences by environmental chemicals? *Biochem Pharmacol.* 2008;76(10):1184–93.
 36. Odermatt A, Gummy C. Disruption of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor-Mediated Responses by Environmental Chemicals. *Chim Int J Chem.* 2008;62(5):335–9.
 37. Bessems JGM, Vermeulen NPE. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. *Crit Rev Toxicol.* 2001;31(1):55–138.
 38. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. *CNS Drug Rev.* 2006;12(3–4):250–75.
 39. Information NC for B, Medicine USNL of, Pike 8600 Rockville, Bethesda, MD20894, USA. acetaminophen | C₈H₉NO₂ - PubChem; <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetaminophen#section=Chemical-and-Physical-Properties> Dostop: 30.11.2015
 40. SmPC Lekadol 500 mg filmsko obložene tablete; www.cbz.si Dostop: 30.11.2015
 41. Larson AM. Acetaminophen Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2007;11(3):525–48.

42. Ward B, Alexander-Williams JM. Paracetamol revisited: A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Acute Pain*. 1999;2(3):139–49.
43. Toussaint K, Yang XC, Zielinski MA, Reigle KL, Sacavage SD, Nagar S, et al. What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *J Clin Pharm Ther*. 2010;35(6):617–38.
44. Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatr Anesth*. 2008;18(10):915–21.
45. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*. 2013;21(3):201–32.
46. Josephy PD. The Molecular Toxicology of Acetaminophen. *Drug Metab Rev*. 2005;37(4):581–94.
47. Jóźwiak-Bebenista M, Nowak J. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm*. 2013;71(1):11–23.
48. Rowden AK, Norvell J, Eldridge DL, Kirk MA. Updates on Acetaminophen Toxicity. *Med Clin North Am*. 2005;89(6):1145–59.
49. Hudec R, Božeková L, Tisoňová J. Consumption of three most widely used analgesics in six European countries. *J Clin Pharm Ther*. 2012;37(1):78–80.
50. Dierkes G, Weiss T, Modick H, Käfferlein HU, Brüning T, Koch HM. N-Acetyl-4-aminophenol (paracetamol), N-acetyl-2-aminophenol and acetanilide in urine samples from the general population, individuals exposed to aniline and paracetamol users. *Int J Hyg Environ Health*. 2014;217(4–5):592–9.
51. Garcin M, Mille-Hamard L, Billat V. Use of acetaminophen in young subelite athletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005;45(4):604–7.
52. Derman E, Schwellnus M. Pain management in sports medicine: Use and abuse of anti-inflammatory and other agents. *SA Fam Pr* 2010. 2014;52(1):27–32.
53. Modick H, Schütze A, Pälme C, Weiss T, Brüning T, Koch HM. Rapid determination of N-acetyl-4-aminophenol (paracetamol) in urine by tandem mass spectrometry coupled with on-line clean-up by two dimensional turbulent flow/reversed phase liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2013;925:33–9.
54. Nielsen JKS, Modick H, Mørck TA, Jensen JF, Nielsen F, Koch HM, et al. N-acetyl-4-aminophenol (paracetamol) in urine samples of 6–11-year-old Danish school children and their mothers. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218(1):28–33.
55. Islam I, Hossain K, Ahmed T, Bhusal P, Rana S, Tanveer A. The effect of hydrophilic and hydrophobic polymers on release profiles of diclofenac sodium from matrix tablets. *Arch Pharm Pract*. 2013;4(3):120–8.

56. Centralna baza zdravil; www.cbz.si Dostop: 30.11.2015
57. Diklofenak fiz.-kem. lastnosti (PubChem);
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diclofenac> Dostop: 30.11.2015
58. Roth SH. Diclofenac in the treatment of osteoarthritis. *Int J Clin Rheumatol.* 2013;8(2):185–203.
59. SMPC - Naklofen 50 mg gastrorezistentne tablete; www.cbz.si Dostop: 30.11.2015
60. Davies DNM, Anderson KE. Clinical Pharmacokinetics of Diclofenac. *Clin Pharmacokinet.* 2012;33(3):184–213.
61. Boelsterli UA. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;192(3):307–22.
62. Bort R, Macé K, Boobis A, Gómez-Lechón M-J, Pfeifer A, Castell J. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem Pharmacol.* 1999;58(5):787–96.
63. Kumar S, Samuel K, Subramanian R, Braun MP, Stearns RA, Chiu S-HL, et al. Extrapolation of Diclofenac Clearance from in Vitro Microsomal Metabolism Data: Role of Acyl Glucuronidation and Sequential Oxidative Metabolism of the Acyl Glucuronide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303(3):969–78.
64. Zhai X-J, Yu Y, Chen F, Lu Y-N. Comparative Bioavailability and Tolerability of Single and Multiple Doses of 2 Diclofenac Sodium Sustained-Release Tablet Formulations in Fasting, Healthy Chinese Male Volunteers. *Curr Ther Res.* 2013;75:53–8.
65. Hoeger B, Köllner B, Dietrich DR, Hitzfeld B. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat Toxicol.* 2005;75(1):53–64.
66. Hickey EJ, Raje RR, Reid VE, Gross SM, Ray SD. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(2):139–52.
67. Altman R. Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology.
68. Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, Lanás A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24(2):121–32.
69. European Medicines Agency - Diclofenac use in animals poses a risk to European vultures;
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2014/12/news_detail_002233.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1 Dostop: 5.9.2015
70. Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Cruz-Morató C, Caminal G, Vicent T. Degradation

