

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA ČREŠNJOVEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA ČREŠNJOVEC

**VPLIV RESVERATROLA IN NJEGOVIH ANALOGOVI NA AKTIVNOST ANDRO-
GENIH RECEPTORJEV, IZRAŽENIH V CELICAH MDA-kb2**

**INFLUENCE OF RESVERATROL AND ITS ANALOGS ON THE MODULATION
OF ANDROGEN RECEPTORS, EXPRESSED IN MDA-kb2 CELLS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farmacije in somentorstvom dr. Katre Kolšek, mag. farmacije.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za strokovno vodenje, nasvete in vsestransko pomoč pri nastajanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi somentorici, dr. Katri Kolšek, mag. farm., za posredovano znanje, potrpežljivost, pomoč ter veliko praktičnih nasvetov pri izvajanju eksperimentalnega dela. Hvala tudi Špeli in Ivani za prijetno vzdušje pri delu v laboratoriju.

Posebna zahvala gre tudi mojim domačim za razumevanje, potrpežljivost in spodbujanje ter vsem prijateljem za nepozabna doživetja in oporo tekom študija.

Hvala vsem!

Izjava

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

Ljubljana, 2015

Katja Črešnjovec

Kazalo

KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO ENAČB	v
KAZALO PREGLEDNIC.....	vi
POVZETEK	vii
ABSTRACT	ix
SEZNAM OKRAJŠAV.....	xi
1 UVOD	1
1.1 ENDOKRINI SISTEM	1
1.1.1 ANDROGENI SISTEM	2
1.2 MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA.....	4
1.3 RESVERATROL.....	5
1.3.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI	5
1.3.2 BIOLOŠKA UPORABNOST	6
1.3.3 FARMAKOKINETIKA	6
1.3.4 TOKSIKOLOŠKI PROFIL RESVERATROLA	8
1.3.5 FARMAKODINAMIKA	11
2 NAMEN DELA.....	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 TESTIRANE SPOJINE.....	18
3.1.2 CELIČNA LINIJA MDA-kb2.....	19
3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA	20
3.1.4 GOJIŠČE	21
3.2 METODE DELA S CELICAMI.....	21
3.2.1 PRIPRAVA MEDIJA.....	21
3.2.2 ODMRZOVANJE CELIC.....	22
3.2.3 GOJENJE CELIČNIH KULTUR.....	23
3.2.4 SUBKULTIVIRANJE CELIČNE LINIJE	23
3.2.5 ŠTETJE CELIC	23
3.2.6 NASAJANJE CELIC V KULTURO	24
3.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI	25
3.3.1 TEST MTS	26

3.4	DOLOČANJE AKTIVNOSTI RSV IN NJEGOVIH ANALOGOVI NA AR.....	27
3.5	STATISTIČNO OVREDNOTENJE PODATKOV	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1	DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI	31
4.2	DOLOČANJE AKTIVNOSTI RSV IN NJEGOVIH ANALOGOVI NA AR.....	33
4.2.1	DOLOČANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA NA AR.....	33
4.2.2	DOLOČANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA NA AR.....	38
5	SKLEP.....	41
6	LITERATURA.....	43
7	PRILOGE.....	49
7.1	Hormoni glede na kemijsko strukturo	49
7.2	Mehanizem delovanja androgenega receptorja in njegova strukturna zgradba	50
7.3	Testi OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.....	51
7.4	Kemijska struktura <i>trans</i> - in <i>cis</i> -resveratrola ter fizikalno kemijske lastnosti resveratrola.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Števna Neubauerjeva komora.....	24
Slika 2: Shematski prikaz celičnega metabolizma reagenta MTS.....	26
Slika 3: Kemijska struktura dihidrotestosterona.....	28
Slika 4: Kemijska struktura mifepristona (RU-486).....	28
Slika 5: Graf prikazuje preživetja celic MDA-kb2 v odstotkih \pm SD po njihovi 24-stimulaciji s preiskovanimi spojinami pri določenih koncentracijah. Rezultati so podani kot vrednosti treh neodvisnih bioloških ponovitev, v primerjavi s kontrolnimi netretiranimi celicami.....	32
Slika 6: Graf prikazuje agonistično delovanje RSV in njegovih strukturnih analogov na AR in GR, kot relativno vrednost luciferaze \pm SD. Rezultati so podani v obliki srednjih vrednosti meritev iz vsaj treh neodvisnih bioloških ponovitev, v primerjavi s kontrolo (0,2 % DMSO). * predstavlja statistično značilno odstopanje od kontrole (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).....	34
Slika 7: Graf prikazuje agonistično delovanje RSV in njegovih strukturnih analogov na AR, kot relativno vrednost luciferaze \pm SD. Rezultati so podani v obliki srednjih vrednosti meritev iz vsaj treh neodvisnih bioloških ponovitev, v primerjavi s kontrolo (0,2 % DMSO). * predstavlja statistično značilno odstopanje od kontrole (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).....	35
Slika 8: Shematski prikaz odnosa med strukturo in delovanjem za oksadiazolne analoge RSV. R ₁₋₅ : substitucija z različnimi funkcionalnimi skupinami na posameznem mestu v obroču. \uparrow = povečano izražanje aktivnosti luciferaze, \downarrow = zmanjšano izražanje luciferaze	37
Slika 9: Graf prikazuje antagonistično delovanje RSV in njegovih strukturnih analogov na AR prikazano v obliki relativnih vrednosti luciferaze \pm SD. Rezultati so podani kot srednje vrednosti meritev iz vsaj treh neodvisnih bioloških ponovitev, v primerjavi s kontrolo (0,2 % DMSO). * predstavlja statistično značilno odstopanje od kontrole (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)	39
Slika 10: Mehanizem delovanja androgenega receptorja.....	50
Slika 11: Strukturna zgradba androgenega receptorja.....	50
Slika 12: Kemijska struktura trans in cis resveratrola	52

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Računanje koncentracije celic	24
---	----

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I: Strukturni analogi resveratrola in pripadajoče molekulske mase.....	18
Tabela II: Seznam uporabljene opreme	20
Tabela III: Sestava medija za celično linijo MDA-kb2.....	21
Tabela IV: Shematski prikaz hormonov glede na njihovo kemijsko strukturo	49
Tabela V: Shema testov OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev	51
Tabela VI: Fizikalno kemijske lastnosti resveratrola	52

POVZETEK

Resveratrol (RSV) je stilbenoid, ki spada med naravne ne flavonoide. Najdemo ga v približno 70 različnih rastlinah, med njimi najboljši naravni vir predstavljata grozdje in japonski dresnik. V zadnjih letih je resveratrol zaradi številnih ugodnih bioloških učinkov ena izmed najpogosteje proučevanih naravnih polifenolnih spojin. Njegova glavna slabost je nizka biološka uporabnost, kar je poleg širokega spektra pozitivnih farmakoloških lastnosti vzrok za iskanje novih, terapevtsko bolj učinkovitih analogov. Poleg farmakoloških *in vitro* in *in vivo* študij je v namen varne uporabe spojin potrebno ovrednotiti tudi celoten toksikološki profil. Številni neželeni učinki so lahko povezani tudi s porušenjem normalnega hormonskega ravnotežja v telesu. Po do zdaj objavljenih podatkih informacij o varnosti resveratrola primanjkuje. Znano je, da ima estrogeno podobno delovanje, medtem ko je vpliv resveratrola in njegovih analogov na ostali del hormonskega sistema še dokaj neraziskan. V okviru magistrske naloge smo se zaradi strukturne podobnosti RSV z naravno prisotnimi hormoni in domnevnim aktiviranjem podobnih procesov v telesu odločili, da bomo ugotovili vpliv resveratrola in njegovih 1,2,4-oksadiazolnih analogov na androgene receptorje (AR). Kot modelni sistem za raziskovanje smo uporabili stabilno celično linijo MDA-kb2, ki omogoča določanje učinkov na androgenih in glukokortikoidnih receptorjih z možnostjo razlikovanja agonističnega in antagonističnega delovanja testirane spojine. Predhodno smo s testom MTS določili najvišjo koncentracijo preiskovane spojine, pri kateri je bilo preživetje celic večje kot 80 %. Prvotno izbrana koncentracija 50 μM se je pri večini spojin zaradi citotoksičnosti in/ali obarjanja izkazala kot neustrezna. Na podlagi rezultatov testa citotoksičnosti smo za nadaljnji test določanja učinkov na AR *in vitro*, spojine testirali v ustrezno nižji koncentraciji, in sicer ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 in RSV pri 25 μM , spojini ZMP-17 in ZMP-23 pa zaradi citotoksičnosti in obarjanja pri 10 μM . S presejalnim luciferaznim testom *in vitro* smo ugotovili, da vse spojine, razen ZMP-9, v izbranih koncentracijah izkazujejo androgeno delovanje, saj so statistično značilno povečale aktivnost luciferaze, ki je v naši raziskavi posredni pokazatelj učinka na androgeni receptor. V zadnjem delu magistrske naloge smo ugotovili, da nobena od obravnavanih spojin v testirani koncentraciji nima antiandrogenega delovanja na celično linijo MDA-kb2. Potrdili smo domnevo o visoki stopnji preživetja izbrane celične linije po izpostavitvi preiskovanim spojinam in njihovem vplivu na AR. To pomeni, da obstaja verjetnost, da tako resveratrol kot njegovi analogi povzročajo motnje v hormonskem ravnotežju

in posledično vplivajo na normalno delovanje procesov v telesu. Na podlagi razlik v odzivu aktivnosti luciferaze smo potrdili tudi hipotezo, da spremembe narave funkcionalnih skupin (zaetrenost hidroksilnih skupin) in njihova drugačna razporeditev v strukturi vodijo v šibkejše androgeno delovanje. Rezultati raziskovalnega dela dajejo osnovo za podrobnejšo oceno učinkov resveratrola in njegovih na novo sintetiziranih strukturnih analogov na endokrini sistem, vključno z ugotavljanjem mehanizma delovanja ter povezavo med odmerkom (izpostavljenost) in škodljivimi učinki na človeški organizem.

KLJUČNE BESEDE: hormonski (endokrini) motilci, resveratrol, analogi resveratrola, androgeni receptor, celična linija MDA-kb2

ABSTRACT

Resveratrol (RSV) is a stilbenoid, a natural non-flavonoid. It can be found in about 70 different plants, among them grapes and Japanese knotweed being their richest natural source. In the last years, resveratrol is one of the most studied natural polyphenolic compounds, due to its numerous beneficial biological effects. Its main weakness however is its low bioavailability, which is beside the broad specter of pharmacological properties, the main reason for discovering therapeutically more efficient analogues. Apart from pharmacological *in vitro* and *in vivo* studies, we need to, for the purpose of safely using this compounds, evaluate its entire toxicological profile. Numerous unwanted side effects can be associated with disturbing the normal hormonal balance in our bodies. So far safety checks regarding resveratrol have been scarce. It is known, that it has an estrogen-like effect, but the effects of resveratrol and its analogues on the rest of the hormonal system has yet to be discovered. For the purpose of this thesis, we have decided to test the effect of resveratrol and its 1,2,4-oxadiazol analogues on androgen receptors, because of the similarity of RSV with naturally present hormones and supposed activation of similar processes in the body. As a research model, we have decided to use the stable cell line MDA-kb2, that enables to determine the effects on androgen and glucocorticoid receptors with the ability to distinguish agonistic from antagonistic properties of the tested substance. Previously, with the MTS test, we discovered the maximum concentration of the tested substance, where the cell survival rate was above 80 %. The initial concentration of 50 μM proved to be, with most compounds unfit, because of its cytotoxicity and precipitation. Based on cytotoxic test report, for the following *in vitro* test we tested the compounds effect on androgen receptors in sufficiently low concentrations, meaning ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 and RSV at 25 μM , whereas ZMP-17 and ZMP-23 at 10 μM , due to cytotoxicity and precipitation. By using a screening *in vitro* luciferase assay, we discovered, that all compound, except ZMP-9, exhibit androgenic properties in selected concentrations, because the effects of luciferase on androgenic receptors had statistically risen markedly. In the final part of the thesis, we determined, that none of the tested compounds in its selected concentrations exhibited antiandrogenic properties on cell line MDA-k2b. We have confirmed the assumption of a high survival rate of the cell line, when exposed to those compounds and their androgenic receptor effect. This means, that there is a possibility, that both resveratrol as well as its analogues cause disturbances in hormonal balance and there-

fore disturb normal physiological processes in the body. Based on differences in reacting to luciferase, we have confirmed the hypothesis, that changing the nature of the functional group (esterification of hydroxyl groups) and their configuration, leads to a weaker androgen effect. The results of the thesis, give basis, for a detailed evaluation, regarding hazards of resveratrol and its newly synthesized structural analogues on the endocrine system, including uncovering the mechanism and link between dose and harmful side effects on the organism.

KEYWORDS: endocrine disruptors, resveratrol, resveratrol analogs, androgen receptor, MDA-kb2 cells

SEZNAM OKRAJŠAV

AAT	alanin-aminotransferaza
ADI	sprejemljiv dnevni odmerek
AF	alkalna fosfataza
AR	androgeni receptor
ARE	odzivni element na androgene
BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem
CAT	kloramfenikol acetilna transferaza
COX	ciklooksigenaza
DES	dietilstilbestrol
DHT	dihidrotestosteron
DMSO	dimetilsulfoksid
ER	estrogenski receptor
FBS	fetalni goveji serum
FLUT	flutamid
FSH	folikle spodbujajoči hormon
GnRH	gonadotropin sproščujoči hormon
GR	glukokortikoidni receptor
HC	hidrokortizon
HSD	hidroksisteroidna dehidrogenaza
IC ₅₀	koncentracija liganda, ki inhibira 50 % receptorja
IPCS	Mednarodni program za kemijsko varnost
K _d	afiniteta liganda do receptorja
LD50	odmerek snovi, ki povzroči 50 % smrtnost testiranih živali
LDB	domena, ki veže ligand
LDL	lipoproteini nizke gostote
LH	luteinizirajoči hormon
LNCaP	celična linija hormonsko odvisnega raka prostate
LPH	laktaza florizin hidrolaza
NF-kB	nuklearni faktor kapa B
NO	dušikov oksid
NOAEL	koncentracija, pri kateri še ni mogoče opaziti neželenih učinkov
NOS	dušikova oksidna sintaza
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
PBS	fosfatni pufer
PGC-1 α	koaktivator 1 α peroksisomski proliferator aktiviranega receptorja gama (angl. Peroxisome proliferator-activated receptor-gama coactivator 1alfa)
PR	progesteronski receptor
RSV	resveratrol
RU-486	mifepriston
SHBG	globulin, ki veže spolni hormon
SIRT1	sirtuin
SOD	superoksidna dismutaza
TNF α	dejavnik tumorske nekroze α
TXA ₂	tromboksan A ₂
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

Resveratrol (RSV) je znan predvsem kot močan naravni antioksidant. Kljub številnim znanstvenim raziskavam o njegovih pozitivnih lastnostih pa se uporablja le kot prehransko dopolnilo. Slabe farmakokinetične lastnosti in posledično nizka biološka uporabnost je številne znanstvenike usmerila v sintezo strukturnih analogov, ki bi te lastnosti izboljšali ter s tem povečali njegovo biološko delovanje. Za varno terapevtsko uporabo snovi je pomembno ovrednotiti tudi njihove toksikokinetične in toksikodinamične lastnosti, med katere spada tudi delovanje na hormonski sistem. Kemijska struktura RSV kaže, da lahko le-ta deluje kot hormonski motilec. Zato smo se odločili, da preverimo učinke RSV in njegovih analogov na androgeni receptor (AR).

1.1 ENDOKRINI SISTEM

Endokrini sistem skupaj z živčnim sistemom uravnava in usklajuje delovanje našega telesa. Deluje s pomočjo hormonov - kemičnih snovi, ki v zelo majhnih količinah vplivajo na tarčne celice v organih telesa, kjer sprožijo specifičen odziv (1). Izločajo jih endokrine žleze ali posamezne celice, kar je regulirano z ustreznimi živčnimi, humoralnimi ali hormonskimi signali. Tako lahko določena koncentracija iona v zunajcelični tekočini zavre ali sproži izločanje hormona ali pa je to spodbujeno preko živčnega impulza. Pri hormonski regulaciji pa običajno koncentracija enega hormona v krvi povzroči izločanje ali ustavitev drugega hormona. Koncentracije hormonov v krvi, ki so potrebne za uravnavanje metabolnih in endokrinih procesov v organizmu, so majhne, od 1 pg do največ nekaj μg na mililiter (2). Večina žlez običajno deluje po principu negativne povratne zanke, redko, kot v primeru oksitocina, pa je povratna zanka tudi pozitivna (1, 2). Glede na kemijsko strukturo poznamo peptidne hormone (aminokislinski polimeri), derivate tirozina (ščitnični hormoni, kateholamini) in steroidne hormone (derivati holesterola) (3) (*Priloga 1*). Po načinu izločanja pa ločimo endokrine hormone, ki nastajajo v določenih žleznih celicah in po krvnem obtoku potujejo do oddaljenih tarčnih celic; parakrine hormone, ki prenašajo informacije po živcih in medceličnici na sosednje celice, ter avtokrine hormone, ki delujejo neposredno na isto celico, ki jih je proizvedla (2). Hormoni se, raztopljeni v plazmi ali vezani na plazemske beljakovine, prenesejo do tarčnih celic, ki imajo v membrani ali v notranjosti celice specifične receptorje, s katerimi interagirajo. Nesteroidni hormoni se vežejo na receptorje v membrani, kar sproži aktivacijo drugih molekul na notranji strani membrane. Običajno je tak tip reakcij povezan z nastankom sekundarnega obveščevalca, ki ima vlogo aktivatorja

ali inhibitorja različnih procesov v celici (1). Medtem ko steroidni hormoni, ki so topni v maščobah, difundirajo v celico, se vežejo na receptorji v citoplazmi ter se prenesejo v jedro, najpogosteje mono- ali heterodimerizirajo, se vežejo na DNA in sledi aktivacija posameznih genov. Prav tako preko membrane difundirajo hormoni ščitnice, ki pa se na receptor vežejo v jedru (2).

