

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA KLEP

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA KLEP

**UGOTAVLJANJE TIROIDNEGA DELOVANJA IZBRANIH NESTEROIDNIH
PROTIVNETNIH UČINKOVIN NA CELICAH GH3.TRE-Luc**

DETECTION OF THYROID ACTIVITY OF SELECTED NONSTEROIDAL ANTI-
INFLAMMATORY DRUGS ON CELLS GH3.TRE-Luc

Ljubljana, 2015

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc za vsestransko pomoč in usmerjanje pri pisanju magistrske naloge. Prav tako se iskreno zahvaljujem mladi raziskovalki Ivani Klopčič za vso posredovano znanje in pomoč pri izvajanju praktičnega dela.

Posebna zahvala gre mojim domačim za razumevanje, potrpežljivost in spodbujanje tekom študija.

Hvala tudi vsem prijateljem.

Izjava

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

Jasmina Klep

MAGISTRSKA KOMISIJA

Predsednik: izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm

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

Član: asist. dr. Rok Šibanc, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC	V
KAZALO ENAČB	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 HORMONSKI MOTILCI.....	1
1.2 ENDOKRINI SISTEM	4
1.2.1 ŠČITNICA IN ŠČITNIČNI HORMONI	5
1.2.2 MEHANIZEM DELOVANJA ŠČITNIČNIH HORMONOV	6
1.3 PARACETAMOL	8
1.3.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI PARACETAMOLA.....	8
1.3.2 UPORABA PARACETAMOLA.....	8
1.3.3 FARMAKOKINETIKA PARACETAMOLA	8
1.3.4 FARMAKODINAMIKA PARACETAMOLA	9
1.3.5 TOKSIČNOST PARACETAMOLA	9
1.4 DIKLOFENAK IN NJEGOV HIDROKSILIRAN METABOLIT (4' OH-DFC)	10
1.4.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI DIKLOFENAKA.....	10
1.4.2 UPORABA DIKLOFENAKA	11
1.4.3 FARMAKOKINETIKA DIKLOFENAKA	11
1.4.4 FARMAKODINAMIKA DIKLOFENAKA.....	12
1.4.5 TOKSIČNOST DIKLOFENAKA	12
1.5 PICEATANOL	13
1.5.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI PICEATANOLA	13
1.5.2 UPORABA PICEATANOLA.....	13
1.5.3 FARMAKOKINETIKA PICEATANOLA.....	14
1.5.4 FARMAKODINAMIKA PICEATANOLA	14
1.5.5 TOKSIČNOST PICEATANOLA	14
1.6 PREISKOVANE SPOJINE V OKOLJU.....	15
2 NAČRT DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 TESTIRANE SPOJINE	18

3.1.1 PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN.....	19
3.2 CELIČNA LINIJA GH3.TRE–Luc	20
3.2.1 OSNOVE DELA S CELICAMI	21
3.2.2 TEST CITOTOKSIČNOSTI Z RESAZURINOM	26
3.2.3 LUCIFERAZNI TEST	28
3.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	29
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	30
4.1. TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI.....	30
4.2 DOLOČANJE UČINKA PREISKOVANIH SPOJIN NA TIROIDNIH RECEPTORJIH α in β	33
4.2.1 PARACETAMOL.....	34
4.2.2 DIKLOFENAK	37
4.2.3 4-HIDROKSIDIKLOFENAK.....	40
4.2.4 PICEATANOL.....	42
4.3 PREISKOVANE SPOJINE V OKOLJU.....	45
5 SKLEP	48
6 LITERATURA	50
7 PRILOGE.....	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturni prikaz redukcijske reakcije v metabolno aktivnih celicah.....	27
Slika 2: Reakcija bioluminiscence, ki jo katalizira kresničkina luciferaza	28
Slika 3: Rezultati testa citotoksičnosti pri prvi necitotoksični koncentraciji spojin	32
Slika 4: Primerjava 0,1 % DMSO v PCM-u in gojitvenega medija	33
Slika 5: Rezultati luciferaznega testa za PAR, DOLOČEVANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA	34
Slika 6: Rezultati luciferaznega testa za PAR, DOLOČEVANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA	35
Slika 7: Rezultati luciferaznega testa za DFC, DOLOČEVANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA	38
Slika 8: Rezultati luciferaznega testa za DFC, DOLOČEVANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA	38
Slika 9: Rezultati luciferaznega testa za 4'OH-DFC, DOLOČEVANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA	41
Slika 10: Rezultati luciferaznega testa za 4'OH-DFC, DOLOČEVANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA	41
Slika 11: Rezultati luciferaznega testa za PIC, DOLOČEVANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA	43
Slika 12: Rezultati luciferaznega testa za PIC, DOLOČEVANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: <i>Preiskovane spojine in kontroli</i>	18
Preglednica II: <i>Koncentracije testiranih spojin</i>	20

KAZALO ENAČB

<i>Enačba 1: Izračun potrebnega volumna celic pri presajanju</i>	23
<i>Enačba 2: Izračun potrebnega volumna celic pri nasajanju</i>	23

POVZETEK

Znano je, da mnogi nesteroidni antirevmatiki (NSAID), ki so najpogosteje uporabljene zdravilne učinkovine za lajšanje bolečine in vnetja, delujejo tudi kot hormonski motilci. Zaradi neselektivnega delovanja so sposobni inhibirati tudi drugo izoobliko tarčnega encima (COX-1), kar se kaže z njihovimi neželenimi učinki. Iz tega vidika številni znanstveniki raziskujejo njihovo sposobnost interakcije še z drugimi tarčami v človeškem organizmu. Dosedanje *in vitro* ter *in vivo* študije tako kažejo, da so NSAID v terapevtskih koncentracijah sposobni modulirati estrogenski (ER), progesteronski (PR) ter s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor gama (PPAR γ). Končni učinki modulacije se med posameznimi predstavniki NSAID razlikujejo. Veliko pa je še neodgovorjenih vprašanj. Eno izmed teh je področje moduliranja delovanja ščitnice in receptorjev za ščitnične hormone (TR). Modulacija slednjih s strani izbranih NSAID je bila glavna tema naše raziskave.