- of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *J Hazard Mater.* 2010;176(1–3):836–42.
71. Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol.* 2004;68(2):141–50.
 72. Zhang Y, Geißen S-U, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere.* 2008;73(8):1151–61.
 73. Direktiva 2013/39/EU Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 12. avgusta 2013 o spremembi direktiv 2000/60/ES in 2008/105/ES v zvezi s prednostnimi snovmi na področju vodne politike; <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32013L0039&from=EN> Dostop: 5.9.2015
 74. Kukreja A, Mishra A, Tiwari A. Source, production and biological activities of piceatannol: a review. *Int J Pharm Sci Res.* 2013;4(10):3738–45.
 75. Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutat Res Mutat Res.* 2012;750(1):60–82.
 76. Lin H-S, Tringali C, Spatafora C, Wu C, Ho PC. A simple and sensitive HPLC-UV method for the quantification of piceatannol analog trans-3,5,3',4'-tetramethoxystilbene in rat plasma and its application for a pre-clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;51(3):679–84.
 77. Roupe KA, Yáñez JA, Teng XW, Davies NM. Pharmacokinetics of selected stilbenes: rhapontigenin, piceatannol and pinosylvin in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(11):1443–50.
 78. Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells. *Eur J Nutr.* 2004;43(5):275–84.
 79. Kim YH, Park C, Lee JO. Induction of apoptosis by piceatannol in human leukemic U937 cells through down-regulation of Bcl-2 and activation of caspases. *Oncol Rep.* 2008;19(4):961–7.
 80. Kim EJ, Park H, Park SY, Jun J-G, Park JHY. The Grape Component Piceatannol Induces Apoptosis in DU145 Human Prostate Cancer Cells via the Activation of Extrinsic and Intrinsic Pathways. *J Med Food.* 2009;12(5):943–51.
 81. Wolter F, Clausnitzer A, Akoglu B, Stein J. Piceatannol, a Natural Analog of Resveratrol, Inhibits Progression through the S Phase of the Cell Cycle in Colorectal Cancer Cell Lines. *J Nutr.* 2002;132(2):298–302.
 82. Ko HS, Lee H-J, Kim S-H, Lee E-O. Piceatannol Suppresses Breast Cancer Cell Invasion through the Inhibition of MMP-9: Involvement of PI3K/AKT and NF- κ B Pathways. *J Agric Food Chem.* 2012;60(16):4083–9.
 83. Kuo P-L, Hsu Y-L. The grape and wine constituent piceatannol inhibits proliferation

- of human bladder cancer cells via blocking cell cycle progression and inducing Fas/membrane bound Fas ligand-mediated apoptotic pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(4):408–18.
84. Richard N, Porath D, Radspieler A, Schwager J. Effects of resveratrol, piceatannol, triacetoxystilbene, and genistein on the inflammatory response of human peripheral blood leukocytes. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(5):431–42.
 85. Bavaresco L, Vezulli S, Battilani P, Giorni P, Pietri A, Bertuzzi T. Effect of Ochratoxin A-Producing Aspergilli on Stilbenic Phytoalexin Synthesis in Grapes. *J Agric Food Chem.* 2003;51(21):6151–7.
 86. Docherty JJ, McEwen AH, Sweet JT, Bailey E, Booth D. Tristan. Resveratrol inhibition of *Propionibacterium acnes*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(6):1182–4.
 87. Kim HJ, Lee KW, Lee HJ. Protective Effects of Piceatannol against Beta-Amyloid-Induced Neuronal Cell Death. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1095(1):473–82.
 88. Choi KH, Kim J-E, Song NR, Son EJ. Phosphoinositide 3-kinase is a novel target of piceatannol for inhibiting PDGF-BB-induced proliferation and migration in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2010;85(4).
 89. Vo TPN. Pro- and anticarcinogenic mechanisms of piceatannol are activated dose dependently in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2010;31(12):2074–81.
 90. Murias M, Jäger W, Handler N, Erker T, Horvath Z, Szekeres T, et al. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure–activity relationship. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(6):903–12.
 91. Rimando MA, Kalt W, Magee BJ, Dewez J, Ballington RJ. Resveratrol, Pterostilbene and Piceatannol in *Vaccinium* Berries. *J Agric Food Chem.* 2004;52(15):4713–9.
 92. Matsui Y, Sugiyama K, Kamel M. Extract of passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seed containing High Amounts of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis. *J Agric Food Chem.* 2010;58(20):11112–8.
 93. Xie L, Bolling BW. Characterisation of stilbenes in California almonds (*Prunus dulcis*) by UHPLC–MS. *Food Chem.* 2014;148:300–6.
 94. Ko SK. A new stilbene diglycoside from *Rheum undulatum*. *Arch Pharm Res.* 2000;23(2):159–62.
 95. Piver B, Fer M, Vitrac X, Merillon J-M, Dreano Y, Berthou F, et al. Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(4):773–82.
 96. Celična linija MDA-kb2; http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2713.aspx?geo_country=nl#characteristics Dostop: 22.1.2016
 97. Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE. A Novel Cell Line, MDA-kb2, That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the

- Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicol Sci.* 2002;66(1):69–81.
98. The European Collection of Cell Cultures (ECACC). ECACC Handbook - Fundamental Techniques and Protocols for ECACC Cell Lines; http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Instructions/1/ecacc_handbook.pdf Dostop: 5.8.2015
99. Tracy L. Hoffman. Counting Cells. *Cell Biology A laboratory Handbook*. Julio E. Celis. Elsevier Academic Press; 2006;21–4.
100. Kristine S. Louis, Andre C. Siegel. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. *Mammalian Cell Viability Methods and Protocols*. Martin J. Stoddart. Humana Press; 2011;7–12.
101. Riss TL, Moravec RA, Niles AL. Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. *Mammalian Cell Viability Methods in Molecular Biology*. Martin J. Stoddart. Humana Press; 2011;103–14.
102. Riss TL, Moravec RA. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *ASSAY Drug Dev Technol.* 2004;2(1):51–62.
103. Longo-Sorbello GS, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR. Cytotoxicity and Cell Growth Assays. *Cell Biology A Laboratory Handbook Third Edition*. Julio E. Celis. Elsevier Academic Press; 2005;315–24.
104. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.
105. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. Elsevier; 2005; 127–52; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387265605110047> Dostop: 5.8.2015
106. Promega. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Technical bulletin. 2012; <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf> Dostop: 5.8.2015
107. Bauer P. Luciferase Reporter Gene Assays. In: Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer*. Springer Berlin Heidelberg; 2011;2077–81 http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-16483-5_3430 Dostop: 5.8.2015
108. Inouye S. Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions. *Cell Mol Life Sci.* 2009;67(3):387–404.
109. Modick H, Schütze A, Pälme C, Weiss T, Brüning T, Koch HM. Rapid determination of N-acetyl-4-aminophenol (paracetamol) in urine by tandem mass

- spectrometry coupled with on-line clean-up by two dimensional turbulent flow/reversed phase liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2013;925:33–9.
110. Albert O, Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Legrand A, Guillé F, Bensalah K, et al. Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Hum Reprod*. 2013;28(7):1890–8.
 111. Jensen MS, Rebordosa C, Thulstrup AM, Toft G, Sørensen HT, Bonde JP, et al. Maternal use of acetaminophen, ibuprofen, and acetylsalicylic acid during pregnancy and risk of cryptorchidism. *Epidemiol Camb Mass*. 2010;21(6):779–85.
 112. Kristensen DM, Hass U, Lesné L, Lottrup G, Jacobsen PR, Desdoits-Lethimonier C, et al. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Hum Reprod*. 2010;323.
 113. Kristensen DM, Lesné L, Le Fol V, Desdoits-Lethimonier C, Dejuq-Rainsford N, Leffers H, et al. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *Int J Androl*. 2012;35(3):377–84.
 114. Snijder CA, Kortenkamp A, Steegers EAP, Jaddoe VWV, Hofman A, Hass U, et al. Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. *Hum Reprod*. 2012;474.
 115. Chen J, Ahn KC, Gee NA, Ahmed MI, Duleba AJ, Zhao L, et al. Triclocarban Enhances Testosterone Action: A New Type of Endocrine Disruptor? *Endocrinology*. 2008;149(3):1173–9.
 116. Fang H, Tong W, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, et al. Study of 202 Natural, Synthetic, and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *Chem Res Toxicol*. 2003;16(10):1338–58.
 117. Tamura H, Ishimoto Y, Fujikawa T, Aoyama H, Yoshikawa H, Akamatsu M. Structural basis for androgen receptor agonists and antagonists: Interaction of SPEED 98-listed chemicals and related compounds with the androgen receptor based on an in vitro reporter gene assay and 3D-QSAR. *Bioorg Med Chem*. 2006;14(21):7160–74.
 118. Xu L-C, Sun H, Chen J-F, Bian Q, Qian J, Song L, et al. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology*. 2005;216(2–3):197–203.
 119. Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, et al. Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicol Sci*. 2005;84(2):249–59.
 120. Zhang Y, Geißen S-U, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. 2008;73(8):1151–61.
 121. Diniz MS, Salgado R, Pereira VJ, Carvalho G, Oehmen A, Reis MAM, et al. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in

- zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Total Environ*. 2015;505:282–9.
122. Nassef M, Kim SG, Seki M, Kang IJ, Hano T, Shimasaki Y, et al. In ovo nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*. 2010;79(9):966–73.
 123. Gonzalez-Rey M, Bebianno MJ. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*. 2014;148:221–30.
 124. Stepanova S, Praskova E, Chromcova L, Plhalova L, Prokes M, Blahova J, et al. The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;35(3):454–60.
 125. Saravanan M, Hur J-H, Arul N, Ramesh M. Toxicological effects of clofibrac acid and diclofenac on plasma thyroid hormones of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* during short and long-term exposures. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38(3):948–58.
 126. Cuklev F, Fick J, Cvijovic M, Kristiansson E, Förlin L, Larsson DGJ. Does ketoprofen or diclofenac pose the lowest risk to fish? *J Hazard Mater*. 2012;229–230:100–6.
 127. Hong HN, Kim HN, Park KS, Lee S-K, Gu MB. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere*. 2007;67(11):2115–21.
 128. Wong C, Kelce WR, Sar M, Wilson EM. Androgen Receptor Antagonist versus Agonist Activities of the Fungicide Vinclozolin Relative to Hydroxyflutamide. *J Biol Chem*. 1995;270(34):19998–20003.
 129. Stülten D, Zühlke S, Lamshöft M, Spiteller M. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Sci Total Environ*. 2008;405(1–3):310–6.
 130. Scheurell M, Franke S, Shah RM, Hühnerfuss H. Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan. *Chemosphere*. 2009;77(6):870–6.
 131. Kai L, Levenson AS. Combination of Resveratrol and Antiandrogen Flutamide Has Synergistic Effect on Androgen Receptor Inhibition in Prostate Cancer Cells. *Anticancer Res*. 2011;31(10):3323–30.
 132. Mitchell SH, Zhu W, Young CYF. Resveratrol Inhibits the Expression and Function of the Androgen Receptor in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Cancer Res*. 1999;59(23):5892–5.
 133. Iguchi K, Toyama T, Ito T, Shakui T, Usui S, Oyama M, et al. Antiandrogenic Activity of Resveratrol Analogs in Prostate Cancer LNCaP Cells. *J Androl*. 2012;33(6):1208–15.
 134. Shi W, Leong M, Cho E, Farrell J, Chen H, Tian J, et al. Repressive Effects of