1.1.1 ANDROGENI SISTEM

Androgeni so moški spolni hormoni, ki so potrebni za razvoj moških spolnih organov v embrionalni dobi, spermatogenezo v puberteti ter uravnavajo razvoj in vzdrževanje moških sekundarnih spolnih znakov. Poleg tega vplivajo tudi na razvoj in rast mišične mase (anabolni učinek), pospešujejo linearno rast kosti in povečajo kostno maso, spodbujajo sintezo eritropoetina, vplivajo na vedenje ter imajo preko delovanja na ščitnico, ledvice in maščevje številne metabolne učinke. Glavni predstavnik moških spolnih hormonov je testosteron, ki se primarno sintetizira iz holesterola v Leydigovih celicah testisov, majhne količine pa nastajajo tudi v nadledvični žlezi obeh spolov in jajčnikih pri ženskah. Prekurzorja androgenov sta dehidroepiandrosteron in androstendion, ki se sproščata iz nadledvične žleze (4). Biosinteza androgenov poteka preko pregnenolona v vrsti kemijskih reakcij, ki jih katalizirajo encimi CYP11A1, CYP17A1, 3 β -HSD tip 2 in 17 β -HSD tip 3 (5). Ireverzibilna redukcija testosterona do DHT je katalizirana z encimom 5 α -reduktazo in poteka v prostati, testisih, lasnih foliklih in jetrih (4). Molekula DHT je najaktivnejši androgen, ker ima višjo afiniteto do AR ($K_d=10^{-11}$ M), počasnejšo stopnjo disociacije ligand-receptor in je manj dovzeten za razgradnjo kompleksa ligand-receptor v primerjavi s testosteronom ($K_d=10^{-9}$ M) (4, 6). Dinamično ravnovesje androgenov in kontrolo reprodukcije v organizmu uravnava hipotalamus-hipofizna-gonadna os. Ko koncentracija testosterona v krvi pade, se iz hipotalamusa sprosti GnRH, ki spodbuja izločanje LH in FSH iz sprednjega dela hipofize, pri čemer LH stimulira sintezo in izločanje testosterona v Leydigovih celicah testisov, FSH pa spodbudi spermatogenezo. Za tvorbo semenčic v Sertolijevih celicah je poleg vezanega FSH potreben še testosteron, vezan na AR. Po načelu negativne povratne zanke povišana raven testosterona v krvi zavre tvorbo in izločanje hipotalamusnega GnRH in neposredno LH hipofize, inhibin iz Sertolijevih celic pa izločanje FSH (2). Androgeni se do tarčnih celic transportirajo vezani na proteine, in sicer na albumin in globulin, veže spolni hormon (SHBG). Ocenjuje se, da je na beljakovine vezanega približno 98 % testosterona, kar pomeni, da je le majhen del biološko aktiven. Pri odraslem moškem naj bi povprečna celokupna raven testosterona v serumu znašala okrog 10 -30 nM, medtem ko so vrednosti znot-

raj testisov tudi do 100-krat višje (4). Raven androgenov v krvnem obtoku žensk je nižja, približno desetina tiste pri moških. Njihova koncentracija pa začne dodatno upadati še v postmenopavznem obdobju (1). Ko androgeni dosežejo tarčno tkivo, difundirajo preko membrane v celico in se vežejo na androgeni receptor (AR), ki spada v naddružino tri jedrnih receptorjev (NR3C4) (2, 4). Gre za 110 kDa velik fosfoprotein in deluje kot transkripcijski dejavnik, ki v odvisnosti od liganda uravnava izražanje različnih genov. Pred vezavo liganda se AR nahaja v citoplazmi, po njej pa sledi disociacija proteinov toplotnega šoka (t. i. »heat shock« stresni proteini), ki so vezani na neaktivnem receptorju, omogočajo ustrezno konformacijo receptorja za vezavo liganda in delujejo kot korepresorji. Sledi homodimerizacija in fosforilacija kompleksa androgen-AR in njegov prenos v jedro celice, kjer se veže na specifično odzivni element ARE. To je določeno zaporedje nukleotidov, ki je namenjeno vezavi kompleksa AR-androgen. Ligand povzroči konformacijsko spremembo AR, kar omogoča vezavo koregulatorjev in s tem tkivno specifično izražanje gena. V primeru vezave koaktivatorja pride do prepisovanja gena in sinteze proteinov, medtem ko korepresorji povzročijo utišanje genov (5) (*Mehanizem delovanja AR je prikazan v Prilogi 2*). Gen AR se nahaja na X-kromosomu (Xq11-12) in ga sestavljajo tri domene: N-terminalna domena, DNA vezavna domena in domena za vezavo liganda (4) (*Priloga 2*). N-terminalna domena vsebuje aktivacijsko funkcijski AF-1, ki je variabilna in od liganda neodvisna regija. Omogoča transkripcijo tarčnih genov, tako da se poveže z domeno za vezavo liganda. Centralni del predstavlja DNA-vezavno domeno, ki vsebuje dva cinkova prsta. Eden omogoča prepoznavo in vezavo na specifično palindronsko zaporedje na DNA, imenovano ARE, drugi pa dimerizacijo. Med DNA vezavno regijo in C terminalnim delom je t.i. povezovalno področje gena. Njena vloga je prenos kompleksa hormon-receptor v jedro. C terminalna domena vsebuje domeno za vezavo liganda, katere del je od liganda odvisen aktivacijski del AF-2, ki omogoča prepoznavanje liganda in njegovo vezavo, dimerizacijo receptorjev ter vezavo koregulatorjev (7). Poleg klasičnega (počasnega) načina delovanja lahko androgeni preko membranskih in citosolnih signalnih poti delujejo tudi negenomsko. V nasprotju z genomskim delovanjem je tak mehanizem hiter in kratkotrajen ter v veliki meri posredovan preko sekundarnih prenašalcev in fosforilacije. Osnova zanj je vezava na specifične receptorje v membrani ali pa deluje preko interakcij z ionskimi kanalčki (8).

1.2 MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA

Motnje v delovanju endokrinega sistema predstavljajo pomemben javnozdravstveni problem, ki jih na globalni ravni podrobneje obravnava tudi OECD. Vse več je dokazov, da številne kemijske spojine - naravne in sintezne, motijo delovanje endokrinega sistema in povzročajo neželene učinke pri ljudeh in živalih, in sicer že v izjemno nizkih koncentracijah. Znanstveniki so takšne snovi poimenovali hormonski oz. endokrini motilci (9). Med najpomembnejše potrjene ali potencialne hormonske motilce sodijo alkilfenoli, ftalati, polibromirani difenili, bisfenol A in njegovi analogi, težke kovine, aromatski ogljikovodiki, fitoestrogeni in drugi. Delovno telo WHO/IPCS je leta 2002 opredelilo endokrini motilec kot telesu tujo snov ali mešanico, ki spremeni funkcijo endokrinega sistema in ima zato škodljive učinke na zdravje neokvarjenega organizma, njegove potomce ali (sub)populacijo (10). Mehanizmi, preko katerih endokrini motilci vplivajo na hormonski sistem in spremenijo normalno funkcijo hormonov, so različni. Najbolj raziskane kemijske spojine iz okolja posnemajo ali zavirajo delovanje hormonskega sistema in imajo (anti)estrogenski učinek, narašča pa tudi zaskrbljenost glede prisotnosti snovi z (anti)androgenim in tiroidnim delovanjem (9). Sprva so mislili, da hormonski motilci izvajajo svoje učinke izključno preko vezave na jedrne receptorje, ob tem pa delujejo agonistično ali antagonistično. Nedavne študije pa so pokazale, da lahko delujejo tudi posredno preko ne-jedrnih receptorjev, transkripcijskih koregulatorjev in encimskih poti, ki so vključene v sintezo in presnovo steroidov (9, 11). Drugi manj znani mehanizem delovanja endokrinih motilcev je njihovo neposredno delovanje na izražanje genov (spremembe v metilaciji DNA in acetiliranju histonov) (11). Posledice teh mehanizmov se kažejo kot motnje v razvoju in delovanju reproduktivnega sistema ter povečani pogostosti ali napredovanju nekaterih presnovnih bolezni (9). Raziskave zadnjih let kažejo, da hormonski motilci povzročajo največje tveganje prav v času pred rojstvom in zgodnji poporodni dobi, ko se razvijajo organi in nevronske sistem. Škodljive posledice izpostavljenosti so lahko vidne šele leta kasneje ali pa imajo celo vpliv na naslednje generacije (12). V namen ugotovitve ocene tveganja je OECD razvila smernice za testiranje kemikalij, ki lahko z delovanjem na endokrini sistem potencialno škodljivo vplivajo na zdravje in okolje (*Priloga 3*). Metode preskušanja so standardizirane in mednarodno priznane ter obsegajo kombinacijo testov *in vitro* in *in vivo*, ne vsebujejo pa ocene izpostavljenosti, ki jo je potrebno upoštevati pri odločitvi ali je potrebno nadaljnje testiranje (13). Osnovni namen programa OECD ni, da se uporablja kot stopenjska testna strategija, temveč kot zbirka orodij, ki zagotavlja

pridobivanje različnih informacij o učinkih potencialnega hormonskega motilca. Kljub temu sta dve državi članici OECD (ZDA, Japonska) razvili zelo podobno večstopenjsko strategijo testiranja. V obeh programih je poudarek na dvostopenjskem testiranju, kjer prva stopnja temelji na presejalnih testih *in silico*, *in vitro* ter kratkotrajnih testih *in vivo* (1., 2. in 3. raven), ki omogočajo identifikacijo in razvrščanje snovi glede njihove potencialne interakcije z endokrinim sistemom ter mehanizme delovanja. Druga stopnja testov (4. in 5. raven) pa z dolgotrajnimi študijami *in vivo* na poskusnih živalih omogoča določitev neželenih učinkov ter odnos med koncentracijo in odzivom (14).

1.3 RESVERATROL

Resveratrol (RSV) ali 3,5,4'-trihidroksistilben (*Slika 11*), je stilbenoid, ki spada med naravne ne-flavonoidne polifenole. Prvič so ga odkrili leta 1940 v korenini teloha (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) in kasneje, leta 1963 v korenini japonskega dresnika (*Polygonum cuspidatum*) (15, 16). Uvrščamo ga med naravne fitoalaksine, to so antibiotikom podobne snovi, ki rastline varujejo pred različnimi boleznimi. Rastline ga sintetizirajo po šikimatni in fenil-propanoidni poti kot odziv na okužbe, stres, poškodbe, UV sevanje in toksine (17, 18). Danes najdemo RSV v okrog 70 različnih rastlinah, kot so grozdje, arašidi, evkaliptus, borovnice, pistacija in druge. Grozdje predstavlja eden izmed bogatejših virov RSV, kjer se sintetizira predvsem kot obramba pred sivo grozdno plesnijo *Botrytis cinerea* v povrhnjici listov in koži grozdnih jagod. Pri pridelavi rdečih vin maceracija zmletega grozdja omogoča podaljšan stik grozdnega soka s kožico jagode, zato so koncentracije RSV v rdečem vinu višje kot v belem. Količine RSV se v rdečih vinih gibljejo med 0,2 in 7,7 mg/L, v rose in v belih vinih pa do 1 mg/L. Spojina je pritegnila širšo pozornost šele leta 1992, ko so na podlagi številnih epidemioloških študij opazili, da je med francosko populacijo kljub uživanju mastne in kalorične hrane za kar 40 % nižja incidenca bolezni srca in ožilja. Ena od razlag za t. i. francoski paradoks je, da uživanje rdečega vina v zmernih količinah ugodno deluje na zdravje, predvsem zaradi velike vsebnosti RSV (19, 20, 21).

1.3.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Osnovno molekulo RSV sestavljata dva aromatska obroča, ki sta povezana z etilensko vezjo. Slednja omogoča, da se RSV nahaja v *cis* in *trans* izomerni obliki, ki pa sta lahko prosti (aglikon) ali vezani na glukozo kot glukozid (*Slika 8 v Prilogi 4*) (21). RSV-3-O-β-D-glukozid, imenovan piceid je glavna oblika RSV v rastlinah (17). Trans-RSV je stabilen pri 75-odstotni vlagi in 40 °C v prisotnosti zraka, nestabilen pa pri visokem pH in UV svetlo-

bi. Cis oblika je relativno stabilna le pri nevtralnem pH in popolni zaščiti pred svetlobo. RSV se je izkazal tudi kot fotoobčutljiva spojina, saj se v 1 uri ob prisotnosti svetlobe 80 - 90 % trans-RSV pretvori v cis-RSV (22). Je praktično netopen v vodi in bolje topen v maščobah, zato izkazuje visoko prepustnost membrane in ga uvrščamo v II. razred klasifikacije BCS (23). Osnovne fizikalno kemijske lastnosti molekule so prikazane v *Prilogi 4*.

1.3.2 BIOLOŠKA UPORABNOST

Številne študije na živalih in ljudeh so pokazale, da je biološka uporabnost peroralnega RSV majhna, predvsem na račun obsežnega metabolizma v črevesju in jetrih, enterohepatičnega kroženja ter hitrega izločanja (19). Njegova začetna razpolovna doba je kratka, v razponu od 8 do 14 minut. Lipofilna narava spojine omogoča, da se pri ljudeh absorbira okoli 70 % zaužitega RSV (16). Največja koncentracija v plazmi se po peroralni aplikaciji pri ljudeh doseže v 30 minutah. Količina RSV, ki ga zaužijemo iz prehranskih virov, redko presega vsebnost 5 mg/L in je pogosto vzrok, da so koncentracije v plazmi pod mejo detekcije ali pa v obsegu študij *in vitro*, in sicer od 32 nM do 100 μ M. V plazmi lahko tako po 25 mg peroralnem odmerku izmerimo nespremenjeni RSV le v sledih, v koncentraciji do 5 ng/mL. Višji odmerki (do 5 g) pa povečajo njegovo koncentracijo do 500 ng/mL. Tako pri ljudeh kot podganah je v krvi prisotnega manj kot 5 % prostega RSV, ostalo je v obliki metabolitov. Plazemski razpolovni čas le teh je približno 9,2 ur, maksimalno koncentracijo v plazmi pa dosežejo v 30 do 60 minutah. Študije kažejo, da lahko biološko uporabnost RSV izboljšamo s pripravo njegovih analogov ali z vgradnjo v dostavne sisteme (24).

1.3.3 FARMAKOKINETIKA

1.3.3.1 Absorpcija

RSV se v obliki aglikona po peroralnem zaužitju enostavno absorbira v epiteljske celice tankega črevesja s pasivno difuzijo. Vendar pa je v živilih večinoma v obliki glukozyda, ki se ne more tako enostavno in hitro absorbirati. Glukozydni RSV se lahko skozi fosfolipidni dvosloj aktivno transportira s pomočjo Na-glukozydnega prenašalca 1 in je po vstopu v lumen enterocita substrat za citosolno β -glukozydazo, ki omogoča hidrolizo do prostega RSV. V drug mehanizem pretvorbe do prostega RSV je vključen encim laktaza florizin hidrolaza (LPH), ki se nahaja v membrani enterocita in katalizira hidrolizo pred absorpcijo v lumnu tankega črevesja. Ostali neabsorbirani RSV potuje do debelega črevesja, kjer ga lokalna mikroflora s pomočjo bakterijskih encimov (β -glukoronidaze) pretvori v dihidroRSV, pri čemer poteče hidrogenacija alifatske dvojne vezi (17). Poleg slednjega so v

pogojih *in vitro* in *in vivo* opazili še dva do zdaj neznana bakterijska presnovka, in sicer lanularin (3,4`-dihidroksibenzil) in 3,4`-dihidroksi-trans-stilben (25). DihidroRSV se lahko nato absorbira ali z blatom izloči v obliki glukuronida in sulfata (17). V študiji, izvedeni na zdravih prostovoljcih, so primerjali vpliv hrane na obseg absorpcije RSV iz rdečega vina. Ugotovili so, da ni statistično značilne razlike, če RSV zaužijemo z obrokom ali pa na prazen želodec (26). Zdi se, da je najučinkovitejši način aplikacije RSV pri ljudeh bukalno/sublingvalno dajanje, saj naj bi po dveh minutah po zaužitju 1 mg RSV v 50 mL raztopine, v plazmi izmerili prost RSV v koncentraciji 37 ng/mL, če raztopino zadržimo v ustih eno minuto, preden jo pogoltnemo. Za primerjavo, takšen nivo nespremenjenega RSV v krvi lahko s tableto po peroralni poti dosežemo le z odmerkom 250 mg (17).

1.3.3.2 Metabolizem

Po absorpciji je RSV v veliki meri podvržen metabolizmu prvega prehoda, ki poteka v steni prebavnega trakta in v jetrnih mikrosomih po dveh presnovnih poteh, pri katerih nastane glukuronid in sulfat (17). Biotransformacija RSV poteka v glavnem preko reakcij II. faze metabolizma, v majhni meri pa tudi preko reakcij I. faze (27). Ugotovili so, da preko hidroksilacije s CYP1A1 in CYP1A2 nastaja piceatanol, presnovek RSV z dodatno OH skupino na mestu 3` (28). V študiji *in vitro* v citosolu človeških jeter so ugotovili, da v prisotnosti sulfotransferaz v glavnem prevladuje konjugacija s sulfonsko kislino. Metaboliti, ki pri tem nastanejo, so trans-RSV-3-O-4`-disulfat, trans-RSV-4`-O-sulfat in trans-RSV-3-O-sulfat, pri čemer slednji nastaja v največjem deležu. Za njihov nastanek sta pri ljudeh odgovorna predvsem izoencima SULT1A1 in SULT1E1 (20). Za glukuronidacijo RSV so odgovorni encimi UDP-glukuronoziltransferaze, ki najpogosteje omogočajo nastanek RSV-3-O-glukuronida in RSV-4-O-glukuronida. Ugotovili so, da sta še posebej aktivni izoobliki UGT1A1 in UGT1A9, manjši prispevek pa ima tudi UGT1A10 (29). Podatki iz večine študij kažejo, da pri uživanju majhnih odmerkov RSV nastajata dva glavna metabolita RSV-3-O-sulfat in RSV-3-O-glukuronid, medtem ko pri visokih odmerkih v glavnem nastajajo konjugati s sulfatom, in sicer zaradi nasičenja glukuronoziltransferaz (30). Nedavna študija kaže, da se RSV presnavlja tudi v pljučih, in sicer pri miših nastajata tako glukuronid in sulfat, pri ljudeh pa le sulfatna oblika RSV. Konjugati RSV so bolj polarni in v vodi bolje topni, kar olajša njihovo izločanje skozi ledvice (29).

1.3.3.3 Porazdelitev

Iz jeter se RSV in presnovki izločijo v žolč in se po krvnem obtoku skozi črevesje ponovno reabsorbirajo do jeter. Metaboliti se nato iz jeter absorbirajo v sistemski krvni obtok in potujejo, vezani na plazemske beljakovine (albumin), v manjši meri pa tudi na krvne celice (eritrociti, trombociti) in lipoproteine (LDL), do tarčnih tkiv (17). Lipofilne lastnosti spojine omogočajo, da so lahko vrednosti RSV v tkivih višje od tistih v plazmi (24). Približno 90 % prostega RSV in 50 % njegovih presnovkov je vezanih na beljakovine (23). Kopiči se v glavnem v tankem črevesju, kolonu, ledvicah, jetrih, pljučih in možganih (17).

1.3.3.4 Izločanje

RSV se po peroralni aplikaciji pri ljudeh skoraj v celoti izloča s presnovki. Ti se večinoma izločajo s sečem (53-85 %), manjši del pa se jih izloči z blatom (3,3-35 %) (23). Izločanje je hitro, saj se 77 % celotnega RSV po peroralnem odmerku 500 mg izloči že v 4 urah (31). Po podatkih iz literature količina RSV-sulfata v urinu znaša približno 37 %, konjugata z glukuronsko kislino pa 19 % vseh metabolitov, medtem ko je količina prostega RSV prisotna le v sledovih (32).

1.3.4 TOKSIKOLOŠKI PROFIL RESVERATROLA

Predklinični podatki na osnovi običajnih študij farmakološke varnosti oz. toksičnosti pri ponavljajočih se odmerkih ne kažejo posebnega tveganja za človeka. Na splošno se RSV ne šteje kot toksična substanca niti ne povzroča znatnih neželenih učinkov na ljudeh.

1.3.4.1 Akutna toksičnost

V študiji akutne toksičnosti so ugotovili, da je vrednost LD50 trans-RSV pri podganah po enkratni peroralni izpostavljenosti 2.000 mg/kg. Pri obdukciji niso opazili znakov toksičnosti, kot so izguba telesne teže in histološke spremembe vitalnih organov. Prav tako niso opazili nobenih neželenih učinkov po enkratnem intravenskem odmerku 80 mg/kg pri podganah. Na podlagi teh rezultatov so sklepali, da je RSV praktično netoksičen tudi v pretiranih pogojih izpostavljenosti (33).

1.3.4.2 Toksičnost po večkratni izpostavljenosti

V 28-dnevni subakutni študiji na podganah trans-RSV v odmerkih 50, 150 in 500 mg/kg/dan ni povzročil nobenih škodljivih toksikoloških učinkov, ki so povezani s telesno težo, spremembami kliničnih, histoloških in hematoloških parametrov, funkcionalnimi motnjami in patološkimi spremembami organov in tkiv. Manjše razlike so opazili le pri porabi hrane in relativni masi srca, kar pa se je izkazalo kot toksikološko nepomembno.

Podobno neželenih učinkov niso opazili tudi v 3-mesečni študiji na podganah v odmerku do najvišje testirane količine 750 mg/kg/dan. Pri samcih je analiza krvi pokazala signifikantno povečanje koncentracije albuminov in razmerje albumin/globulin pri odmerkih 300 in 750 mg/kg/dan ter povečanje anorganskega fosfata pri 750 mg/kg/dan. Pri samicah je prišlo do statistično značilnega povečanja koncentracije alkalnih fosfatov pri 750 mg/kg/dan in zmanjšanja celokupnega bilirubina pri 300 mg/kg/dan. Te izsledke raziskovalci ne štejejo za toksikološko pomembne, ker so jih opazili le pri enem spolu in niso sledili odvisnosti od odmerka. Avtorji so zaključili, da nekoliko nižja telesna masa pri odmerkih 300 in 750 mg/kg/dan ni neželen učinek in je verjetno posledica okusa trans-RSV. Po subkronični izpostavljenosti in dajanju RSV s prehrano so pri podganah ugotovili, da je najvišji odmerek, pri katerem niso opazili nobenih negativnih učinkov, 750 mg/kg/dan (34). V drugi študiji, kjer so RSV dajali podganam s peroralno gavažo v odmerkih 300, 1.000 in 3.000 mg/kg/dan, se je pokazalo, da je vrednost NOAEL za pol nižja, približno 300 mg/kg/dan. Pri gavaži gre za zahteven in učinkovit način hranjenja z uporabo želodčne cevke ali primerne intubacijske kanile, kjer se cevka uvaja skozi nosno votlino neposredno v votlino želodca. Po ponavljajočem se 28-dnevnem dajanju RSV podganam so večino neželenih učinkov opazili le pri odmerku 3.000 mg/kg, in sicer je prišlo do sprememb v kliničnih znakih, kot so zmanjšana telesna masa, dehidracija, anemija, levkocitoza, povišana vrednost BUN, kreatinina, AF, AAT, skupnega bilirubina in albumina. Biološkega pomena so še povečana masa in histopatološke spremembe na ledvicah, ki kažejo na visoko stopnjo pojava nefropatij. Povečana serumska koncentracija ALT, ALKP in celokupnega bilirubina kaže na možno toksičnost za jetra, kar pa se ni pokazalo histološkem nivoju (35). Te razlike v neželenih učinkih in vrednosti NOAEL so posledica različnega kinetičnega profila zaradi različnega načina odmerjanja. Pri peroralni gavaži se pričakuje boljše biološke razpoložljivost in višja maksimalna plazemska koncentracija, kar pogosto sovpada z večjo toksičnostjo. Toksikološko študijo so izvedli še na psih in kuncih. Ugotovili so, da podgane niso manj občutljive in da so vrednosti NOAEL med vrstami primerljive, kar kaže na dobro skladnost odzivov med živalskimi vrstami. Prav tako 6-mesečna študija na podganah in zajcih ni pokazala bistvenega povečanja toksičnosti v primerjavi s kratkoročno 4-tedensko študijo. Na podlagi teh podatkov so prišli do sklepa, da dolgotrajna izpostavljenost RSV ne povečuje tveganja za potencialni toksikološki učinek. V študiji resVida so na osnovi vrednosti NOAEL in varnostnega faktorja 100 za 60 kg težko odraslo osebo določili vrednost ADI, ki znaša 450 mg/dan (36).

Na podlagi podatkov o naravno prisotnih virih RSV v živilih in porabi hrane so za prebivalstvo ZDA izračunali, da je povprečen vnos naravno prisotnega RSV s hrano na uporabnika 0,08 mg/dan oz. 2 µg/kg/dan. Prehranska dopolnila vsebujejo v povprečju med 50 in 325 mg trans-RSV, nekatera pa tudi do 500 mg. Tako je povprečni odmerek RSV v obliki prehranskih dopolnil od 50 pa do 2.000 mg/dan (34). Devetindvajset-dnevna klinična raziskava na ljudeh je pokazala, da RSV v odmerku do 5 g/dan peroralno ne povzroča resnih neželenih učinkov. V glavnem so se pojavili neželeni učinki povezani z gastrointestinalnimi simptomi, kot so slabost, napenjanje, bolečine v trebuhu in driska (36, 37). Dajanje RSV v odmerkih 25, 50, 100 in 150 mg vsake 4 ure, 40 zdravim prostovoljcem, v obdobju 48 ur je povzročilo nekatere blage neželene učinke, najpogosteje glavobol. Drugi dogodki, ki so se pojavili po enkrat pa so bili še bolečine v mišicah spodnjih okončin, zaspanost, omotica in epididimitis (31).

1.3.4.3 Genotoksičnost in rakotvornost

Standardni test povratnih mutacij na bakterijah *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli*, t.i. Amesov test *in vitro*, ni pokazal potencialno mutagenega učinka. Ugotovili so, da ima RSV pozitivno klastogeno aktivnost, kar pomeni, da povzroča strukturne spremembe na kromosomih. Za njegovo določanje so uporabili test kromosomskih aberacij na človeških limfocitih *in vitro*. Vendar pa je nadaljnja študija *in vivo* (mikronukleusni test) na podganah pokazala, da odmerek do 2.000 mg/kg nima učinka. Mehanizem, s katerim trans-RSV inducira klastogeni odziv, ni povsem jasen. Potencialna aktivnost je možna preko ionske interakcije z bakrom ali pa je lahko antioksidativna aktivnost, ki jo ima trans-RSV, prooksidativna in vodi v klastogeno aktivnost *in vitro* (36).

Šest-mesečna študija karcinogenosti na miših obeh spolov z odmerkom 1.000 mg/kg/dan ni pokazala povečane incidence za nastanek tumorjev. Pri odmerkih 2.000 ali 4.000 mg/kg/dan je bila na dan izpostavljenosti stopnja smrtnosti 40 in 70 %. Umrljivost so pripisali neželenim učinkom (npr. zagozditev v želodcu) zaradi velike količine zaužitega RSV v metilcelulozi in ne zaradi z RSV posredovane toksičnosti. Pri visokih odmerkih so identificirali histopatološke izide na ledvicah (hidronefroza) in sečnem mehurju (epitelijska hiperplazija). V drugi študiji na miših, ki imajo genetsko predispozicijo za raka črevesja, so preučevali učinek izpostavljenosti 25 mg/kg TT trans-RSV na pojavnost raka na črevesju. Rezultati študije kažejo 70 % zmanjšano tvorbo raka tankega črevesja in preprečeno tvorbo raka kolona (34, 36).

1.3.4.4 Vpliv na sposobnost razmnoževanja in razvoj

Zaradi stilbenske strukture in strukturne podobnosti močnemu estrogenu dietilstilbestrolu (DES), ima RSV potencialno estrogeno aktivnost. V študiji na samicah podgan *in vivo* z materničnim testom niso opazili estrogenskega učinka RSV. V nasprotju s tem pa študije *in vitro* kažejo šibko fitoestrogensko aktivnost. Rezultati študije reprodukcijske toksičnosti kažejo, da odmerek 750 mg/kg/dan ne vpliva na preživetje zarodka in njegovo težo, ne povzroča strukturnih anomalij in ne vpliva na razdaljo med anusom in spolovilom (36).

1.3.4.5 Draženje in preobčutljivost

Študija na kuncih, ki so jim na obrito področje na hrbtu v enkratnem odmerku aplicirali 0,5 mL raztopine RSV, je pokazala, da nima dražilnega učinka na kožo (metoda OECD 404). Lokalna analiza bezgavk za določanje preobčutljivosti kože pri miših, pa je pokazala, da RSV ne povzroča niti lokalnega draženja na mestu nanosa niti sistemske toksičnosti. Prav tako je bilo ugotovljeno, da po testiranju, skladno z metodo OECD 405, ne iritira kunčjega očesa (test iritacije). Po 24 urah izpostavljenosti RSV so sicer na očesni veznici in beločnici opazili rahlo do zmerno pordelost, kar pa po preteku 72 ur ni bilo več očitno (34).

1.3.5 FARMAKODINAMIKA

Številne študije poročajo, da RSV lahko prepreči ali upočasni napredovanje različnih bolezni, izboljša odpornost na stres in podaljšuje življenjsko dobo različnih organizmov. Mehanizem, s katerim vrši takšno vrsto blagodejnih učinkov, pa še ni povsem jasen (32).

1.3.5.1 Delovanje na krvožilni sistem

Zmerno uživanje rdečega vina se pogosto povezuje z zmanjšanim tveganjem za bolezni srca in ožilja. Pomembno vlogo v zaščiti krvožilnega sistema številni znanstveniki pripisujejo prav RSV. Raziskave na podganah, ki so uživale kalorično bogato hrano, kažejo, da RSV inhibira ekspresijo adhezijskih molekul in proliferacijo vaskularnih gladkih mišic ter tako zmanjšuje tveganje za nastanek krvnih strdkov. Poleg tega se je pokazalo, da lahko RSV spodbudi aktivnost endotelijske sintaze NO in inhibira agregacijo trombocitov. Slednje poteka preko mehanizma selektivne ireverzibilne inhibicije COX-1, ki je odgovoren za sintezo TXA₂ v trombocitih; TXA₂ je močan induktor agregacije trombocitov in vazokonstriktor. Z njegovo inhibicijo trombociti niso sposobni sintetizirati novih proteinov, kar zmanjša tvorbo strdka in poveča pretok krvi. Po delovanju RSV se sinteza TXA₂ ne obnovi, dokler se prizadeti trombociti ne nadomestijo, kar traja okrog 10 dni, zato ima lahko tudi prehodna izpostavljenost RSV trajne pozitivne učinke *in vivo*. V raziskavi na izolira-

nih arterijah podgan so ugotovili, da RSV povzroči vazorelaksacijo preko inhibicije vaskularne NADH/NADPH oksidaze, kar vodi v zmanjšano sintezo bazalnega superoksida in posledično povečano sintezo ter aktivnost NO (32). Slednji preko regulacije gvanilat-ciklaze v celici gladkih mišic izzove relaksacijo in onemogoča delovanje trombocitov. Vpletanje RSV v metabolizem NO je bilo dokazano tako v pogojih *in vitro* kot *in vivo*. Laboratorijske in epidemiološke raziskave kažejo tudi, da RSV zniža vrednosti slabega holesterola LDL v krvi in sočasno preprečuje njegovo oksidacijo, kar dodatno pripomore k zmanjševanju napredka ateroskleroze. V eni od raziskav na jetrih podgan so ugotovili še, da lahko RSV preprečuje tudi nalaganje holesterola in trigliceridov na žilne stene ter inhibira sintezo trigliceridov v jetrih. Vendar pa trenutno podatki študij *in vivo* ne kažejo neposrednega vpliva RSV na serumsko koncentracijo holesterola in trigliceridov, čeprav so pri kuncih, ki so jih hranili z visokokalorično hrano, opazili zmanjšan nastanek strdkov na aterosklerotičnem plaku (24, 32).

1.3.5.2 Antioksidativni učinek

Najbolj poznana in raziskana farmakološka lastnost RSV je njegov antioksidativni učinek, ki ga izvaja preko različnih mehanizmov. Deluje kot lovilce radikalov, preprečuje nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti s povečanjem aktivnosti encimov, ki odstranjujejo ROS ali zmanjšuje aktivnost encimov, ki sodelujejo pri proizvodnji radikalov (24). Izkazalo se je, da ima OH skupina na poziciji para večjo sposobnost »lovljenja« radikalov kot na mestu meta. Poleg tega pa naj bi bil trans-RSV bolj ugoden za keliranje bakrovih ionov kot cis-izomer (38). RSV deluje na encimske sisteme, ki odstranjujejo ROS tako, da povečuje izražanje genov za superoksidno dismutazo SOD, katalazo in hem-oksidazo. Pred kratkim so pri dislipidemičnih pacientih s hipertenzijo dokazali, da RSV z uravnavanjem manganove SOD zmanjšuje endotelno disfunkcijo. Poleg tega je v celični kulturi človeških gladkih mišičnih celic zmanjšal aktivnost in izražanje NADPH oksidaze. Preko tega mehanizma pride do zmanjšane tvorbe superoksidnega aniona in TNF α , kar še dodatno zmanjša nastajanje radikalov. Dodatno so na miših dokazali, da RSV inhibira tudi ksantinsko oksidazo, ki je odgovorna za nastanek H₂O₂ in superoksidnega aniona (24). Posledica oksidativnega stresa je tudi oksidacija biomolekul v telesu, ki poleg lipidov poteka tudi na proteinih in ogljikovih hidratih (38). Avtooksidacija glukoze in neencimska glikacija hemoglobina pospešujeta nastajanje radikalov in drugih oksidantov, kar ima pomembno vlogo v patogenezi sladkorne bolezni tipa 2. V raziskavi izvedeni na diabetičnih podganah, ki so 4 tedne prejemale RSV, so ugotovili, da je prišlo do zmanjšanja količine glikiranega hemoglobina.

V drugi študiji so ugotovili, da zmanjšanje glikiranega hemoglobina za okoli 7 % zmanjša zaplete povezane s sladkorno boleznijo za 30 %. RSV vpliva tudi na jedrni dejavnik Nrf2, ki je odgovoren za izražanje antioksidativnih genov, ki nosijo zapise za NAD(P)H-kinonsko-oksido-reduktazo, glutationsko-S-transferazo, glutationsko-sintetazo in hem-oksigenazo-1. Povišana koncentracija Nrf2 vodi do transkripcije genov, ki so odvisni od Nrf2, kar preprečuje razvoj degenerativnih bolezni. Vpliv na izražanje Nrf2 so pokazali v klinični študiji na desetih zdravih prostovoljcih, ki so en teden prejeli 100 mg RSV, pri čemer je prišlo do statistično značilno povišane aktivnosti Nrf2 (24).

1.3.5.3 Protivnetno delovanje

Protivnetno delovanje RSV je tesno povezano z njegovo antioksidativno sposobnostjo. Osnova zanj naj bi bilo vpletanje v mehanizem arahidonske kisline preko inhibicije COX-2 in 5-lipooksigenaze, kar prepreči nastanek prostaglandinov in levkotrienov, ki so pomembni mediatorji vnetne reakcije (32). Drug mehanizem protivnetnega delovanja poteka preko zmanjšane ekspresije inducibilne NOS, ki se prekomerno izraža v vnetnih procesih in povzroči nastanek velikih količin NO. Ta se lahko kot prosti radikal veže z O₂ ali superoksidnim anionom do peroksinitrita, ki je potencialno citotoksičen (39). RSV deluje protivnetno tudi z zaviranjem izražanja jedrnega transkripcijskega dejavnika NF-κB, ki ima ključno vlogo v regulaciji vnetnih citokinov. Preko tega mehanizma RSV v določeni meri preprečuje nevrodegenerativne bolezni, kot je npr. Alzheimerjeva bolezen in ima pomembno vlogo v zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2 (24).

1.3.5.4 Učinek proti staranju (anti-aging učinek)

Študije na kvasovkah in drugih organizmih so pokazale, da ima RSV pomembno vlogo pri učinkih, povezanih s staranjem. Predpostavlja se, da je za podaljšanje življenja odgovoren sistem SIRT1, ki deluje kot od NAD odvisna histonska deacetilaza (32). RSV stimulira aktivnost gena *SIRT1*, kar vodi do povečane deacetilacije substratov za SIRT1, med katere sodita npr. p-53 in PGC-1α, ki imata ključno vlogo pri uravnavanju presnove in porabe energije (24). Poleg samega vpliva na proces staranja pa RSV sodeluje preko SIRT1 tudi pri motnjah, ki so povezane s starostjo, kot so debelost, sladkorna bolezen, rak, kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni, saj poveča občutljivost na inzulin, zmanjša IGF-1, poveča število mitohondrijev, itd (40).

1.3.5.5 Antikancerogeno delovanje

Raziskovalci so dokazali, da se RSV vpleta v proces karcinogeneze po različnih poteh in tako blokira razvoj raka na različnih stopnjah (20). K protitumorskemu delovanju prispeva jo njegove protivnetne in antioksidativne sposobnosti, saj so ROS neposredno povezane s karcinogenezo (21). Eden izmed mehanizmov za protitumorsko delovanje je tudi inhibicija nekaterih izoenzimov CYP450, ki so potrebni za aktivacijo prokarcinogenov (20). Prav tako RSV inhibira procese tumorske angiogeneze in proliferacije, pri čemer ima pomembno vlogo inhibicija proteinskih-kinaz, ribonukleotidne reduktaze in DNA-polimeraze, poleg tega pa zavira tudi celični cikel v fazi S. Opisano je tudi, da RSV inducira apoptozo, tako da aktivira proapoptotične proteine Bax in Bid ter inhibira delovanje antiapoptotičnih proteinov Bcl-2. Posledično pride do sprostitve citokroma c iz mitohondrija in preko aktivacije kaskade kaspaz do celične smrti. Poleg tega se predpostavlja, da ima RSV zaradi strukturne podobnosti z DES podobne učinke kot estrogen. Vendar kot tak deluje le pod določenimi pogoji. Izkazalo se je, da resveratrol deluje kot agonist ali antagonist estrogena glede na tip celic, oblike ER (α in β) in prisotnost endogenega 17β -estradiola. V celicah hormonsko odzivnega raka dojke je namreč RSV deloval kot agonist ER v odsotnosti endogenega estrogena (17β -estradiola), v njegovi prisotnosti pa kot antagonist ER. Prav tako se je pokazalo, da lahko RSV zavira aktivnost encima aromataze. Na podlagi teh učinkov lahko sklepamo, da je terapija z RSV lahko učinkovita metoda zdravljenja hormonsko odzivnega raka dojke (21).

1.3.5.6 Vpliv resveratrola na androgeni sistem

Kljub velikemu številu znanstvenih člankov v zadnjih dvajsetih letih je o vplivu in natančnem mehanizmu delovanja RSV na androgeni sistem opravljenih le malo raziskav. Večina teh je bila do danes narejena na človeški celični liniji hormonsko odvisnega raka prostate (LNCaP). Rezultati ene izmed prvih študij kažejo, da RSV zavira delovanje AR in izražanje genov (PSA, ARA70 in p21), kar je povezano z zmanjšano rastjo celic prostate in indukcijo apoptoze. RSV je v koncentracijah 50, 100 in 150 μ M zmanjšal aktivnost luciferaze v celicah s promotorjem PSA za več kot 100-krat, katerega izražanje so inducirali z miboleonom (sintetični androgen). Pri nadaljnjem proučevanju, ali je vezavno mesto element ARE, je RSV popolnoma odpravil z miboleonom (0,1 nM) inducirano izražanje kloramfenikol acetilne transferaze (CAT) (41).