- Resveratrol on Androgen Receptor Transcriptional Activity. PLoS ONE. 2009;4(10):e7398.
135. Kumar A, Lin S-Y, Dhar S, Rimando AM, Levenson AS. Stilbens inhibit androgen receptor expression in 22Rv1 castrate-resistant prostate cancer cells. *J Med Act Plants*. 2014;3(1-4):1–8.
 136. Črešnjevec Katja. Vpliv resveratrola in njegovih analogov na aktivnost androgenih receptorjev, izraženih v celicah MDA-kb2. Magistersko delo. Univerza Ljubljana, Fakulteta za farmacijo; 2015.
 137. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Adverse Effects of the Model Environmental Estrogen Diethylstilbestrol Are Transmitted to Subsequent Generations. *Endocrinology*. 2006;147(6):11–7.
 138. Maggiolini M, Recchia AG, Bonofiglio D, Catalano S, Vivacqua A, Carpino A, et al. The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor α in human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol*. 2005;35(2):269–81.
 139. Gehm BD, Levenson AS, Liu H, Lee E-J, Amundsen BM, Cushman M, et al. Estrogenic effects of resveratrol in breast cancer cells expressing mutant and wild-type estrogen receptors: role of AF-1 and AF-2. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;88(3):223–34.
 140. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. 2012; www.oecd.org/chemicalsafety/testing/50459967.pdf
Dostop: 4.12.2015
 141. Luccio-Camelo DC, Prins GS. Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(1–2):74–82.
 142. Odermatt A, Gumy C, Atanasov AG, Dzyakanchuk AA. Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: Potential mechanisms and relevance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;102(1–5):222–31.
 143. Stillings M, Havlik I, Chetty M, Clinton C, Schall R, Moodley I, et al. Comparison of the Pharmacokinetic Profiles of Soluble Aspirin and Solid Paracetamol Tablets in Fed and Fasted Volunteers. *Curr Med Res Opin*. 2000;16(2):115–24.
 144. Maat MM de, Tijssen TA, Brüggemann RJ, Ponsen HH. Paracetamol for intravenous use in medium- and intensive care patients: pharmacokinetics and tolerance. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(7):713–9.
 145. Ibáñez Y, Rodríguez JM, Luján M, Grattan TJ, Martin AJ, Burnett I. A pharmacokinetic study investigating the rate of absorption of a 500 mg dose of a rapidly absorbed paracetamol tablet and a standard paracetamol tablet. *Curr Med Res Opin*. 2006;22(10):1893–7.
 146. Singla NK, Parulan C, Samson R, Hutchinson J, Bushnell R, Beja EG, et al. Plasma and Cerebrospinal Fluid Pharmacokinetic Parameters After Single-Dose Administration of Intravenous, Oral, or Rectal Acetaminophen. *Pain Pract*.

2012;12(7):523–32.