Po zaužitju enega do dveh kozarcev rdečega vina običajno v telo sprejmemo 10 -20 μ M RSV (42). V raziskavi so ugotovili, da RSV zmanjša aktivnost luciferaze pri koncentraciji

5 μM ali več, medtem ko pride pri nižji koncentraciji (1 μM) do rahlega, a ne bistvenega, zvišanja aktivnosti AR. RSV je v koncentracijah nad 50 μM popolnoma odpravil z 10 nM DHT aktivirano transkripcijo AR (43). Tudi pri večini ostalih raziskav, ki so proučevale vpliv RSV na AR na celicah LNCaP, je bilo s pomočjo reporterskega gena dokazano, da RSV zmanjša aktivnost AR. Antiandrogeno delovanje je bilo dokazano še na celični liniji COS7 z vgrajenim reporterskim genom za luciferazo, ki izraža AR podgan in na celicah 22Rv1, ki izražajo visoko raven AR brez domene za vezavo liganda. V slednji študiji je bila transkripcijska aktivnost AR zmanjšana tako pri običajno testirani celični liniji LNCaP kot tudi pri 22Rv1, ki je bil stimuliran s 5nM DHT, in sicer do 47 % (LNCaP) in 39 % (22Rv1) pri 50 μM RSV ter do 33 % in 9 % pri 100 μM RSV (44, 45). V eni izmed študij na celični liniji LNCaP so proučevali kombinacijo RSV s flutamidom (antagonist AR). Ugotovili so, da je zdravljenje celic z RSV (1-100 μM) povzročilo podobno inhibicijo rasti, vrednot IC_{50} je znašala 25 μM . Prav tako je RSV statistično značilno inhibiral z androgenom spodbujeno proliferacijo, medtem ko so celice tretirane s spremenljivimi koncentracijami DHT (0,01 nM - 1 μM) v kombinaciji z določeno koncentracijo RSV (50 μM) in/ali 100 μM FLUT. Aktivnost transkripcije AR so v tej študiji določili z uporabo luciferaznega testa, kjer so celice LNCaP transficirali s plazmidom luciferaznega reporterja in njihovo izražanje spodbudili z 10 nM DHT. RSV (50 μM) in flutamid (100 μM) sta posamezno podobno močno inhibirala spodbujeno aktivnost AR, medtem ko je bilo izražanje AR po hkratnem tretiranju celic z RSV in FLUT zavrto na precej višji ravni. Ti rezultati kažejo na sinergistično delovanje FLUT in RSV ter na verjetnost, da RSV ne tekmuje s FLUT za vezavno mesto na AR. Končni rezultat te študije je, da je RSV antagonist AR v podobnem obsegu kot FLUT. Slednji tekmuje za vezavo na AR in povzroči spremembo njegove konformacije, kar prepreči vezavo na ARE, medtem ko so študije pokazale, da se RSV ne veže na ligand-vezavno domeno AR. To je po eni strani presenetljivo, saj je struktura LDB med AR in ER visoko ohranjena, pri čemer je bilo ugotovljeno, da se RSV veže na ER. V tem trenutku informacij o neposredni vezavi RSV na AR ni na voljo, razen podatkov o njegovi šibki afiniteti do tega receptorja. Možno je, da RSV uravnava signalizacijo AR preko drugih mehanizmov (46). Najnovejše študije poročajo, da RSV med drugim ne vpliva na interakcijo AR s proteini »heat shock« in na pozicijo v jedru, ampak so verjetni mehanizmi: inhibicija vezave AR na DNA zaradi zmanjšane acetilacije, vpliv na transkripcijske aktivatorje in represorje, inhibicija dimerizacije AR in drugi (44, 47, 48). Supresivni učinek RSV na rast in indukcijo apoptoze preko zmanjšane regulacije AR so ugotovili tudi

v pogojih *in vivo*, in sicer na modelu transgenih podgan z adenokarcinomom prostate in horioalantoijske membrane piščančjih zarodkov (44, 45).

1.3.5.6.1 Analogi resveratrola

Antiandrogenero delovanje RSV je dokazano, manj pa je znanega o razmerju med strukturo in delovanjem analogov RSV in njihovem vplivu na signalizacijo AR. V študiji na celicah LNCaP z vgrajenim reporterskim plazmidom MMTV-luc so ugotovili, da metoksi skupina ali odstranitev hidroksilne skupine na mestu 4` povečujeta antagonistično delovanje na AR, medtem ko sprememba 3 in/ali 5 hidroksilne skupine zmanjša antiandrogeneri učinek. Med vsemi testiranimi analogi resveratrola, je bil 3,5-dihidroksi-4`-metoksistilben najmočnejši inhibitor transkripcije AR (49).

2 NAMEN DELA

Prisotnost eksogenih snovi v okolju, ki preko različnih mehanizmov vplivajo na delovanje hormonskega sistema, lahko povzroči številne neželene učinke ter posledično škodljivo vpliva na zdravje ljudi, živali in okolje. Pomemben del identifikacije hormonskih motilcev je poleg ugotavljanja njihovih učinkov tudi ocena varnosti snovi. V zadnjih letih znanstveniki veliko pozornosti namenjajo resveratrolu (RSV), substanci, ki je zanimiva predvsem zaradi širokega spektra farmakoloških učinkov. Kemijska struktura RSV posnema zgradbo naravnih hormonov v organizmu in zato je smiselno ugotavljati njegove vplive na endokrini sistem. Le-ta je razen dokazanega delovanja na estrogenski sistem še dokaj neraziskan. V okviru magistrske naloge smo se zato odločili, da določimo učinek resveratrola na androgeni receptor (AR). Vse več študij pa je zaradi slabše biološke razpoložljivosti in hitrega metabolizma ter želenega tarčno specifičnega delovanja RSV, usmerjenih v iskanje njegovih analogov. Pri našem raziskovalnem delu bomo uporabili 1,2,4- oksadiazolne analoge RSV (spojine ZMP), ki so jih predhodno sintetizirali na katedri za Farmaceutsko kemijo in katerih (anti)androgene vplive na izbrano celično linijo želimo ovrednotiti. Kot modelni sistem za določanje citotoksičnosti in ugotavljanje agonističnega ali antagonističnega delovanja spojin na AR bomo uporabili celično linijo MDA-kb2, ki poleg AR izraža tudi glukokortikoidni receptor (GR).

V prvem delu eksperimentov bomo s pomočjo testa celične proliferacije (test MTS) določili citotoksičnost preiskovanih spojin. V primeru izkazane citotoksičnosti v prvotno izbrani koncentraciji 50 μ M, bomo za nadaljnje teste za vsako izmed testiranih spojin koncentracijo ustrezno znižali in določili njeno ustreznost. V drugem delu magistrske naloge bomo z uporabo presejalnega luciferaznega testa *in vitro*, ki temelji na izražanju genov, določili potencialno agonistično in antagonistično delovanje RSV in njegovih analogov na AR. S temi poskusi bomo poskušali potrditi ali zavrniti naslednje hipoteze:

1. Resveratrol in njegovi analogi ZMP izkazujejo nizko citotoksičnost za celično linijo MDA-kb2.
2. Resveratrol ima učinek na AR.
3. Analogi RSV bodo imeli enake učinke na AR kot RSV.
4. Analogi RSV z vsaj eno zaetreno hidroksilno skupino imajo manjšo aktivnost na AR kot RSV.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

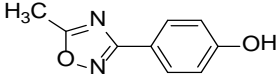
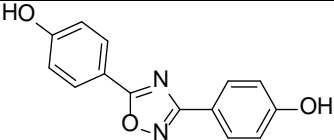
3.1.1 TESTIRANE SPOJINE

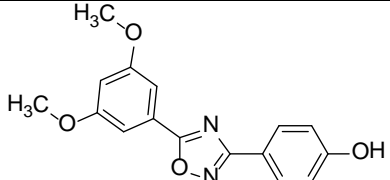
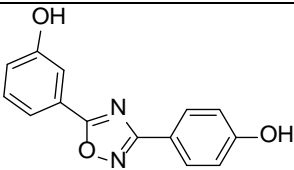
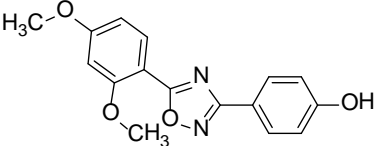
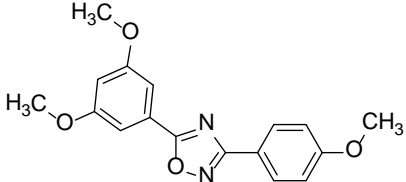
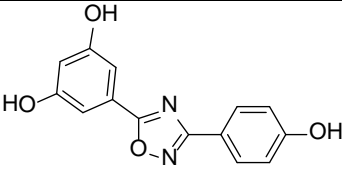
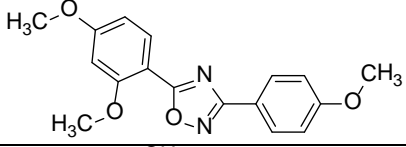
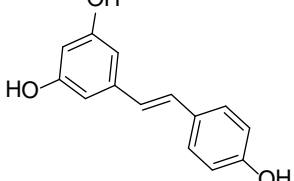
Spojine ZMP so 1,2,4-oksadiazolni analogi resveratrola (*Tabela I*). Zamenjava etilenskega mosta med dvema aromatskima obročema z oksadiazolnim obročem poveča rigidnost spojin. Od RSV se razlikujejo še v poziciji hidroksilnih skupin in zaetrenosti le-teh z metilno skupino.

Preiskovane spojine, katerih učinek na AR nas je zanimal, smo testirali v prvotno izbrani koncentraciji 50 μM , pri treh spojinah pa 25 μM , ker je zaradi njihove slabše topnosti prišlo do obarjanja. Koncentracijo za testiranje smo izbrali na podlagi podatkov o koncentracijah resveratrola, ki so jih običajno uporabili v drugih študijah.

Osnovne raztopine spojin smo pripravili v epicah v 1.000-krat višji koncentraciji (50 mM in 25 mM) od dejansko testiranih, in sicer tako, da smo ustrezni natehti spojine dodali pripadajočo količino topila. To je bilo v našem primeru 99,8 % DMSO (Sigma-Aldrich, MO, ZDA). Pri raztapljanju smo si pomagali z vorteksom in ultrazvočno kadičko. Raztopine testiranih spojin smo nato zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za nadaljnjo uporabo smo raztopine 1.000-krat razredčili z gojitvenim medijem, in sicer na končno koncentracijo 0,2 % DMSO v gojitvenem mediju. Na koncu je vsaka epica vsebovala 0,998 mL gojitvenega medija in 2 μL spojine raztopljene v DMSO. Končne koncentracije spojin v testu so tako bile tako 50 oz. 25 μM .

Tabela I: Strukturni analogi resveratrola in pripadajoče molekulske mase

Ime spojine	Kemijska struktura	Molska masa [g/mol]
ZMP-9		176,17
ZMP-15		254,24

ZMP-17		298,29
ZMP-20		254,24
ZMP-21		298,29
ZMP-23		312,32
ZMP-24		270,24
ZMP-25		312,32
Resveratrol		228,24

3.1.2 CELIČNA LINIJA MDA-kb2

V magistrski nalogi smo kot modelni sistem za določanje citotoksičnosti in ugotavljanje agonističnega ali antagonističnega učinka preiskovanih spojin na AR uporabili stabilno celično linijo MDA-kb2 (ATCC, Nemčija). Pridobljena je bila iz človeških celic raka dojke MDA-MB-453, ki v veliki meri izražajo endogene, funkcionalne AR in GR. Izvirne celice izražajo v majhni meri še ER β , ne pa tudi ER α in PR. Celicam MDA-MB-453 so s stabilno transfekcijo vstavili reporterski vektor MMTV.neo.luc, ki vsebuje na androgene in glukokortikoide odzivno promotorsko zaporedje in reporterski gen za luciferazo. Promotor MMTV je bil izbran za transformacijo zato, ker je močan virusni promotor in je dobro

odziven na androgene. Celična linija MDA-kb2 nam je v pomoč pri opredeljevanju mehanizma delovanja preiskovanih spojin, saj nam omogoča določanje učinkov na obeh receptorjih z razlikovanjem agonističnega in antagonističnega delovanja spojine. Agonisti AR in GR inducirajo izražanje kresničkine luciferaze, za razlikovanje med agonističnim učinkom bodisi na AR ali GR pa spojinam dodamo znan antagonist na AR, kot je npr. flutamid, ki se specifično veže na AR, ne pa tudi na GR. Celična linija ima še številne druge prednosti, kot so: nezahtevno gojenje in vzdrževanje celic, hitra izvedljivost testov z dobro ponovljivostjo, nepotrebnost transfekcije, ustrezna občutljivost testov in stabilna odzivnost celic preko 80 pasaž. Glavni slabosti pa sta nižja specifičnost (odzivnost obeh receptorjev) in daljši čas, da celice dosežejo ustrezno gostoto v gojišču (konfluentnost). Osnovni medij za celično linijo MDA-kb2 je medij ATCC Leibovitz L-15, ki mu dodamo še fetalni goveji serum do končne koncentracije 10 % (50, 51, 52).

3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA

Pri delu smo uporabljali naslednjo opremo:

Tabela II: Seznam uporabljene opreme

Aparatura/materiali	Proizvajalec
analitska tehtnica	Mettler Toledo, Greifensee, Švica
brezprašna komora z laminarnim preto- kom zraka (LAF)	Iskra, Šentjernej, Slovenija
celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,2 μm	Sartorius
centrifuga	Tehtnica, Železniki, Slovenija
centrifugirke (15 mL)	
gojitvena posoda s površino 75 cm ²	TPP, Transadingen, Švica
hemocitometer	Brand, Wertheim, Nemčija
hladilnik/zamrzovalnik	
inkubator MCO-18AIC	Sanyo. USA
invertni svetlobni mikroskop Olympus CKX41	Olympus, Tokyo, Japonska
krioviale	TPP, Transadingen, Švica
mikrotitrne plošče za gojenje celičnih kultur (s 96 vdolbinami):	

- plošče tipa 92096	TPP, Transadingen, Švica
- plošče Microlon Lumitrac 600	Greiner bio-one, Kremsmünster, Avstrija
mikrotitrski čitalec Synergy H4 Hybrid Reader	Bio Tek, USA
multikanalna pipeta	Biohit, Helsinki, Finska
pipete in nastavki za pipete	
računalniška programska oprema Microsoft Excel	
serološka pipeta za enkratno uporabo	TPP, Transadingen, Švica
sistem za filtriranje	Sartorius
vibracijski mešalnik	Biosan, Latvija
zamrzovalnik (-80 °C)	Sanyo, USA

3.1.4 GOJIŠČE

Priprava medija Leibovitz L-15

Tabela III: Sestava medija za celično linijo MDA-kb2

Sestava	Proizvajalec	Količina
medij Leibovitz L-15 v prahu	Sigma-Aldrich, Nemičija	6,7 g
ultraprečiščena voda		500 mL
FBS	Gibco, USA	50 mL
raztopina antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 µg /mL	Sigma-Aldrich, MO, ZDA	5 mL

3.2 METODE DE LA S CELICAMI

3.2.1 PRIPRAVA MEDIJA

Za optimalno rast posameznih celic in njihovo manipulacijo se v sistemih *in vitro* uporabljajo posebni hranilni mediji in ustrezni reagenti. Ključne značilnosti gojišča so ustrezen raven pH in hranil v osnovnem definiranem gojišču. Celice pri svoji rasti porabljajo hranljive snovi v gojišču, kar se opazi v spremembi barve gojišča zaradi spremembe pH. Veči-

na sesalčjih celičnih linij raste pri pH 7,4 in kot indikator se v gojišče dodaja fenol rdeče, ki postaja rumen v kislem ter vijoličen v bazičnem (53).

Za pripravo gojitvenega medija z zeleno sestavo smo uporabili medij L-15 v obliki prahu, ki smo ga natehtali in raztopili v ultraprečiščeni vodi, da smo dobili ustrezno koncentracijo po predpisu, tj. 13,6 g/L. Tako pripravljen medij smo sterilizirali s filtriranjem skozi membranski filter, s premerom por 0,22 μm . Prednost medija L-15 je, da ne zahteva dodatnega CO_2 in NaHCO_3 . Vsebuje soli, esencialne aminokisljine in galaktozo, kar uravnava vrednost pH (54). Gojišču pogosto dodajamo hormone ter rastne dejavnike, antibiotike ter serum. Medij L-15 smo dopolnili z 10 % FBS, ki je toplotno inaktiviran in 1 % (v/v) raztopine penicilin - streptomycin. Serum vsebuje rastne in adhezijske dejavnike, ki imajo antitripsinsko delovanje in spodbujajo adhezijo celic, poleg tega pa še lipide, minerale in hormone. Pripravljen gojitveni medij smo hranili v hladilniku. Pred vsako uporabo pa smo ga segreli v inkubatorju ali na vodni kopeli na 37 °C.

Delo je potekalo v celičnem laboratoriju, natančneje v komori LAF (prostor stopnje čistosti A), ki je nameščena v čistem prostoru (prostor stopnje čistosti C) ter pod aseptičnimi pogoji. Komora z laminarnim pretokom zraka zagotavlja čisto delovno okolje, sterilne pogoje z omejenim dostopom ter stalnim pretokom zraka, ki se filtrira preko filtrov HEPA. Komoro pred uporabo razkužimo, delovne površine pa očistimo s 70-odstotnim etanolom. Pribor za delo in posode za gojenje pobrišemo s krpo, prepojeno z 70-odstotnim etanolom in jih nato vstavimo v komoro. Pri delu pa uporabljamo zaščitno haljo in zaščitne rokavice, ki jih pred uporabo prav tako razkužimo z etanolom.

3.2.2 ODMRZOVANJE CELIC

Celice shranjujemo v obliki suspenzije zamrznjene v krioviali z volumnom 1 mL v tekočem dušiku pri -180 °C, kjer smo shranili okrog 6×10^6 celic. Celice so zamrznjene v zmesi, ki je sestavljena iz 90-odstotkov hranilnega medija in 10-odstotkov DMSO. Slednji ima vlogo krioprotektanta in ščiti celično linijo pred tvorbo ledenih kristalov. Ker je DMSO citotoksičen, ga je pri odtalitvi celic potrebno hitro odstraniti, in sicer s centrifugiranjem. Ko smo vialo s celicami vzeli iz tekočega dušika, smo jo potopili v vodno kopel, ogreto na 37 °C za 2 do 3 minute. Odmrzovanje je moralo potekati hitro, da ne bi prišlo do poškodbe celic. Nato smo odtaljene celice v krioviali prenesli v sterilno komoro, jih odpipetirali v 15 mL centrifugirko in jim dodali 9 mL pripravljenega hranilnega medija, segretega na 37 °C. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 900 obratih/minuto, kar so dovolj mili pogoji, da preprečimo mehanski šok za celice. Supernatant smo odpipetirali in ga zavrgli, celice pa s

pomočjo vibracijskega mešalnika resuspendirali v 5 mL gojitvenega medija. Na koncu smo celično kulturo nasadili v sterilno gojitveno platenko s površino 75 cm² in jih inkubirali v specializiranem inkubatorju, v atmosferskih pogojih pri 37 °C.

3.2.3 GOJENJE CELIČNIH KULTUR

Celično linijo MDA-kb2 smo gojili v mediju Leibovitz z 10 % FBS in 1 % (v/v) raztopine penicilin-streptomycin. Celice gojimo v sterilnih platenkah za gojenje celičnih kultur s 75 cm² rastne površine (T- flasks), v specializiranem inkubatorju pri 37 °C in atmosferskih pogojih, brez dodatka 5 % CO₂. Za doseganje optimalne rasti celic smo gojišče zamenjali na 2 do 3 dni. To smo storili tako, da smo staro gojišče odpipetirali in dodali svež hranilni medij. Na gojilno posodo s 75 cm² površine porabimo približno 10 mL gojitvenega medija.

3.2.4 SUBKULTIVIRANJE CELIČNE LINIJE

Celične linije je potrebno za zagotavljanje ustreznega števila celic subkultivirati še preden dosežejo konfluentnost. Rast celic smo redno spremljali pod svetlobnim mikroskopom in jih presajali v fazi, ko so prerasle 80-odstotkov rastne površine gojilne posode, kar je bilo v povprečju vsak 7. dan. Najprej smo odstranili izrabljeni gojitveni medij in celice sprali s približno 5 mL PBS, ki smo ga tudi odstranili. Namen spiranja celic s PBS je odstranitev seruma FBS, ki deluje kot inhibitor tripsina. Adherentne celice smo nato odlepili od podlage. V ta namen smo uporabili 5 mL 10-krat razredčenega tripsina, tj. encim, ki cepi adhezivske molekule. Postopek tripsinizacije je trajal 4 minute v inkubatorju na 37 °C pri atmosferskih pogojih. Po inkubaciji smo pod mikroskopom preverili, če so celice res odlepljene od dna posode. Vsebinsko gojilnih posod smo s serološko pipeto za enkratno uporabo prenesli v 15 mL centrifugirko in jim dodali 5 mL gojitvenega medija, s katerim smo ustavili delovanje tripsina. Iz suspenzije celic smo odvzeli 80 µL vzorca in celice prešteli. Sledilo je 5 minutno centrifugiranje pri 1.200 obratih/minuto pri sobni temperaturi. Supernatant smo nato s pipeto odstranili in usedlino celic resuspendirali v 5 mL svežega gojitvenega medija. Pomembno je, da smo pred samim presajanjem gojitveni medij, PBS in tripsin segreli na vodni kopeli na približno 37 °C.

3.2.5 ŠTETJE CELIC

Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra pod svetlobnim mikroskopom po vsaki tripsinizaciji. Ta metoda omogoča štetje celic v znanem volumnu in izračunanje koncentracije celic (število celic/mL). Pod sterilnimi pogoji smo s pipeto odvzeli 80 µL celične suspenzije in jo prenesli v epico. Dodali smo enak volumen tripanskega modrila. Tripansko modro

je vitalno barvilo, ki obarva modro samo mrtve celice s poškodovano celično membrano. Žive celice pa se ne obarvajo, saj je njihova membrana nepoškodovana in zato neprepustna za barvilo. Metoda barvanja s tripanskim modrim nam torej omogoča ločevanje in štetje živih in mrtvih celic pod mikroskopom. Zmes celic in barvila smo dobro premešali in 1 μ L homogene suspenzije nanесли na hemocitometer. Pod mikroskopom smo prešteli število živih celic v štirih poljih in izračunali skupno število živih celic v suspenziji po enačbi 1:

$$N = \frac{n}{4} * R * 10^4$$

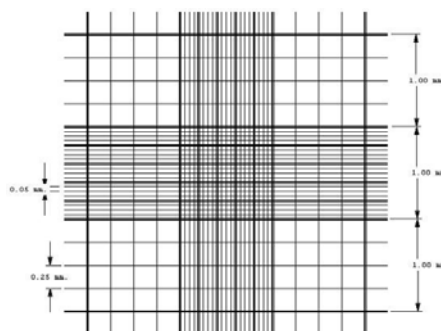
N= skupno število živih celic v 1 mL celične suspenzije

n= število živih celic v štirih kvadratih hemocitometra (A+B+C+D)

R= faktor redčenja zaradi redčitve z gojiščem in mešanja s tripanskim modrim

10^4 = volumen celične suspenzije nad kvadratom (1/mL)

Enačba 1: Računanje koncentracije celic
(55)



Slika 1: Števna Neubauerjeva komora
(55)

3.2.6 NASAJANJE CELIC V KULTURO

Na mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami smo nasadili celice MDA-kb2 v gostoto 10^5 celic/mL. Z avtomatsko multikanalno pipeto smo v vsako vdolbinico prenesli po 100 μ L celične suspenzije in tako dobili gostoto 10^4 celic/vdolbinico. Pred tem smo celice tripsinizirali, prešteli in izračunali koncentracijo celic v 1 mL suspenzije (*postopek je opisan v poglavjih 3.2.4 in 3.2.5*). Izračunali smo še volumen celične suspenzije, ki je vseboval priporočeno število celic za vseh 96 vdolbin. Temu volumnu celic smo dodali potrebno količino gojitvenega medija za ustrezno koncentracijo (10^5 celic/mL). Ploščo smo inkubirali 24 ur (37°C , atmosferski pogoji brez dodatka 5 % CO_2), da so se celice prilepile na podlago.

Za test citotoksičnosti smo uporabili prozorne mikrotitrne plošče tipa 92096, pri luciferaznem testu pa smo celice nasadili na bele plošče MicroLon Lumitrac tipa 600.

3.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Toksičnost je kompleksen dogodek *in vivo*, ki lahko povzroči poškodbo celic, fiziološki učinek, vnetni odziv ali kakršenkoli drug sistemski učinek. Na nivoju *in vitro* je težko opazovati sistemske in fiziološke učinke, zato večina testov temelji na določanju učinkov na nivoju celic oz. na citotoksičnosti (53). Citotoksičnost pomeni strupenost za celice in predstavlja enega glavnih mehanizmov zaščite organizma pred tujimi ter gensko ali virusno spremenjenimi celicami. Izpostavljanje celic citotoksičnim snovem lahko privede do različnih pojavov, in sicer lahko pride do smrti celice (nekroze ali programirane celične smrti-apoptoze) ali do spremembe njenega metabolizma (56). Za apoptozo je značilno, da pride do krčenja citoplazme, kondenzacije jedra, fragmentacije DNK, itd. Apoptotične celice sčasoma preidejo v sekundarno nekrozo. Po daljši inkubaciji jim ugasne presnova, izgubijo integriteto membrane in lizirajo. Celice, ki doživljajo nekrozo, običajno hitro nabreknejo, izgubijo integriteto membrane, upočasnijo presnovo in sproščajo vsebino celice v okolje. Celice, pri katerih pride do hitre nekroze v pogojih *in vitro*, nimajo dovolj časa niti energije za aktivacijo mehanizma apoptoze, zato ne izražajo kazalcev apoptoze. Celice kultivirane *in vitro* so najpogosteje heterogena populacija. Ko so izpostavljene testiranim komponentam, se ne odzovejo vse istočasno, ampak v času nekaj ur ali dni, odvisno od številnih dejavnikov, med drugim mehanizma celične smrti, koncentracije toksina in časa njihove izpostavljenosti. Kot rezultat poskusov večine testov na heterogenih populacijah dobimo povprečje celotne populacije celic (57).

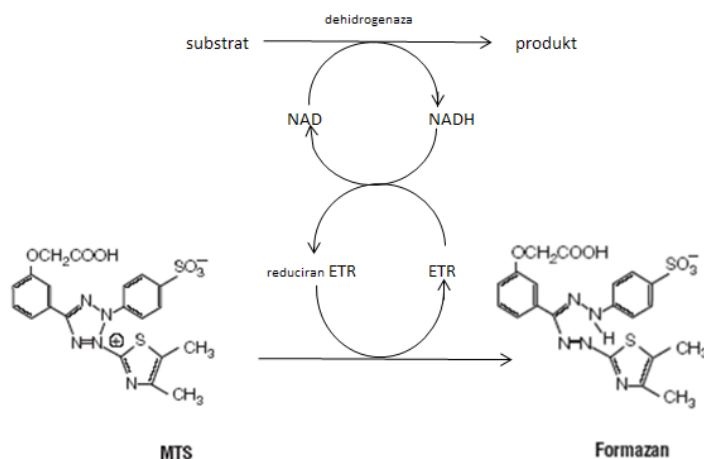
Glede na naravo testa citotoksičnosti ločimo različne preskuse, ki nam omogočijo določiti citotoksične spremembe v celici:

- Test viabilnosti - nanaša se na takojšnji ali kratkotrajni odziv, kot je izguba membranske integritete.
- Test preživetja - dolgotrajna ohranitev obnovitvene kapacitete (5 - 10 generacij ali več).
- Metabolni test - določa spremembe v presnovi (npr. aktivnost dehidrogenaze, sinteze DNA, RNA ali proteinov).
- Inflamatorni test (53).

Najbolj so primerni preskusi, ki jih lahko izvajamo na mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinami. Z njimi lahko hitro in sočasno analiziramo veliko vzorcev, porabimo manj medija, celic in mikrotitrskih plošč. Kolorimetrični testi pa nam omogočajo, da vzorce v mikrotitrskih ploščah ovrednotimo neposredno s spektrofotometrom (57).

3.3.1 TEST MTS

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) je enostavna, natančna in kvantitativna kolorimetrična metoda za določanje celične rasti in razmnoževanja celic ter citotoksičnosti snovi. Test smo opravili s kompletom CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent, katerega osnovna komponenta je 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H - tetrazolijeva sol, ki jo mitohondrijske dehidrogenaze preko mediatorja elektronskega prenosa fenazin etosulfata (PES) reducirajo do formazana. S presnovo v živih celicah se tvorijo reducirajoče molekule, kot sta NADH in NADPH, ki prenesejo svoj elektron na reagent za prenos elektronov (angl. electron transfer reagent; ETR), ta pa nato reducira MTS v obarvan, vodotopen formazan. Količina formazanskega produkta je neposredno proporcionalna številu živih, metabolno aktivnih celic. Razmerje med količino nastalega formazana in številom živih celic je linearno in specifično za posamezno celično linijo. Ob smrti pa celica izgubi zmožnost redukcije tetrazolijevih soli. Regent se doda neposredno v kulturo in celice se inkubirajo 1-4 ure pri 37 °C, nato se izmeri absorbanco pri 490 nm (58).



Slika 2: Shematski prikaz celičnega metabolizma reagenta MTS (Prirejeno po (58))

Preiskovane spojine smo v testu citotoksičnosti začeli testirati v prvotno določeni koncentraciji, tj. 50 μM , istočasno pa še pri 25, 10 in 1 μM , a smo kasneje zaradi obarvanja v

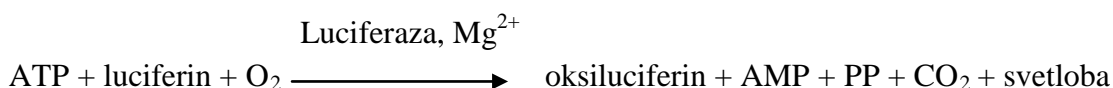
mediju pri večini spojin ZMP test izvedli samo pri koncentracijah 25, 10 in 1 μM . Za negativno kontrolo smo uporabili svež gojitveni medij, raztopina 0,2 % DMSO v gojitvenem mediju pa je služila za kontrolo topila. Prvi dan smo celice tripsinizirali in jih naselili na prozorne mikrotitrne plošče v ustrezni koncentraciji, tj. 10^5 celic/mL oz. 100 μL suspenzije na vdolbinico. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C in atmosferski vrednosti CO_2 smo celicam odstranili gojitveni medij in jim dodali pripravljene raztopine s preiskovanimi spojinami (stimulirane celice) ali kontrolami (nestimulirane celice). Tretji dan smo celice pogledali pod mikroskopom in preverili ali je prišlo do nastanka oborine testiranih spojin. Nato smo v vsako vdolbinico dodali po 10 μL reagenta MTS, celice inkubirali vsaj 3 ure in na koncu s čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader izmerili absorbanco pri 490 nm. Absorbanca raztopine 0,2 % DMSO v gojitvenem mediju predstavlja ozadje in nam služi kot slepa kontrola (brez celic). Kot rezultat smo podali preživetje celic, relativno glede na kontrolo, in sicer smo vrednost absorbanca 0,2 % DMSO v gojitvenem mediju (slepa) odšteli od absorbanca stimuliranih in nestimuliranih celic, nato pa vrednosti normalizirali na 0,2 % DMSO v mediju s celicami.

3.4 DOLOČANJE AKTIVNOSTI RSV IN NJEGOVIH ANALOGOVI NA AR

Androgeni in snovi, ki posnemajo njihovo delovanje, v celici v glavnem delujejo preko vezave na receptorje za steroidne hormone, ki delujejo kot transkripcijski dejavniki. Temu sledi vezava koaktivatorjev in transkripcijskega kompleksa ter prepis genov, kar se izrazi v sintezi specifičnih proteinov, odgovornih za njihove fiziološke učinke (5).

Testi *in vitro* temeljijo na izražanju genov in vključujejo gensko spremenjene celice sesalcev ali gensko spremenjene kvasovke. Omogočajo nam posredno določanje aktivnosti spojine glede na ustrezno kontrolo. Celice MDA-kb2 so gensko spremenjene tako, da imajo v jedru reporterski gen, ki kodira encim luciferazo. To zaporedje je pod kontrolo promotorskega zaporedja, na katero se veže AR v obliki transkripcijskega kompleksa. Tako pride ob vezavi AR-ligand do izražanja luciferaze, ki je pokazatelj biološke aktivnosti testiranih spojin (50, 59). Z dodatkom substrata luciferina poteče reakcija z luciferazo, kar zaznamo kot oddajanje svetlobe. Za proces bioluminiscence je potrebna velika količina energije, ki jo organizmi dobijo večinoma s porabo energijsko bogatih molekul (ATP). Encim s pomočjo ATP in magnezijevega iona katalizira oksidacijo luciferina do peroksidne oblike luciferil adenilatnega kompleksa, ki nato ciklizira in pri odcepu adenozin monofosfata (AMP) nastane oksiluciferin, ki oddaja svetlobo (60).

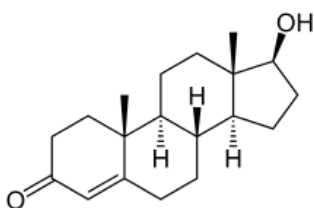
Bioluminiscenčna reakcija:



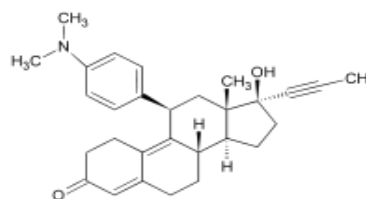
Preiskovane spojine zaradi obarjanja v mediju ali citotoksičnosti nismo testirali v prvotno določeni koncentraciji, tj. 50 μM , ampak v ustrezno nižji, tj. 25 ali 10 μM . Raztopina 0,2 % DMSO v gojitvenem mediju nam je služila za kontrolo topila, gojitveni medij pa kot negativna kontrola. Prvi dan smo celice tripsinizirali in jih nasadili v bele mikrotitrne plošče v ustrezni koncentraciji, tj. 10^5 celic/mL (100 μL na vdolbinico). Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C in atmosferski vrednosti CO_2 smo celicam odstranili gojitveni medij in jim dodali raztopine s preiskovanimi spojinami ali kontrolami.

Pri receptorsko neselektivnem testu agonističnega delovanja smo celicam dodali 50 μL preiskovane spojine in enak volumen 0,2 % raztopine DMSO. Spojine lahko delujejo agonistično na oba receptorja, AR in GR, zato je potrebno ločiti katere od njih delujejo agonistično na AR in katere na GR. Pri neselektivnem določanju agonističnega učinka na AR in GR smo za pozitivno kontrolo uporabili 0,1 in 0,01 nM DHT, ki je agonist na AR ter 10 in 100 nM HC, ki je agonist GR.

Test agonističnega delovanja na AR: najprej smo dodali 50 μL 100 nM raztopine RU-486, ki je antagonist GR. Inkubirali smo 30 minut in nato dodali še 50 μL 2-krat koncentrirane raztopine preiskovane spojine. Končni volumen v posamezni vdolbinici mikrotitrne ploščice je bil tako 100 μL , da smo dobili ustrezno koncentracijo preiskovane spojine. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 0,1 nM DHT v 0,2 % raztopini DMSO v gojitvenem mediju.



Slika 3: Kemijska struktura dihidrotestosterona (61)



Slika 4: Kemijska struktura mifepristona (RU-486) (62)

Test antagonističnega delovanja na AR: najprej smo dodali 50 μL 2-krat koncentrirane preiskovane spojine, inkubirali 30 minut in nato dodali še 50 μL 2-krat koncentrirane raztopine DHT, ki je agonist na AR. Končni volumen v posamezni vdolbinici mikrotitrne ploščice je bil tako 100 μL , da smo dobili ustrezno koncentracijo preiskovane spojine in

DHT (0,5 nM - EC50 za celično linijo MDA-kb2). Antagonistično aktivnost preiskovane spojine smo določili glede na njeno sposobnost zmanjšanja aktivnosti luciferaze, spodbujene z DHT. Za pozitivno kontrolo smo uporabili antagonist AR, tj. 5 μ M FLUT v 0,2 % raztopini DMSO v gojitvenem mediju.

Sledila je 24-urna inkubacija v inkubatorju pri 37 °C in atmosferski vrednosti CO₂. Tretji dan smo z multikanalno pipeto odpipetirali medij iz vdolbin mikrotitrne plošče in morebiten zaostanek odstranili s spiranjem s 100 μ L PBS. Slednjega smo prav tako odstranili in v vsako vdolbino dodali po 20 μ L 5-krat razredčenega pufra Reporter Lysis 5X Buffer (Promega, Madison, WI, ZDA), ki lizira celične membrane. Za mehansko razbitje celične membrane smo uporabili postopek zamrzovanja/odtavanja, pri čemer smo celice za 30 minut zamrznili na -70 °C, jih hitro odtalili in jih ponovno zamrznili za 1 uro. Na koncu smo jih še ogreli na sobno temperaturo. Po razbitju celic z mehanskimi metodami celične membrane popolnoma razpadejo in ves znotrajcelični material se sprosti. Na koncu dodamo še 35 μ L luciferaznega reagenta Luciferase Assay Buffer z luciferinom Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI, ZDA) in takoj pomerimo luminiscenco v čitalcu mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader. Relativno biološko aktivnost spojin podamo kot razmerje med izmerjeno intenziteto signala luciferaze po stimulaciji celic s preiskovano spojino in izmerjeno intenziteto signala luciferaze po stimulaciji celic s kontrolo (0,2 % DMSO - agonizem, 0,5 nM DHT v 0,2 % DMSO - antagonizem).