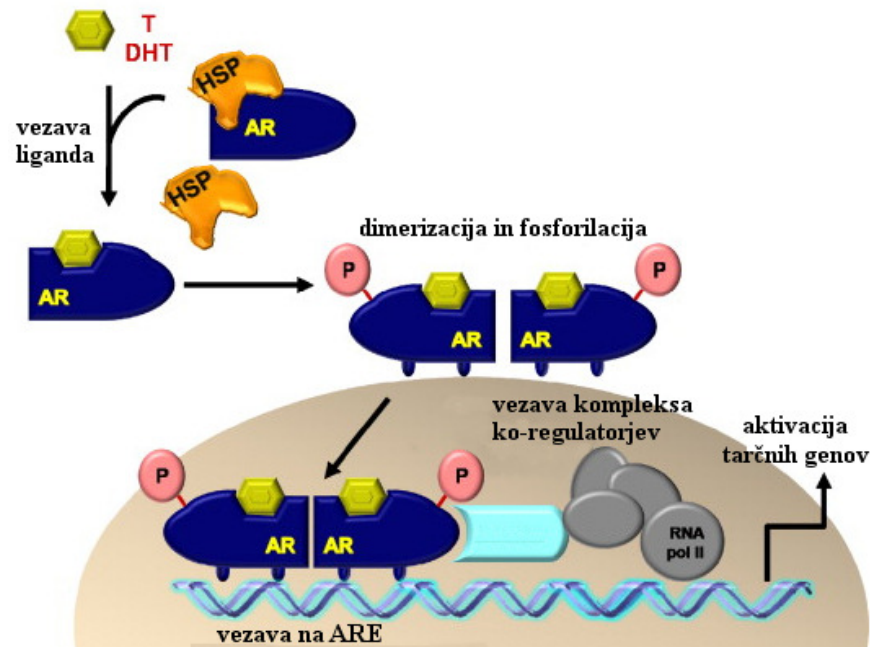
147. Hinz B, Chevts J, Renner B, Wuttke H, Rau T, Schmidt A, et al. Bioavailability of diclofenac potassium at low doses. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Jan 1;59(1):80–4.
148. Kienzler J-L, Gold M, Nollevaux F. Systemic Bioavailability of Topical Diclofenac Sodium Gel 1% Versus Oral Diclofenac Sodium in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2010;50(1):50–61.
149. Efe T, Sagnak E, Roessler PP, Getgood A, Patzer T, Fuchs-Winkelmann S, et al. Penetration of topical diclofenac sodium 4 % spray gel into the synovial tissue and synovial fluid of the knee: a randomised clinical trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;22(2):345–50.
150. Hui X, Hewitt PG, Poblete N, Maibach HI, Shainhouse JZ, Wester RC. In Vivo Bioavailability and Metabolism of Topical Diclofenac Lotion in Human Volunteers. *Pharm Res*. 1998;15(10):1589–95.
151. Yasar Ü, Eliasson E, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Gadd M, Sjöqvist F, et al. The role of CYP2C9 genotype in the metabolism of diclofenac in vivo and in vitro. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001;57(10):729–35.
152. Gravel A. Salicylate Disrupts Interrenal Steroidogenesis and Brain Glucocorticoid Receptor Expression in Rainbow Trout. *Toxicol Sci*. 2006 Jun 1;93(1):41–9.
153. Isidori M, Bellotta M, Cangiano M, Parrella A. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environ Int*. 2009 Jul;35(5):826–9.
154. Harnagea-Theophilus E. Acetaminophen Alters Estrogenic Responses in Vitro: Stimulation of DNA Synthesis in Estrogen-Responsive Human Breast Cancer Cells. *Toxicol Sci*. 1998 Nov;46(1):38–44.
155. Wu S, Zhang L, Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Oct 4;96(4):875–84.
156. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcão A, Soares E, Costa R, Loureiro AI, et al. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(S1):S7–15.
157. Boocock DJ, Patel KR, Faust GES, Normolle DP, Marczylo TH, Crowell JA, et al. Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Apr 1;848(2):182–7.
158. Niles RM, Cook CP, Meadows GG, Fu Y-M, McLaughlin JL, Rankin GO. Resveratrol Is Rapidly Metabolized in Athymic (Nu/Nu) Mice and Does Not Inhibit Human Melanoma Xenograft Tumor Growth. *J Nutr*. 2006;136(10):2542–6.

PRILOGE

Priloga 1: OECD konceptualni okvir za testiranje in oceno kemikalij, ki lahko delujejo kot hormonski motilci (140).

Raven 1	Razvrščanje že obstoječih podatkov in ne-testnih informacij	Zbiranje že obstoječih informacij o testirani spojini (npr. strukturne in fizikalno-kemijske lastnosti, toksikološke in ekotoksikološke informacije, podatki iz QSAR modelov, toksikokinetične in toksikodinamične informacije).
Raven 2	<i>In vitro</i> testi za namen pridobivanja podatkov o mehanizmu/patoloških poteh endokrinega delovanja	Testi spadajo med presejalne teste in se uporabljajo za detekcijo nevarnosti, identifikacijo možnih mehanizmov delovanja in predvidevanj neželenih učinkov. Zasnovani so na interakcijah s hormonskimi receptorji ali drugimi ključnimi encimi, udeleženi v regulaciji nivoja hormonov (npr. test vezave na estrogeni in androgeni receptor, test aktivacije transkripcije, test steroidogeneze, test aromataze).
Raven 3	<i>In vivo</i> testi za namen pridobivanja podatkov o mehanizmu/patoloških poteh endokrinega delovanja	Testi zagotavljajo <i>in vivo</i> presejanje in se uporabljajo za ugotavljanje možne endokrine aktivnosti. Testi podajo opozorila na kemikalije z možnimi lastnostmi endokrinega motilca in zaznajo spremembe v endokrinsko občutljivih tkivih. Rezultati se lahko uporabijo za odločitev ali so potrebni in vivo testi na višjem nivoju. Primeri <i>in vivo</i> testov na ravni 3 so testi na sesalcih (npr. Hershbergerjev test, uterotropični test) in na neselcih (npr. ribji reprodukcijski test).
Raven 4	<i>In vivo</i> testi za namen pridobivanja podatkov o neželenih učinkih v povezavi z endokrinskimi motilci	Testi na ravni 4 zagotavljajo bolj temeljito oceno možnih ali aktualnih učinkov endokrinih motenj kemikalije na odrasli organizem ali na organizem v razvoju. Testi so občutljivi na več kot le en način delovanja endokrinih motilcev. Primeri testov na ravni 4 so preskusi toksičnosti ponavljajočega odmerka (28 ali 90 dnevna toksičnost), presajalni reprodukcijski/razvojni testi (testiranje vpliva na reprodukcijo in razvoj) in testi izpostavljenosti fetusa (vpliv toksičnosti na prenatalni razvoj).
Raven 5	<i>In vivo</i> testi za namen pridobivanja bolj celovitih podatkov o neželenih učinkih na endokrini sistem čez obsežnejši del življenjskega cikla organizmov	Testi za študije razvojne in reprodukcijske toksičnosti, ki podajajo podatke o neželenih učinkih in so uporabni za oceno tveganja. S testi na ravni 5 lahko pridobimo tudi podatke glede odziva v povezavi z odmerkom/ koncentracijo. Sem spadajo eno in dvogeneracijske reproduktivne študije toksičnosti na sesalcih in toksikološke študije, ki zajemajo del ali celoten življenjski cikel rib, dvoživk ali ptičev.