3.5 STATISTIČNO OVREDNOTENJE PODATKOV

Rezultate smo statistično obdelali s programom Microsoft Office Excel 2007 in jih prikazali kot srednje vrednosti meritev vsaj treh neodvisnih bioloških ponovitev. Vsakič smo kontrolo in preiskovano spojino v določeni koncentraciji testirali v duplikatu. Za grafični prikaz podatkov smo rezultate meritev normalizirali glede na kontrolo, tj. netretiran vzorec, za katerega smo predpostavili vrednost 1. Za določitev variabilnosti oziroma razpršenosti smo normaliziranim srednjim vrednostim neodvisnih bioloških ponovitev določili standardne deviacije. Za računanje statističnih razlik med preiskovanimi spojinami in kontrolo (netretiranim vzorcem) pa smo uporabili Studentov t-test (dvodelna porazdelitev in neenako varianco). Razlika med parametri, ki jih primerjamo, je statistično značilna oz. signifikantna, kadar je verjetnost, da sta vzorec in kontrola enaka, manjša od 5 %. Za grafični prikaz smo s Studentovim t-testom iz primerjave normaliziranih vzorčnih vrednosti s kontrolo določili tudi stopnjo značilnosti pri $p = 0,01$ in $p = 0,001$, ki nam pove, da je verjetnost, da sta vzorec in kontrola enaka, manjša od 1 oz. 0,1 %. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

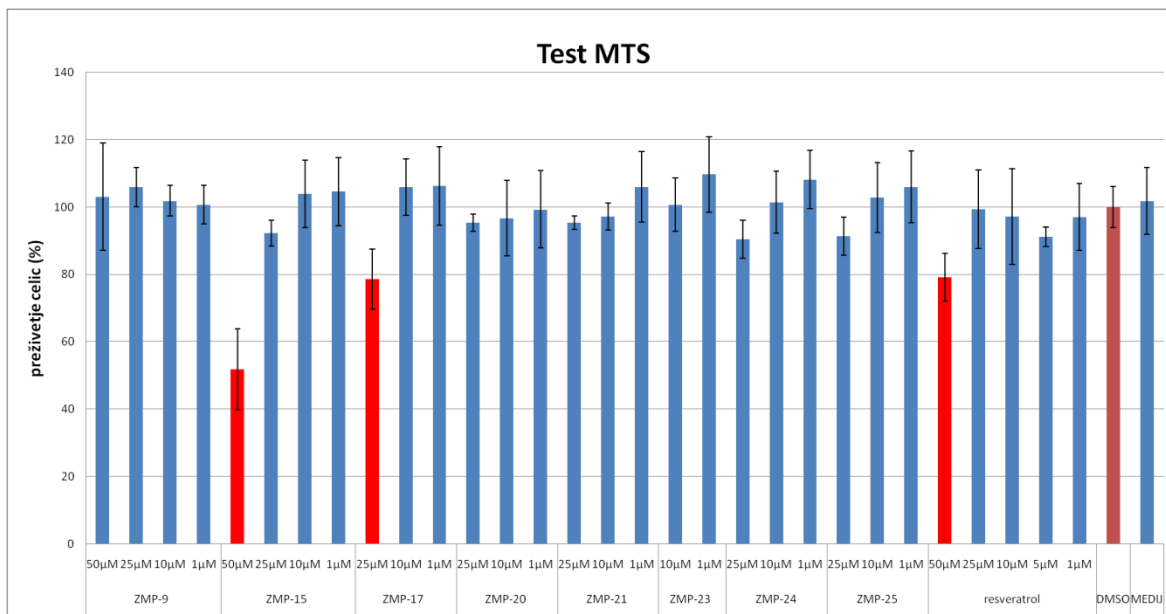
4.1 DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI

V prvem delu magistrske naloge smo ugotavljali citotoksičnost RSV in njegovih oksadiazolnih analogov na humani celični liniji MDA-kb2 po 24-urni inkubaciji. Za določanje viabilnosti celic smo uporabili test MTS po postopku, ki je opisan v poglavju Materiali in metode 3.3.1. Namen preskusa je bil določiti ustrezno koncentracijo posamezne preiskovane spojine za nadaljnje testiranje določanja njene aktivnosti na AR. Na podlagi rezultatov preskusa smo za posamezno testirano spojino določili ustrezno koncentracijo, pri kateri ni prišlo do nastanka oborine v gojitvenem mediju in/ali pri kateri preživetje stimuliranih celic ni bilo manjše od 80 %, glede na kontrolo, to je t.i. minimalna sprejemljiva presnovna aktivnost celic. Natančno število metabolno aktivnih (živih) celic smo določili s spektrofotometričnim merjenjem količine formazanskega produkta, ki nastane z encimsko pretvorbo v živih celicah po dodatku tetrazolijeve soli (reagenta MTS). Pri tem je število preživelih celic neposredno sorazmerno količini formazana, ki je v linearni odvisnosti z izmerjeno vrednostjo absorbance. Rezultate meritev smo statistično obdelali s pomočjo programa Microsoft Excela, končni rezultat pa podali kot odstotek preživelih celic po tretiranju s preiskovano spojino glede na kontrolo \pm SD, kar prikazuje Slika 5. Natančen postopek izračuna nivoja citotoksičnosti je opisan v poglavju Materiali in metode 3.3.1.

Spojine ZMP smo testirali pri prvotno določeni koncentraciji, tj. 50 μ mol/L, a smo zaradi obarjanja pri večini spojin koncentracijo znižali. Do procesa obarjanja prihaja zaradi slabe topnosti preiskovane spojine pri določeni koncentraciji in posledične prenasičenosti v raztopini, kar opazimo pod mikroskopom kot nastanek kristalov. Spojini ZMP-9 in ZMP-15 smo testirali pri koncentracijah 50, 25, 10 in 1 μ M; spojine ZMP-17, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24 in ZMP-25 pri koncentracijah 25, 10 in 1 μ M, spojino ZMP-23 pri 10 in 1 μ M ter RSV pri koncentracijah 50, 25, 10, 5 in 1 μ M. Z uporabo kontrol, to je 0,2 % raztopine DMSO v gojitvenem mediju, ki služi kot kontrola topila in gojitvenega medija kot negativna kontrola, smo izključili učinek topila pri koncentraciji 0,2 % DMSO.

O citotoksičnosti posamezne spojine pri določeni koncentraciji smo lahko vizualno sklepali glede na obarvanost vsebine vdolbinic mikrotitrskih plošč. Kadar pride do redukcije tetrazolijeve soli do netopnega formazana (pokazatelj metabolno aktivnih celic), se obarvanost raztopine vzorca pretvori iz rumene v vijolično. Več kot je živih celic v vdolbinici, bolj intenzivno je raztopina v vdolbinici obarvana vijolično. Po drugi strani pa se verjetnost, da

celice niso preživele oz. jih je preživel le okrog 20 %, kaže v podobnem obarvanju raztopine vzorca, kot ga vidimo pri negativni kontroli.



Slika 5: Graf prikazuje preživetja celic MDA-kb2 v odstotkih \pm SD po njihovi 24-stimulaciji s preiskovanimi spojinami pri določenih koncentracijah. Rezultati so podani kot vrednosti treh neodvisnih bioloških ponovitev, v primerjavi s kontrolnimi netretiranimi celicami.

Iz grafičnega prikaza (Slika 5) vidimo, da večina testiranih spojin ne izkazuje citotoksičnosti, saj je delež živih celic po 24-urni izpostavljenosti njihovim različnim koncentracijam nad minimalno sprejemljivo presnovno aktivnostjo celic, tj. 80-odstotnim preživetjem celic. Rezultati testa MTS so pokazali, da upad števila metabolno aktivnih celic MDA-kb2 povzročajo spojina ZMP-17 pri koncentraciji 25 μ M ter ZMP-15 in RSV pri koncentraciji 50 μ M. Citotoksičnost je po 24-urni inkubaciji najbolj izražena pri analogu ZMP-15, in sicer je pri koncentraciji 50 μ M preživel le okrog 50 % celic. V istem koncentracijskem območju je inducirala citotoksične učinke tudi RSV; delež živih celic normaliziran glede na DMSO v gojitvenem mediju (100-odstotno preživetje) je bil 79,1 %. Zanimivo je, da takokot pri RSV opazimo enak trend znižanja preživelosti celic tudi pri spojini ZMP-17, kjer je bila celična viabilnost 78,6-odstotna, vendar v tem primeru pri koncentraciji 25 μ M. Vse spojine smo testirali tudi pri koncentracijah 10 in 1 μ M, ki pa se za nobeno nista izkazali kot toksični za celice. Preživelost celične linije MDA-kb2 je bila pri najnižji testirani koncentraciji 1 μ M najnižja pri RSV (97,1 %) in najvišja pri analogu ZMP-23 (109,7 %). Za

primerjavo je bila preživelost pri koncentraciji 10 μ M prav tako najnižja pri RSV (86,2 %) in najvišja pri ZMP-17 (105,9 %).

Na podlagi rezultatov testa MTS lahko sklepamo, da strukturni analogi ZMP na izbrani celični liniji izkazujejo podobno citotoksičnost kot RSV, z izjemo spojine ZMP-17, ki je pri koncentraciji 25 μ M znižala preživetje celične linije v podobnem obsegu kot RSV v koncentraciji 50 μ M. V nadaljevanju smo za vsako testirano spojino izbrali najvišjo koncentracijo, pri kateri nismo opazili obarjanja, preživetje celic MDA-kb2 pa je bilo večje od 80 % ter jo uporabili za test določanja agonističnega oz. antagonističnega delovanja na AR. Tako smo za testiranje aktivnosti na AR za spojine ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 in RSV izbrali koncentracijo 25 μ M, za spojini ZMP-17 in ZMP-23 pa 10 μ M.

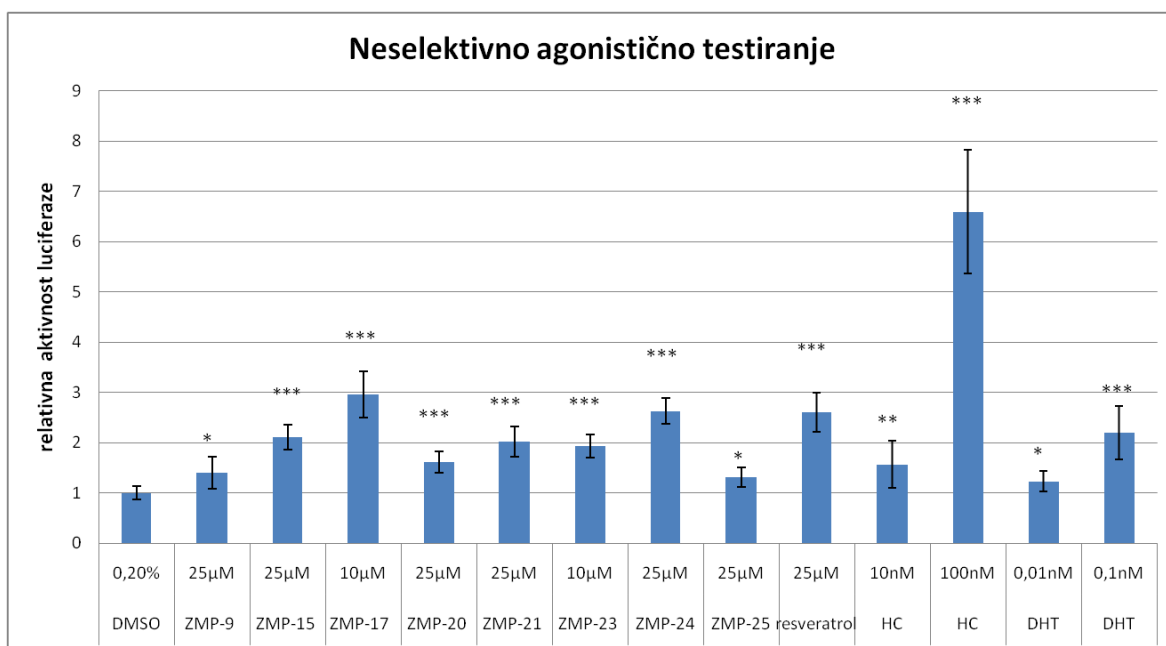
4.2 DOLOČANJE AKTIVNOSTI RSV IN NJEGOVIH ANALOGOEV NA AR

4.2.1 DOLOČANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA NA AR

V drugem delu magistrske naloge smo določili potencialno agonistično ali antagonistično delovanje RSV in njegovih strukturnih analogov na AR, za celično linijo MDA-kb2, ki v veliki meri izraža tako AR kot tudi GR. Z receptorsko neselektivnim testom agonističnega delovanja smo preiskovane spojine najprej testirali samo v 0,2 % DMSO v gojitvenem mediju in na ta način ugotovili, ali pride do povečane ekspresije luciferaze, ki je lahko posledica interakcije spojin z obema receptorjema. V primeru, da je testirana spojina agonist, se veže na receptor, ki se v obliki transkripcijskega kompleksa veže na specifično odzivni element v promotorskem zaporedju DNA. Posledica tega je povečano izražanje reporterkega gena za encim luciferazo, ki je v našem preskusu posredni pokazatelj za biološko aktivnost preiskovanih spojin.

Ugotovili smo, da vse spojine statistično značilno povečajo aktivnost luciferaze glede na kontrolo (0,2 % DMSO v mediju) in na ta način izkazujejo potencialno agonistično delovanje na GR ali AR ali na oba hkrati. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili znana agonista na GR in AR, tj. HC in DHT. Na diagramu na Sliki 6 vidimo, da je aktivnost luciferaze v primerjavi s kontrolo (relativna aktivnost=1) najbolj povečala spojina ZMP-17, pri koncentraciji 10 μ M, in sicer za 1,96-krat. V podobnem obsegu sta pri koncentraciji 25 μ M encimski odziv povečala še spojini ZMP-24 (1,62-krat) in RSV (1,61-krat). Najmanj pa so aktivnost luciferaze inducirale spojine ZMP-25 (0,31-krat), ZMP-9 (0,4-krat) in ZMP-20 (0,62-krat), vse pri koncentraciji 25 μ M. Ostali analogi ZMP so pri testirani koncentraciji

(ZMP-15 in ZMP-21 pri 25 μ M ter ZMP-23 pri 10 μ M) aktivnost luciferaze povečali za približno enkratno vrednost, glede na kontrolo.

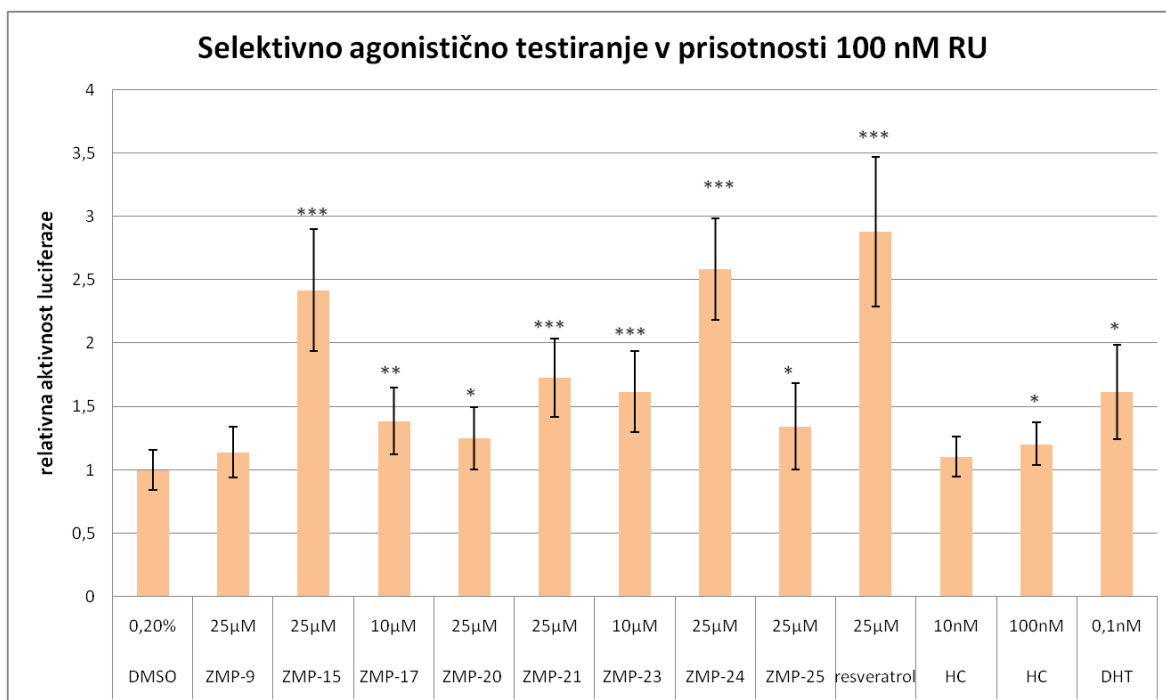


Slika 6: Graf prikazuje agonistično delovanje RSV in njegovih strukturnih analogov na AR in GR, kot relativno vrednost luciferaze \pm SD. Rezultati so podani v obliki srednjih vrednosti meritev iz vsaj treh neodvisnih bioloških ponovitev, v primerjavi s kontrolo (0,2 % DMSO). * predstavlja statistično značilno odstopanje od kontrole (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

Iz rezultatov neselektivnega testa luciferaze ne moremo sklepati, na kateri receptor preiskovane spojine delujejo potencialno agonistično. Zato smo za namen razlikovanje androgenih od glukokortikoidnih učinkov celice izpostavili antagonistu RU-486 (100 nM), ki specifično zasede GR, ne pa tudi AR. Po polurni inkubaciji smo celice stimulirali s preiskovanimi spojinami. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 0,1 nM DHT v 0,2 % raztopini DMSO v gojitvenem mediju, ki nam služi za preverjanje odzivnosti testa. Takšen odmerek DHT je v eni izmed raziskav na celični liniji MDA-kb2 pokazal začetek linearnega odziva na DHT v odvisnosti od koncentracije, zato je ta koncentracija običajno izbrana za določanje aktivnosti na izbranem testnem sistemu (50).

Po izpostavitvi celic preiskovanim spojinam v izbranih koncentracijah smo opazili statistično značilno povečanje aktivnosti luciferaze v primerjavi s kontrolo pri RSV in vseh analogih ZMP, razen pri ZMP-9, kjer je prišlo do nesignifikantnega vpliva na AR (Slika 7). Slednji je izkazoval statistično značilno nižjo agonistično delovanje že v receptorsko neselektivnem testu. Razlog zato lahko pripišemo slabši občutljivosti izbranega celičnega sistema na testirano koncentracijo spojine ZMP-9 ali pa je v tem primeru ključnega pomena

za vezavo na AR aromatski obroč A, ki ga ta analog nima. Osnovna razlika med RSV in njegovimi strukturnimi analogi je v zamenjavi centralnega etilenskega mosta (*kemijske strukture preiskovanih spojin so prikazane v Tabeli I*). Spojina ZMP-24, ki je v strukturnih elementih najbolj podobna RSV, izzove aktivnost luciferaze v približno enakem obsegu kot RSV. Od slednjega se razlikuje le v oksadiazolnem distančniku. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da je rigidni 1,2,4-oksadiazolni obroč ustrezna zamenjava dvojne C=C vezi, saj učinkovito ohranja učinek RSV na AR.