Priloga 2: Shematski prikaz mehanizma delovanja androgenega receptorja (Prirejeno po (24)).

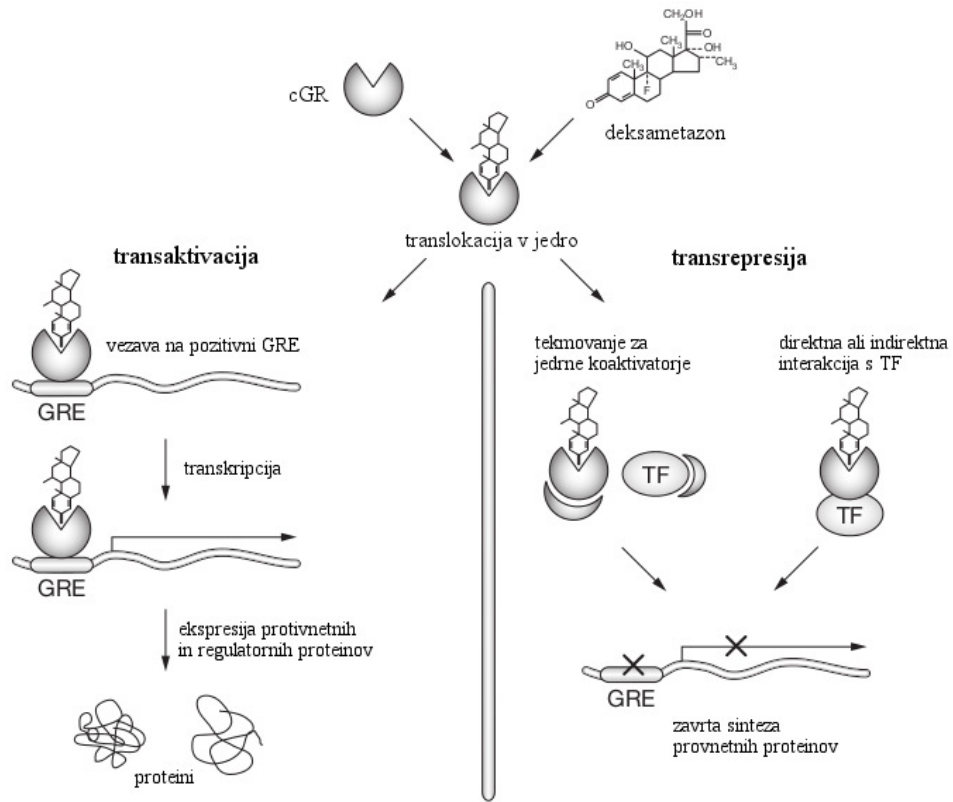


(T - testosteron, DHT - dihidrotestosteron, HSP - proteini toplotnega šoka, AR - androgeni receptor, ARE - na androgen odzivni element, RNA pol II - RNA polimeraza II) Dimerizacija poteka v citosolu ali v jedru.

Priloga 3: Primeri kemikalij, ki motijo androgeni sistem (141).

AGONISTI	
	tetrabromoetilcikloheksan
ANTAGONISTI	
difenilmetani	diklorodifeniltrikloroetani (DDT) in sorodne spojine metoksiklor bisfenol A
flutamidi	vinklozolin linuron
organoklorini	heksaklorocikloheksani prokimidon aldrin in dieldrin
ftalati	butilbenzilftalat
alkilfenoli	4-n-oktil in nonilfenol

Priloga 4: Shematski prikaz mehanizma delovanja glukokortikoidnega receptorja (Prirejeno po (34)).



(cGR - glukokortikoidni receptor v citoplazmi, GRE - glukokortikoidni odzivni element, TF - transkripcijski faktorji)

Priloga 5: Primeri kemikalij, ki motijo glukokortikoidni sistem (35, 36, 142).

motilci HPA osi	<p>poliklorirani bifenili (PCB) policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) težke kovine (svinec, kadmij, cink) organske kositrove spojine (trimetiltin) etanol</p>
motilci steroidogeneze	<p>pesticidi (heksaklorocikloheksan, glifosat) fungicidi (ekonazol, mikonazol) insekticidi (dimetoat, 3-metilsulfonil DDE) izoflavonoidi (genistein, daidzein) β-naftoflavon</p>
inhibitorji aktivnosti 11β-HSD2	<p>gliciretinska kislina abietična kislina fusidna kislina naringenin bisfenol A alkilfenoli (4-terc-oktilfenol, 4-nonilfenol) ditiokarbamatne spojine (DCT) kadmij (Cd²⁺) organske kositrove spojine (tributiltin, dibutiltin)</p>
inhibitorji aktivnosti 11β-HSD1	<p>gliciretinska kislina abietična kislina zearalenon flavanon 2-hidroksiflavanon alkilfenoli (4-terc-oktilfenol, 4-nonilfenol)</p>
motilci funkcije GR spremembe v transkripciji GR antagonisti	<p>arzenik, organske kositrove spojine, bisfenol A, zearalenon, heksaklorobenzen metil sulfonil poliklorirani bifenili (PCB)</p>