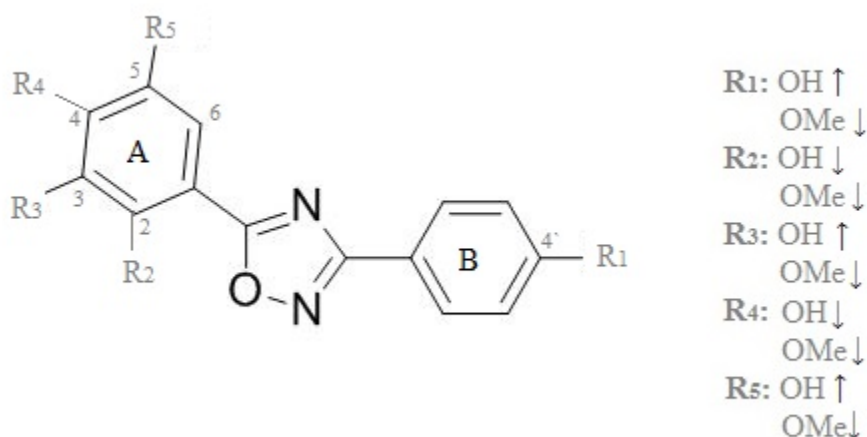
Slika 7: Graf prikazuje agonistično delovanje RSV in njegovih strukturnih analogov na AR, kot relativno vrednost luciferaze \pm SD. Rezultati so podani v obliki srednjih vrednosti meritev iz vsaj treh neodvisnih bioloških ponovitev, v primerjavi s kontrolo (0,2 % DMSO). * predstavlja statistično značilno odstopanje od kontrole (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

Izražanje luciferaze so statistično značilno najbolj povečale spojine RSV (2,9-krat), ZMP-24 (2,6-krat) in ZMP-15 (2,4-krat). Iz primerjave njihovih kemijskih struktur vidimo, da imajo vse nezaetrene hidroksilne skupine. Nesubstituirane skupine OH ima tudi spojina ZMP-20, ki pa je v primerjavi z ZMP-24 in RSV povzročila manjšo aktivnost luciferaze. Morebiti je manjša jakost luciferaze in šibkejše androgeno delovanje povezano z manjkačo hidroksilno skupino na mestu 5. Razliko v jakosti odziva luciferaze opazimo tudi pri primerjavi analogov ZMP-15 in ZMP-20, ki imata v molekuli različno razporeditev funkcionalnih skupin. Tako je zamenjava položaja substituenta v strukturi spojine ZMP-15, ki ima na aromatskem obroču A hidroksilno skupino na mestu 4, povzročila povečan odziv

luciferaze. Iz razlik v jakosti odziva v obliki ekspresije luciferaze ter glede na število in pozicijo hidroksilnih skupin lahko sklepamo, da so te pomembne za androgeno aktivnost, saj omogočajo stabilno interakcijo z AR preko vodikovih vezi. Ohranjeni OH skupini na meta mestu sta verjetno idealni za umestitev spojine v aktivno mesto receptorja, saj že odstranitev ene vodi v zmanjšanje aktivnosti luciferaze, ki je posredni pokazatelj androgenega delovanja. Med drugim lahko iz primerjave jakosti odziva spojine ZMP-15, glede na ZMP-24 in RSV predvidevamo, da je verjetno skupina OH na para mestu dober približek obeh OH substituentov na meta poziciji in omogoča dovolj močno vezavo z aktivnim mestom AR, kar je potrebno za biološko delovanje. Na podlagi rezultatov modela CoMFA (Comparative molecular field analysis) in določitve kristalne strukture domene AR, ki veže ligand, so ugotovili, da je za prepisovanje genov potrebna vezava liganda v hidrofobni žep LBD. Posebnega pomena pri interakciji z receptorjem so strukturni elementi liganda. Za vezavo v aktivno mesto AR mora spojina vsebovati funkcionalne skupine, ki so sposobne tvorbe H-vezi in elektrostatske interakcije na poziciji, ki ustreza 3-keto skupini in 17β -OH skupini DHT. Da se spojina prilega vezavnemu mestu je potrebna ustrezna razdalja med funkcionalnima skupinama, ki mora biti v bližini 10 \AA . Po vezavi liganda v kompleks ligand-AR, ta zavzame transkripcijsko aktivno konformacijo, ki omogoča vezavo koaktivatorjev na AF-2 in interakcijo med N in C terminalnima domenama. To sproži transkripcijo, kar pomeni, da spojina deluje agonistično. Kadar pa je dolžina osi med funkcionalnima skupinama manj ali več kot 10 \AA , pri sidranju spojine v aktivno mesto ne pride do nastanka H-vezi in/ali elektrostatskih interakcij z LBD, kar preprečuje ustrezen položaj receptorja za vezavo koaktivatorjev in dopušča vezavo korepresorjev. Na ta način delujejo tudi spojine s substituenti, ki štrlijo iz LBD AR in s substituenti, ki se pojavijo na prostorsko neugodni površini receptorja (sterično oviranje). To pomeni, da take spojine nimajo androgenega delovanja in so antagonisti AR (63).

Iz grafa na Sliki 7 in glede na primerjavo kemijskih struktur preiskovanih spojin lahko zaključimo, da metilacija hidroksilnih skupin (ZMP-24 in RSV glede na ZMP-17, ZMP-21, ZMP-23 in ZMP-25) zmanjša jakost delovanja na AR. Med naštetimi analogi je izražanje luciferaze najmanj povečala spojina ZMP-25. Ta ima v svoji strukturi neustrezno pozicijo substituentov in vse funkcionalne skupine OH zaetrene. Sklepamo lahko, da so poleg vodikovih vezi, ki so pomembne za interakcijo z AR, ključnega pomena za delovanje spojin tudi sterične ovire, saj poleg rigidnega centralnega dela, metoksi skupina na mestu 2 pri omenjenem analogu še dodatno zmanjša fleksibilnost in rotacijo spojine v prostoru. To pa

je eden izmed možnih razlogov za zmanjšano interakcijo spojine z vezavnim mestom receptorja. Med drugim metoksi skupina na mestu 4` pri spojini ZMP-23, v primerjavi z ZMP-17, povzroči povečanje aktivnosti luciferaze, medtem ko pri analogu ZMP-25 glede na ZMP-21 pa takega trenda ne opazimo. Prav tako spremenjena pozicija metoksi skupin na aromatskem obroču A zmanjša odziv luciferaze pri spojini ZMP-25, glede na ZMP-23, ne pa tudi pri ZMP-21, glede na ZMP-17, pri čemer sta bili spojini ZMP-17 in ZMP-23 testirani pri koncentraciji 10 μ M, ostali dve pa pri 25 μ M. Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo zagotovo trditi, da zaetrenost skupine OH na mestu 4` v primerjavi z enako substitucijo na obroču A, vpliva na jakost odziva, niti, da imajo substituenti na poziciji 3 in 5, glede na položaja 2 in 4 večji potencial za androgeno delovanje. V ta namen bi bilo potrebno vse preiskovane spojine testirati pri enaki koncentraciji. Po drugi strani pa je iz grafičnega prikaza razvidno, da so razlike v jakosti odziva luciferaze pri spojinah, ki imajo metoksi skupine, majhne in so lahko posledica odzivnosti biološkega sistema pri eksperimentalnem delu. Iz primerjave povezave med strukturo in delovanjem preiskovanih spojin na AR lahko povzamemo, da je za androgeno delovanje na izbrani celični liniji ključna prisotnost hidroksilnih skupin na aromatskem obroču. Medtem ko na podlagi naših rezultatov o vplivu razporeditve funkcionalnih skupin in njihovi zaetrenosti na jakost delovanja ne moremo sklepati.



Slika 8: Shematski prikaz odnosa med strukturo in delovanjem za oksadiazolne analoge RSV. R₁₋₅: substitucija z različnimi funkcionalnimi skupinami na posameznem mestu v obroču. \uparrow = povečano izražanje aktivnosti luciferaze, \downarrow = zmanjšano izražanje luciferaze

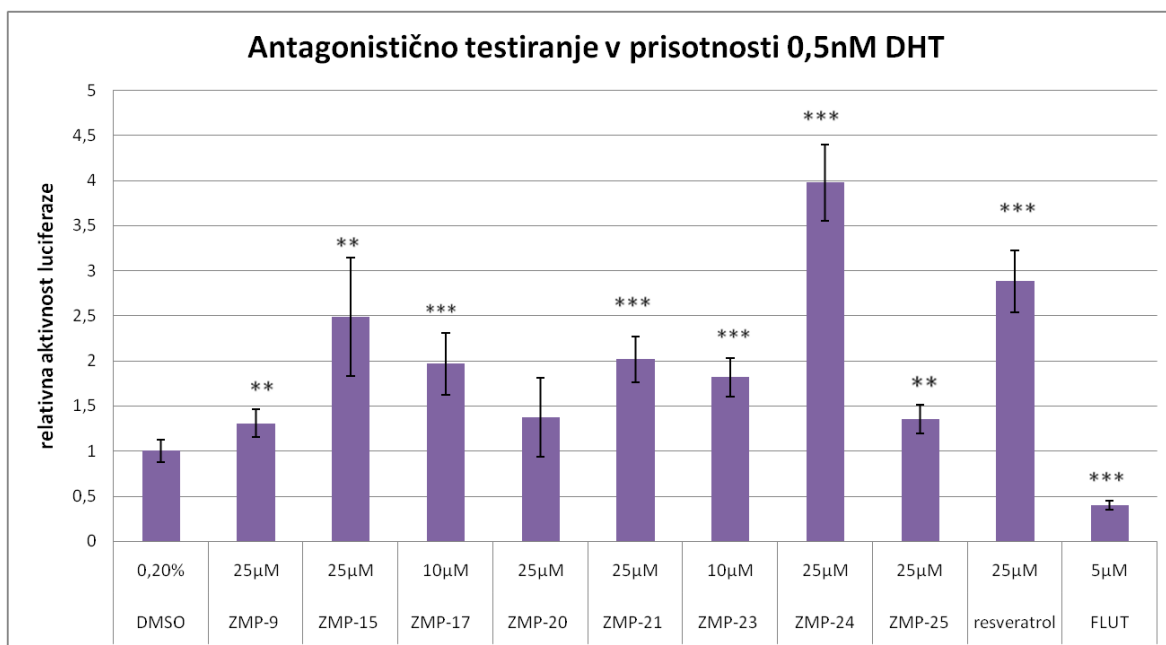
Ljudje smo izpostavljeni RSV z uživanjem hrane in pijače ali prehranskih dopolnil. Kot smo omenili v uvodu, je eden izmed bogatejših virov naravno prisotnega RSV grozdje in rdeče vino. Tako naj bi po zaužitju enega do dveh kozarcev rdečega vina v telo vnesli približno 10-20 μM RSV, medtem ko prehranska dopolnila vsebujejo v povprečju med 50 in 325 mg trans-RSV, nekatera pa tudi do 500 mg (34, 42). Rezultati študij kažejo, da v plazmi po peroralnem odmerku 25 mg izmerimo prosti, nekonjugiran RSV le v sledeh, do 5 ng/mL (24). Tako znaša serumska koncentracija nespremenjenega RSV pri običajnem odmerku 250 mg v obliki kapsule do največ 50 ng/mL, kar je enako 0,22 μM . Torej so preiskovane spojine v naši raziskavi dosegle šibko agonistično delovanje na AR pri 100-krat višji koncentraciji kot jih normalno izmerijo v bioloških vzorcih ljudi. Da bi ugotovili, ali odmerki RSV, ki smo jim ljudje v povprečju izpostavljeni, v organizmu dosegajo statistično značilne učinke na androgeni sistem, bi bilo potrebno izvesti dodatne teste v območju teh koncentracij. Na osnovi podatkov o farmakološki varnosti in toksičnih učinkih, RSV ne kaže posebnega tveganja za človeka, saj pri odmerku do 5 g/dan peroralno ne povzroča resnih neželenih učinkov. V glavnem se pojavijo le nekateri blagi neželeni učinki, najpogosteje povezani z gastrointestinalnimi motnjami (36, 37).

4.2.2 DOLOČANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA NA AR

Antiandrogeni so steroidni ali nesteroidni blokatorji androgenskih receptorjev, ki tekmujejo z endogenimi hormoni za vezavo na AR ali pa so inhibitorji biosinteze androgenov (inhibitorji 5α -reduktaze). Antagonistični učinek testiranih spojin smo ugotavljali glede na obseg zmanjšanja aktivnosti luciferaze, spodbujene z 0,5 nM DHT, ki je znan agonist AR. Le-tega smo dodali po 30-minutni inkubaciji celic s preiskovanimi spojinami. Pozitivno kontrolo antagonističnega delovanja v testnem sistemu pa predstavlja FLUT, ki statistično značilno zmanjša z DHT spodbujeno aktivnost luciferaze, glede na kontrolo.

Na Sliki 8 vidimo, da RSV in njegovi strukturni analogi nimajo antagonističnega delovanja na AR. Spojine so v prisotnosti agonista v večji meri celo statistično značilno povečale aktivnost luciferaze glede na kontrolo, in sicer v podobnem trendu kot pri testu agonističnega delovanja. Poleg spreminjanja signalizacije AR je možno, da RSV deluje tudi preko drugih mehanizmov, in sicer posredno preko ne-jedrnih receptorjev in encimskih poti, ki so vključene v sintezo steroidov (11). Lahko pa deluje tudi na farmakokinetičnem nivoju, kjer inhibira presnovo naravnih hormonov (9). Ker presnovne spremembe potekajo v pogojih *in vivo*, najpogosteje v jetrih in gastrointestinalnem traktu, slednje za naš testni sistem ne vel-

ja, saj smo spojine testirali v pogojih *in vitro*. Možno je tudi, da RSV povečuje ekspresijo receptorjev, njihovo sintezo oz. razgradnjo, sintezo endogenih antagonistov ali pa da deluje kot alosterični modulator. Podobno o drugih mehanizmih delovanja RSV poročajo tudi novejšje študije, ki navajajo zaviralni vpliv RSV na transkripcijske koregulatorje, možnost inhibicije dimerizacije AR ali vezave AR na DNA (44, 47, 48).



Slika 9: Graf prikazuje antagonistično delovanje RSV in njegovih strukturnih analogov na AR prikazano v obliki relativnih vrednosti luciferaze \pm SD. Rezultati so podani kot srednje vrednosti meritev iz vsaj treh neodvisnih bioloških ponovitev, v primerjavi s kontrolo (0,2 % DMSO). * predstavlja statistično značilno odstopanje od kontrole (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

Glede na do zdaj objavljene študije o delovanju RSV na AR bi pričakovali, da bo RSV izkazoval potencialno antagonistično delovanje na AR. Tako je RSV v študijah opravljenih na človeški celični liniji hormonsko-odvisnega raka prostate LNCaP pri koncentracijah 50 μ M ali več ustavil z 10 nM DHT aktivirano izražanje reporterskega gena za luciferazo. V eni izmed študij pa je zmanjšal delovanje AR že pri koncentracijah večjih od 5 μ M. Do rahlega, a ne bistvenega zvišanja aktivnosti AR je prišlo le pri nižji (1 μ M) koncentraciji (43). Prav tako so supresivni učinek RSV na regulacijo AR ugotovili tudi v pogojih *in vivo* (44, 45). Ena od možnih razlag je, da so celice različno občutljive na RSV. Tako lahko testirana spojina pri enaki koncentraciji na eni celični liniji deluje agonistično, na drugi toksično ali pa do merljivega odziva sploh ne pride. Do razlik v odzivu lahko prihaja tudi zaradi različne afinitete liganda do receptorja ali različnih testiranih koncentracij. To pomeni, da lahko spojina v določenem koncentracijskem območju deluje agonistično, pri

višjih odmerkih pa ima antiandrogeni učinek in obratno. Takšen primer je npr. hidroksiflutamid, ki se je v študiji na celicah MDA-kb2, v prisotnosti 0,1 nM DHT, izkazal kot učinkovit antagonist AR, in sicer do odmerka 10 μ M, pri višjih odmerkih pa je inducirala aktivnost luciferaze (50). O delovanju strukturnih analogov ZMP na AR ni na voljo nobenih podatkov, so pa dostopne informacije o analogih, ki so strukturno podobni RSV in se od njega razlikujejo v številu hidroksilnih skupin in njihovi zaetrenosti. Ugotovili so, da sprememba hidroksilne skupine na poziciji 3 in/ali 5 ali njuna odstranitev zmanjša antiandrogeno aktivnost, medtem ko odstranitev 4` skupine OH ali njeno zaetrenje z metilno skupino povečata antagonistično delovanje na AR. Analoge so v tej študiji testirali pri koncentraciji 10 μ M in manj (49). Glede na podobnost v strukturi z analogi, ki so predmet naše raziskave (razlika je v oksadiazolnem obroču), bi pričakovali, da bodo analogi ZMP podobno izkazovali antiandrogeni učinek. Najverjetneje lahko vzroke prav tako iščemo v sami celični liniji MDA-kb2 in njeni drugačni občutljivosti na potencialno antagonistično delovanje testiranih spojin, v primerjavi z drugimi celičnimi linijami. Možen razlog je lahko tudi prenizka testirana koncentracija preiskovanih spojin, zaradi omejenosti glede na njihovo citotoksičnost ter sposobnost, da pridejo v celico.

Na podlagi pridobljenih podatkov pri določanju aktivnosti RSV in njegovih strukturnih analogov na AR lahko trdimo, da vse preiskovane spojine, razen ZMP-9, izkazujejo androgeno delovanje. Da bi jih opredelili kot hormonske motilce pa bi bilo potrebno pridobiti oceno izpostavljenosti in dodatne informacije glede njihove interakcije s celotnim endokrinim sistemom, o mehanizmu delovanja ter s študijami *in vivo* na poskusnih živalih določiti njihove neželene učinke.

5 SKLEP

Na podlagi rezultatov eksperimentalnega dela smo ugotovili, da:

- je prvotno določena koncentracija večine preiskovanih substanc, to je 50 μM , zaradi citotoksičnosti ali njihovega obarjanja neustrezna za nadaljnje testiranje določanja učinkov na AR. Kot ustrezno koncentracijo za testiranje aktivnosti na AR smo zato za spojine ZMP-9, ZMP-15, ZMP-20, ZMP-21, ZMP-24, ZMP-25 in RSV izbrali koncentracijo 25 μM , za spojini ZMP-17 in ZMP-23 pa 10 μM ;
- vse preiskovane spojine, razen analoga ZMP-9, izkazujejo potencialno agonistično delovanje na AR, saj so statistično značilno povečale aktivnost luciferaze v uporabljeni reporterski celični liniji, ki je posredni pokazatelj biološke aktivnosti;
- obravnavane spojine pri testiranih koncentracijah nimajo antiandrogenega delovanja na celično linijo MDA-kb2;
- strukturni analogi ZMP izkazujejo na AR podobno aktivnost kot RSV. Le spojina ZMP-9 ni pokazal statistično značilnega agonističnega vpliva na AR. Zamenjava dvojne vezi C=C med fenolnim in resorcinolnim obročem z oksadiazolnim distančnikom učinkovito ohranja učinek na AR. Jakost odziva je odvisna od števila hidroksilnih skupin, njihove zaetrenosti in razporeditve na aromatskem obroču A. Odstranitev in zaetrenost hidroksilne/hidroksilnih skupin vodi, v primerjavi z RSV in ZMP-24, do zmanjšane aktivnosti na AR. Sprememba pozicije hidroksilnih spojin pri ZMP-15, glede na ZMP-20 poveča aktivnost na AR. Za primerjavo ostalih sprememb pozicij substituentov na aromatskem obroču A pa bi morali izvesti dodatno testiranje pri enaki koncentraciji vseh preiskovanih spojin.

V okviru raziskovalne naloge smo potrdili:

1. hipotezo: RSV in ZMP spojine izkazujejo visok odstotek preživetja oz. nizko citotoksičnost za celično linijo MDA-kb2, ki se je pokazala kot dovolj občutljiva za presejalni test *in vitro* določanja aktivnosti na androgenem sistemu;
2. hipotezo: RSV ima pri testirani koncentraciji na izbrani celični liniji statistično značilen agonistični učinek na AR;

3. hipotezo: vsi analogi RSV, z izjemo spojine ZMP-9, izkazujejo statistično značilen androgeni učinek na AR;
4. hipotezo: zaetrenost hidroksilnih skupin pri strukturnih analogih RSV zmanjša jakost odziva na AR. Za delovanje analogov na AR je potreben osnovni skelet, tj. dva aromatska obroča z ustreznim številom hidroksilnih skupin na ustrezni poziciji. Spremenjeni strukturni elementi vodijo v zmanjšano jakost delovanja na AR, v primerjavi z RSV.

V magistrskem delu smo pridobili osnovne informacije o delovanju RSV in njegovih rigidnih oksadiazolnih analogov na moški reprodukivni sistem. Za določitev natančnega mehanizma delovanja in oceno varnosti uporabe ter opredelitev obravnavanih spojin kot motilcev hormonskega sistema, pa so potrebne še dodatne študije. Pomembno je, da se zavedamo, da RSV izkazuje učinek na androgeni sistem pri 100-krat višjih koncentracijah, kot jih običajno lahko izmerimo v bioloških vzorcih. Da bi ugotovili, ali odmerki RSV, ki smo jim ljudje dnevno izpostavljeni, povzročajo statistično značilne učinke na androgeni sistem, bi bilo potrebno izvesti dodatne teste z ustrežno nižjimi koncentracijami. Podobno so potrebne še dodatne študije o delovanju oksadiazolnih analogov RSV, saj do danes še ni bila opravljena nobena raziskava, na podlagi katere bi lahko sklepali, da te spojine kot učinkovine delujejo v enakih odmerkih kot RSV.

6 LITERATURA

1. Neave N: Hormones and behaviour: A psychological approach. Cambridge University Press, Cambridge, 2008: 22-47, ISBN: 978-0-511-37713-6.
2. Hall JE: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Saunders, Philadelphia, 2011; 12. izdaja: 1628-1814, ISBN:978-1-4160-4574-8.
3. Nussey S, Whitehead S: Endocrinology: An integrated approach. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 2001:1-22, ISBN:1-85996-252-1.
4. Björk C: Genetic, environmental and life-style effects on androgen receptor function. Media-Tryck, Lund, Doctoral Dissertation Series: 2012; 87.
5. Brinkman AO: Androgen physiology: Receptor and metabolic disorders, Endocrinology of Male Reproduction. Rotterdam, 2013. Dostopno na: <http://www.endotext.org/chapter/androgen-physiology-receptor-and-metabolic-disorders/>
6. Grino PB, Griffin JE, Wilson JD: Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor. Endocrinology 1990; 126 (2): 1165–1172.
7. van der Steen T, Tindall DJ, Huang H: Posttranslational modification of the androgen receptor in prostate cancer. International journal of molecular sciences 2013; 14: 14833-14859.
8. Ruiz-Cortés ZT: Steroids - From Physiology to Clinical Medicine: Gonadal Sex Steroids: Production, Action and Interactions in Mammals. InTech, Sergej M. Ostojic [ured.], 2012. ISBN:978-953-51-0857-3. Dostopno na: <http://www.intechopen.com/books/steroids-from-physiology-to-clinical-medicine/gonadal-sex-steroids-production-action-and-interactions-in-mammals>
9. National Institute of Environmental Health Science: National Institutes of Health-U.S. Department of Health and Human Services, maj 2010. http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf. [Navedeno: 13. 10. 2014]
10. WHO/UNEP: State of the science of endocrine disrupting chemicals-2012. United Nations Environment Programme/World Health Organization, Ženeva, 2012.
11. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ: Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. J Steroid Biochem Mol Biol 2011; 127 (3-5): 204–215.

12. Birnbaum LS: State of the Science of Endocrine Disruptors. *Environmental Health Perspectives* 2013; 121 (4).
13. Hecker M and Hollert H: Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs. *Environmental Sciences Europe* 2011; 23 (15).
14. Kortenkamp A, Martin O, Faust M, Evans R, McKinlay R, Orton F, Rosivatz E: State of the art assessment of endocrine disruptors 2011, Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3.
15. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, Teresa M: Resveratrol and Clinical Trials: The Crossroad from In Vitro Studies to Human. *Current Pharmaceutical Design* 2013; 19: 6064-6093.
16. Timmers S, Auwerx J, Schrauwen P: The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging* 2012; 4 (3): 146–158.
17. Santos AC, Veiga F, Ribeiro AJ: New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. *Expert Opin Drug Deliv* 2011; 8: 973-90.
18. Aggarwal BB, Shishodia S: *Resveratrol in Health and Disease*. CRC Press, Texas, 2006: 1-15.
19. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E: Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin. *Food Chemistry* 2012, 130: 797–813.
20. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T: Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad. *Mutation Research* 2008, 658: 68–94.
21. Pervaiz S: *Herbal and traditional medicine: Biomolecular and Clinical aspects*. CRC Press, New York, 2004: 489-515.
22. Mishra RN: Resveratrol -The New Rasayan (Anti aging) Drug. *Current Research in Medicine and Medical Sciences* 2011; 1 (1): 5-18 .
23. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C: Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release* 2012; 158: 182-193.
24. Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciag A, Puca AA, Vecchione C: Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 61: 215-226.

25. Bode LM, Bunzel D, Huch M, Cho GS, Ruhland D, Bunzel M, Bub A, Franz C MAP, Kulling SE: In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2013; 97: 295–309.
26. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, Fogliano V, Marchelli R: Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49 (5): 495-504.
27. Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, van Breemen RB: Human, rat and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res* 2002; 19 (12): 1907-14.
28. Piotrowska H, Kucinska M, Murias M: Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research* 2012; 750: 60-82.
29. FrancesIwuchukwu O, Nagar S: Resveratrol (trans-resveratrol, 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) glucuronidation exhibits atypical enzyme kinetics in various protein sources. *Drug Metab Dispos* 2008; 36 (2): 322-330.
30. Rotches-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Estruch R, Escribano E, Urpi-Sarda M: Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacol Res* 2012; 66 (5): 375-82.
31. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcao A, Soares E, Costa R, Loureiro AI, Fernandes-Lopes C, Rocha JF, Nunes T, Wright L, Soares-da-Silva P: Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol volunteers. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 7-15.
32. Baur JA, Sinclair DA: Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery* 2006; 5 (6): 493-506.
33. Juan EM, Vinardell PM, Planas JM: The Daily Oral Administration of High Doses of trans-Resveratrol to Rats for 28 Days Is Not Harmful. *The Journal of Nutrition* 2002; 132: 257–260
34. Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J: Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 2170–2182.
35. Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS: Resveratrol-Associated Renal Toxicity. *Toxicological sciences* 2004; 82: 614–619.
36. Edwards JA, Beck M, Riegger C, Bausch J: Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida. *Annals of the New York academy of sciences* 2011; 1215: 131–137.

37. Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M in sod.: Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res* 2010; 70 (22): 9003-9011.
38. Pandey KB, Rizvi SI: Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health. *Arabian Journal of chemistry* 2011; 4: 293-298.
39. Chan MMY, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A, Fong D: Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin and resveratrol in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochemical Pharmacology* 2000; 60: 1539-1548.
40. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Kartal Ozer N: Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology* 2012; 3: 141.
41. Mitchell SH, Zhu W, Young CYF: Resveratrol inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Reserch* 1999; 53: 5892–5895.
42. Wang Y, Romigh T, He X, Orloff MS, Silverman RH: Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and -independent mechanisms in prostate cancer cell lines. *Oxford University Press, Cleveland, Human Molecular Genetics* 2010; 19 (22): 4319–4329.
43. Harada N, Murata Y, Yamaji R, Miura T, Inui H, Nakano Y: Resveratrol Down-Regulates the Androgen Receptor at the Post-translation Level in Prostate Cancer Cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2007; 53 (6): 556-560.
44. Streicher W, Luedeke M, Azoitei A, Zengerling F, Herweg A, Genze F, Schrader MG, Schrader AJ, Cronauer MV: Stilbene induced inhibition of androgen receptor dimerization: Implications for AR and AR Δ LBD-signalling in human prostate cancer cells. *Plos ONE* 2014; 9 (6): e98566.
45. Seeni A, Takahashi S, Takeshita K, Tang M, Sugiura S, Sato S, Shirai T: Suppression of prostate cancer growth by resveratrol in the transgenic rat for adenocarcinoma of prostate (TRAP) model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2008; 9 (1): 7-14.
46. Levenson AS, Kai L: Combination of resveratrol and antiandrogen flutamide has synergistic effect on androgen receptor inhibition in prostate cancer cells. *Anticancer research* 2011; 33: 3323-3330.
47. Harada N, Atarashi K, Murata Y, Yamaji R, Nakano Y, Inui H: Inhibitory mechanisms of the transcriptional activity of androgen receptor by resveratrol: Implication of DNA

- binding and acetylation of the receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 123 (1-2): 65-70.
48. Shi W, Leong M, Cho E, Farrell J, Chen H, Tian J, Zhang D: Repressive effects of resveratrol on androgen receptor transcriptional activity. *Plos ONE* 2009; 4 (10): e7398
49. Iguchi K, Toyama T, Ito T, Shakui T, Usui S, Oyama M, Inuma M, Hirano K: Antian-drogenic activity of resveratrol analogs in prostate cancer LNCaP cells. *Journal of Andrology* 2012; 33 (6): 1208-1215.
50. 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. *Toxicological Sciences* 2002; 66: 69-81.
51. Blake LS, Martinović D, Gray Jr. LE, Wilson VS, Regal RR, Villeneuve DL, Ankley GT: Characterization of the androgen-sensitive MDA-kb2 cell line for assessing complex environmental mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2010; 29 (6): 1367-1376.
52. ATCC, MDA-kb2 (ATCC®CRL-2713™).
http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2713.aspx?geo_country=si#11F1A8C17A7A4FB8A36940C154A9B585.
[Navedeno: 2. 2. 2013]
53. Pečar Fonović U, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M, Kos J: Vaje iz farmaceutске biokemije. Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, Ljubljana 2009. ISBN:978-961-6378-22-2.
54. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Formulation/I4386for.pdf>. [Navedeno: 2. 2. 2014.]
55. <http://futurescienceleaders.org/protocols/files/2013/02/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>. [Navedeno: 22. 4. 2013]
56. http://sl.wikipedia.org/wiki/Celi%C4%8Dna_kultura. [Navedeno: 27. 2. 2013]
57. <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/paguide/a4/chap4a4.pdf?la=en>. [Navedeno: 27. 2. 2013]
58. <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20Aqueous%20One%20Solution%20Cell%20Proliferation%20Assay%20System%20Protocol.pdf>. [Navedeno: 27. 2. 2013]
59. <http://worldwide.promega.com/resources/multimedia/reporter-assays-and-transfection/introduction-to-reporter-gene->

[assays/?_utma=1.384170890.1383682559.1383682559.1383682559.1&_utmb=1.1.10.1383682559&_utmc=1&_utmz=1.1383682559.1.1.utmcsr=google.](http://www.promega.com/~media/files/resources/cell%20notes/cn021/luciferase%20reporter%20assays-%20powerful%20adaptable%20tools%20for%20cell%20biology%20research.pdf?la=en)

[Navedeno: 6. 11. 2013]

60. <http://www.promega.com/~media/files/resources/cell%20notes/cn021/luciferase%20reporter%20assays-%20powerful%20adaptable%20tools%20for%20cell%20biology%20research.pdf?la=en>. [Navedeno: 6. 11. 2013]
61. <http://en.wikipedia.org/wiki/Dihydrotestosterone>. [Navedeno: 12. 11. 2014]
62. <http://en.wikipedia.org/wiki/Mifepristone>. [Navedeno: 12. 11. 2014]
63. 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. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2006; 14: 7160-7174.
64. Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B: Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature clinical practice urology* 2009; 6 (2): 76-85.

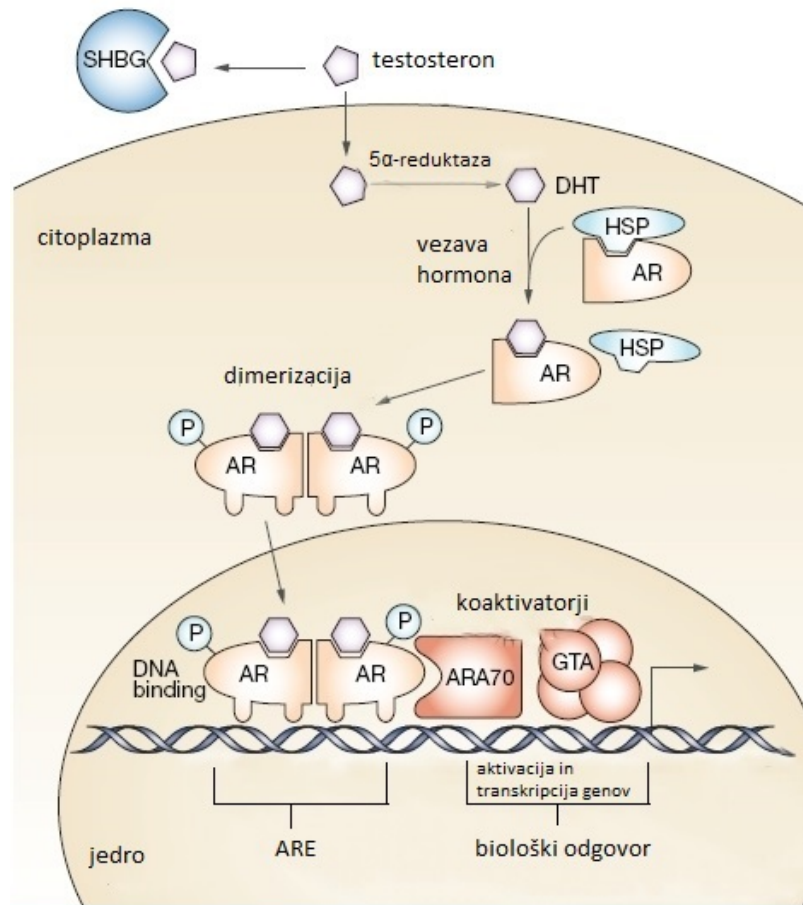
7 PRILOGE

7.1 Hormoni glede na kemijsko strukturo

Tabela IV: Shematski prikaz hormonov glede na njihovo kemijsko strukturo
(3)

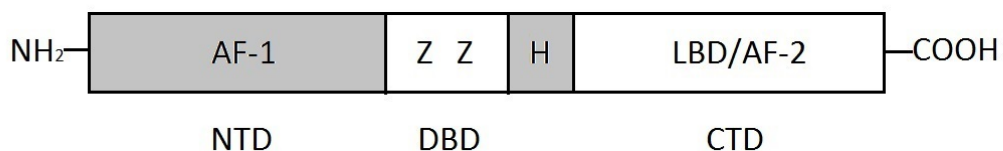
Peptidni hormoni	Steroidni hormoni	Derivati tirozina
<ul style="list-style-type: none">• Hipotalamusni hormoni (TRH, CRH, GHRH, somatostatin, GnRH)• Hormoni hipofize (rastni hormon, TSH, ACTH, prolaktin, FSH, LH, oksitocin, ADH)• Kalcitonin• Inzulin, glukagon• Paratiroidni hormon• Renin, eritropoetin• Leptin	<ul style="list-style-type: none">• Progesteron• Estrogen• Testosteron• Aldosteron• Kortizol	<ul style="list-style-type: none">• PIF (prolaktinski inhibitorni dejavnik)• Ščitnični hormoni (tiroksin, trijodtironin)• Norepinefrin, epinefrin• Adrenalin, noradrenalin• Eikozanoidi

7.2 Mehanizem delovanja androgenega receptorja in njegova strukturna zgradba



SHBG: globulin, ki veže spolni hormon, DHT: dihidrotestosteron
HSP: "heat shock"- stresni protein, AR: androgeni receptor
ARE: odzivni element na androgene

Slika 10: Mehanizem delovanja androgenega receptorja
(Prirejeno po (64))



NTD: N-terminalna domena, DBD: DNA vezavna domena, CTD: C-terminalna domena,
AF-1: od liganda neodvisen aktivacijski del 1, Z: cinkov prst, H: povezovalna regija,
LBD: domena za vezavo liganda, AF-2: od liganda odvisen aktivacijski del 2

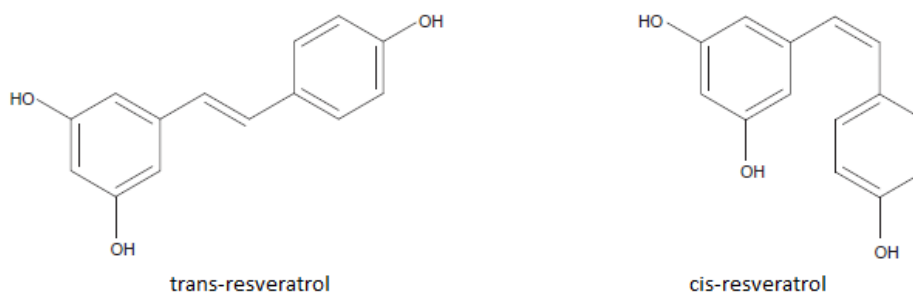
Slika 11: Strukturna zgradba androgenega receptorja
(Prirejeno po (7))

7.3 Testi OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev

Tabela V: Shema testov OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev
(Prirejeno po (13) in (14))

1.raven (prednostno razvrščanje na podlagi obstojećih informacij)	<ul style="list-style-type: none">• fizikalno-kemijske lastnosti• toksikološki podatki iz standardiziranih in nestandardiziranih testov• izpostavljenost okolja in ljudi (obseg proizvodnje, sproščanje, uporaba)• modeli QSAR in ADME
2.raven (presejalni testi <i>in vitro</i> , ki dajejo informacije o mehanizmu delovanja)	<ul style="list-style-type: none">• test vezave na receptor• test aktivacije transkripcije• test steroidogeneze• test proliferacije celic MCF-7 (agonist/antagonist ER)
3.raven (presejalni testi <i>in vivo</i> , ki zagotavljajo podatke o specifičnem endokrinem delovanju)	<ul style="list-style-type: none">• uterotropni test• Hershbergerjev test• presejalni test na ribah, dvoživkah (razmnoževanje, metamorfoza)
4.raven (testi <i>in vivo</i> za identifikacijo stranskih učinkov na različnih sistemih)	<ul style="list-style-type: none">• izboljšani test OECD 407• histopatološki test• metamorfozni test• test pubertete na moških in ženskah
5.raven (testi <i>in vivo</i> za identifikacijo učinkov iz endokrinih in drugih mehanizmov skozi celoten cikel življenja organizma)	<ul style="list-style-type: none">• študije toksičnosti za razmnoževanje na eni generaciji• študije toksičnosti za razmnoževanje na dveh generacijah (študije multi-generacije)• analiza življenjskega cikla v ribah, pticah, dvoživkah (razvoj in razmnoževanje)

7.4 Kemijska struktura *trans*- in *cis*-resveratrola ter fizikalno kemijske lastnosti resveratrola



Slika 12: Kemijska struktura *trans* in *cis* resveratrola
(17)

Tabela VI: Fizikalno kemijske lastnosti resveratrola
(22, 24)

LASTNOST	VREDNOST
Številka CAS	501-36-0
Molekulska formula	$C_{14}H_{12}O_3$
Molekulska masa	228,25 g/mol
Agregatno stanje	trden (belkast) prašek
Tališče	253-255°C
log P	3,1
pKa	9,14
Topnost v vodi	0,03 g/L
Topnost v DMSO	16 g/L
Topnost v etanolu	50 g/L