Priloga 6: Primeri terapevtskih maksimalnih plazemskih koncentracij (c_{max}) paracetamola, diklofenaka in 4'-hidroksidiklofenaka glede na različne tipe farmacevtskih oblik in način aplikacije

PARACETAMOL		
c_{max} [SD] (min-max) μM	farmacevtska oblika, odmerek, aplikacija	vir
83,4 [9,06]	tableta (1000 mg), na tešče, per os	(143)
42,2 [10,12]	tableta (1000 mg), po hrani, per os	(143)
171,5 (55,0–396,4)	infuzija (1000 mg), intravensko	(144)
56,9 [22,5]	tableta (500 mg), per os	(145)
56,2 [22,5]	tableta (500 mg), per os	(145)
142,9	infuzija (1000 mg), intravensko	(146)
81,4	tableta 1000 (2 × 500 mg), per os	(146)
52,3	svečke 1300 (2 × 650 mg), rektalno	(146)
DIKLOFENAK		
c_{max} [SD] (min-max) μM	farmacevtska oblika, odmerek, aplikacija	vir
1,13 [0,55](0,30–1,94)	tableta (12,5 mg), per os	(147)
1,99 [1,06](0,84–4,69)	tableta (25 mg), per os	(147)
6,39 [1,48](4,36–8,46)	infuzija (22.5 mg), intravensko	(147)
7,66 [2,63]	tableta (50 mg), per os	(148)
1,59 [0,61]	tableta s podaljšanim sproščanjem (75 mg), per os	(64)
0,05 [0,025]	gel (1%), 1 koleno, dermalno	(148)
0,18 [0,108]	gel (1%), 2 kolena, dermalno	(148)
0,013 (0,004–1,02)	gel v spreju (4%), dermalno	(149)
0,039 [0,014]	losjon (1,5%), dermalno	(150)
4'-HIDROKSIDIKLOFENAK		
c_{max} [SD] (min-max) μM	učinkovina, farmacevtska oblika, odmerek, aplikacija	vir
1,1 [0,4](0,4-1,5)	diklofenak, tableta (50 mg), per os	(151)
1,6 [0,5](1,3-2,1)	diklofenak, tableta (50 mg), per os	(151)
1,0 [1,1](0,2-3,0)	diklofenak, tableta (50 mg), per os	(151)
2,3 [2,2](0,5-5,3)	diklofenak, tableta (50 mg), per os	(151)

Priloga 7a: Poznane interakcije paracetamola s hormonskim sistemom

PARACETAMOL					
ANDROGENI SISTEM					
metoda testiranja	uporabljeni model	izpostavljenost PAR	rezultati	učinek	vir
epidemiološka študija	intervju nosečnic o uporabi paracetamola med nosečnostjo	1-2 tedna več kot 2 tedna	- matere, ki so jemale paracetamol več kot 2 tedna znotraj nosečnosti, so imele signifikanto povečano tveganje za rojstvo otroka s kriptorhizmom - signifikantno povečano tveganje za nastanek kriptorhizma je bilo povezano tudi z uporabo paracetamola znotraj drugega trimesečja	antiandrogeni	(112)
in utero	zarodki podgane	150/250/350 mg/kg/dan 13-21 dan brejosti	- signifikantno zmanjšanje anogenitalne razdalje pri zarodkih podgane	antiandrogeni	(112)
ex vivo	kultura testisev podganjih zarodkov	1 μ M po 14,5 dnevu brejosti	- statistično značilno zmanjšana sekrecija testosterona za 50 % iz Leydigovih celic	antiandrogeni	(112)
epidemiološka študija	vprašalnik o uporabi paracetamola med nosečnostjo	uporaba paracetamola med 1, 2 ali 3 trimesečjem	- študija je pokazala, da obstaja povezava med jemanjem paracetamola med drugim trimesečjem nosečnosti (14-22 tednom) in povečano razširjenostjo kriptorhizma pri potomcih	antiandrogeni	(111)
epidemiološka študija	vprašalnik o uporabi paracetamola med nosečnostjo	uporaba paracetamola 1, 2-4, 5-8, 9-12, >12 tednov	- uporaba paracetamola več kot 4 tedne med prvim in drugim trimesečjem je povezana s povečanim tveganjem za pojavnost kriptorhizma	antiandrogeni	(114)
in vitro	kultura testisev odraslega moškega	10^{-4} ali 10^{-5} M, 24-48 h	- signifikantno zmanjšanje produkcije testosterona po 24 h za 30 oz. 18 %	antiandrogeni	(110)
in vitro	humana adrenokortikalna NCI-H295R celična linija	10^{-4} ali 10^{-5} M, 24-48 h	- konc. 10^{-4} je signifikantno zmanjšala produkcijo testosterona za 10 % po 24 h - konc. 10^{-5} je signifikantno zmanjšala produkcijo testosterona za 13 % po 48 h	antiandrogeni	(110)
ex vivo	kultura testisev podganjih zarodkov	0,1-100 μ M, 24/48/72 h	- pri vseh uporabljenih konc. paracetamola (0,1-100 μ M) je bila stopnja tvorbe testosterona v Leydigovih celicah statistično značilno zmanjšana za 10-50 %	antiandrogeni	(113)
GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM					
metoda testiranja	uporabljeni model	izpostavljenost PAR	rezultati	učinek	vir
in vitro	ledvične celice postrvi	1 nM-1000 μ M, 22 h	- konc. 10^{-3} in 10^{-5} M je zmanjšala tvorbo kortizola za 20 %	antagonistični	(152)
ESTROGENI SISTEM					
metoda testiranja	uporabljeni model	izpostavljenost PAR	rezultati	učinek	vir
in vitro	yeast estrogen screen (YES) test	5-80 mg/L	- šibka indukcija hER α	agonistični	(153)
in vitro	na estrogen odzivne celične linije človeških epitelijskih celic raka dojke MCF7, T47D, ZR-75-1	0,03-0,1 mM	- povečanje DNA sinteze v estrogen odzivnih celicah raka prsi	agonistični	(154)

Priloga 7b: Poznane interakcije diklofenaka in piceatanola s hormonskim sistemom

DIKLOFENAK					
ESTROGENI SISTEM					
metoda testiranja	uporabljeni model	izpostavljenost DIC	rezultati	učinek	vir
in vivo	Medaka ribe	1 µg/L	- povečana ekspresija od estrogenov odvisnega gena vitelogenina	agonistični	(127)
PICEATANOL					
ESTROGENI SISTEM					
metoda testiranja	uporabljeni model	izpostavljenost PIC	rezultati	učinek	vir
in vitro	na estrogen odzivna celična linija človeških epiteljskih celic raka prsi MCF7	1 µM	- agonistično delovanje na estrogenem receptorju, povečano izražanje estrogen tarčnih genov kot so s pS2/TIFF1, katepsin D and EFP E2, stimulacija proliferacije rakavih celic MCF7	agonistični	(138)
in vitro	na estrogen odzivna celična linija človeških epiteljskih celic raka prsi MCF7	10-250 nM konc. > 25 µM	- agonistično delovanje na estrogenem receptorju (prokancerogeno delovanje) - inhibicija proliferacije in apoptoza rakavih celic (antikancerogeno delovanje)	agonistični antagonistični	(89)
ANDROGENI SISTEM					
metoda testiranja	uporabljeni model	izpostavljenost PIC	rezultati	učinek	vir
in vitro	celična linija hormonsko odvisnega raka prostate LNCaP	10 µM	- zmanjšano izražanje na androgen odzivni gen NKX3	antiandrogeni	(133)
in vitro	celična linija hormonsko odvisnega raka prostate 22Rv1	1-100 µM	- inhibicija z androgeni spodbujene rasti celic raka prostate 22Rv1 - zmanjšana stopnja ekspresije androgenih receptorjev	antiandrogeni	(135)

Priloga 8: Prisotnost paracetamola, diklofenaka in 4'-hidroksidiklofenaka v vodnem okolju

PARACETAMOL				
c [$\mu\text{g/L}$]	c [μM]	okolje	država	vir
0,007-0,56	0,000046-0,0037	površinske vode	Anglija, Nemčija, Španija, ZDA	(155)
0,13-246	0,00086-1,627	surove odpadne vode	Anglija, Nemčija, Hrvaška, Mediterska obala, Korea, ZDA	(155)
0,079-5,99	0,00052-0,0396	končne odpadne vode	Anglija, Nemčija, Hrvaška, Mediterska obala, Korea, Kanada	(155)
DIKLOFENAK				
c [ng/L]	c [μM]	okolje	država	vir
11-15033	0,000037-0,0508	reka, ribnik	Nemčija	(123)
9-282	0,000030-0,00095	reka	Slovenija	(123)
89	0,00030	reka	Slovenija	(123)
49-332	0,00016-0,00112	reka	Španija	(123)
2200	0,0074	reka	Španija	(123)
20-568	0,000067-0,00192	reka	Anglija	(123)
1-33	0,00000337-0,00011	površinske vode	Francija	(123)
60	0,00020	površinske vode	Hrvaška	(123)
4'-HIDROKSIDIKLOFENAK				
c [$\mu\text{g/L}$]	c [μM]	okolje	država	vir
0,35-1,7	0,0011-0,0054	odpadne vode iz čistilnih naprav	Nemčija	(129)
0,4-1,8	0,0013-0,0058	reke, odpadne vode	Pakistan	(129)

Priloga 9a: Primeri koncentracij, v katerih se piceatanol nahaja v živilih (75).

PICEATANOL		
c [ng/mL]	c [μ M]	živila
48 \pm 1	0,196 \pm 0,004	črni čaj
15 \pm 3	0,061 \pm 0,012	jabolčni sok
14 \pm 4	0,057 \pm 0,016	breskov sok
14 \pm 1,3	0,057 \pm 0,005	rdeče vino
7,7 \pm 0,6	0,031 \pm 0,002	rdeče vino
6,1 \pm 2,6	0,025 \pm 0,011	sladko vino
6,6 \pm 0,6	0,027 \pm 0,002	sladko vino

9b: Primeri plazemskih koncentracij piceatanola, ki nastane kot metabolit iz resveratrola

odmerek resveratrola	konc. resveratrola v plazmi		konc. piceatanola v plazmi*	vir
	ng/mL	μ M	μ M	
25	1,5	0,006	0,00006	(156)
150	25	0,10	0,001	(156)
1000	500	2,05	0,0205	(157)

* Po študiji (158) je odstotek piceatanola, ki nastane kot metabolit iz resveratrola nizek (enak približno 1%).