Sposobnost modulacije TR smo vrednotili štirim učinkovinam: diklofenaku, ki je tipičen predstvanik NSAID in njegovemu 4-hidroksi metabolitu, paracetamolu ter piceatanolu. Slednja dva sicer nista tipična NSAID pa vendar oba izkazujeta (šibek) protivnetni učinek, ki je eden najpomembnejših v skupini NSAID.

Kot modelni sistem za ugotavljanje učinkov smo uporabili celično linijo GH3.TRE-Luc, ki izraža funkcionalne tiroidne α - in β -receptorje. Najprej smo s testom citotoksičnosti določili največjo koncentracijo spojine, ki ni vplivala na metabolno aktivnost celic. Pri vseh spojinah, razen pri piceatanolu, se je izkazalo, da v najvišji testirani koncentraciji, tj. 200 μ M oz. 150 μ M zaradi obarjanja spojine v mediju, ne delujejo toksično na celice in so tako primerne za nadaljnje testiranje. Prva necitotoksična koncentracija piceatanola je bila šele 10 μ M. V nadaljevanju smo nato izvedli presejalni luciferazni test, ki temelji na aktivaciji transkripcije gena za luciferazo. Rezultati testa so pokazali, da vse preiskovane spojine v višjih koncentracijah (10-200 μ M) signifikantno zmanjšujejo aktivnost luciferaze. To pomeni, da so antagonisti na TR. Posebnost med njimi predstavlja 4-hidroksidiklofenak, saj je edini, ki je poleg antagonističnega, v nižjih koncentracijah (0,01-1 μ M) signifikantno izkazal še agonistično delovanje na TR.

Rezultati našega eksperimentalnega dela potrjujejo dejstvo, da preiskovane spojine delujejo kot modulatorji tiroidnih receptorjev. Vendar pa potreba po nadaljnjih *in vitro*, *in vivo* ter epidemioloških študijah, ki bodo popolnoma ovrednotile tveganje, ki ga za zdravje ljudi predstavljajo preiskovane spojine, ostaja še vedno velika.

KLJUČNE BESEDE: hormonski motilci, paracetamol, diklofenak, piceatanol, tiroidni receptor, celična linija GH3.TRE-Luc

ABSTRACT

It is known that many nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are the most commonly used drugs for the relief of pain and inflammation, act as endocrine disruptors. Due to their nonselective activity, they are able to modulate not only the target enzyme, but also its other isoforms (COX-1), which results in their side effects. Because of their nonselectivity, many scientists are researching their ability to interact with other targets in the human body. The findings of in vitro and in vivo studies, which have been conducted so far, suggest that the NSAID, used in therapeutic concentrations, are able to modulate the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ). The final effects of modulation differ between individual representatives of NSAIDs. There are still many unanswered questions regarding this topic. One of these is the NSAIDs ability to modulate thyroid function and the thyroid hormone receptor (TR). The modulation of the latter by selected NSAID representatives was the main topic of our research.

Four active substances were evaluated on their ability to modulate the TR: a typical NSAID representative diclofenac and its 4-hydroxy metabolite, paracetamol and piceatannol. Although the latter two are not typical NSAIDs, they exhibit a weak anti-inflammatory effect, which is one of the most significant in the group of NSAIDs.

As a model system for determining their effects, the cell line GH3.TRE-Luc, which expresses functional α - and β - thyroid receptors, was used. First, we used a cytotoxicity test to determine the maximum concentration of the compound, which had no effect on the metabolic activity of cells. We discovered that all compounds, except for piceatannol, precipitate in the medium at their highest tested concentrations (200 μ M or 150 μ M) and therefore do not act toxic on the cells and are suitable for further testing. The first non-cytotoxic concentration of piceatannol was 10 μ M. We then performed a screening luciferase assay based on the activation of transcription of the gene for luciferase. The test results showed that all test compounds significantly reduce the activity of luciferase at higher concentrations (10-200 μ M). This means that they are all thyroid receptor antagonists. 4-hydroxydiclofenac was the only tested compound, which (besides having an antagonist effect in higher concentrations) showed significant agonist activity on the TR in lower concentrations (0,01-1 μ M).

The results of our experimental work confirm the fact that the investigated compounds act as modulators of the thyroid receptors. However, the need for further *in vitro*, *in vivo* and epidemiological studies, which will fully evaluate the risks that the investigated compounds pose to human health, remains high.

KEYWORDS: endocrine disruptors, paracetamol, diclofenac, piceatannol, thyroid receptor, GH3.TRE-Luc cells

SEZNAM OKRAJŠAV

4'OH-DFC	4-hidroksidiklofenak
AF	alkalna fosfataza
ARH	arilni ogljikovodikov receptor
ASA	acetilsalicilna kislina
ATP	adenozin trifosfat
BPA	bisfenol A
BSA	goveji serumski albumin
COX	ciklooksigenaza
CYP2C9	citokrom P450 2C9
CYP2E1	citokrom P450 2E1
CYP3A4	citokrom P450 3A4
CYP3A5	citokrom P450 3A5
CŽS	centralno živčni sistem
DDT	dikloro-difenil-trikloroetan
DES	dietilstilbestrol
DFC	diklofenak
DMSO	dimetilsulfoksid
EC	Evropska komisija
EC ₅₀	koncentracija, ki doseže 50 % maksimalnega učinka
ECHA	Evropska agencija za kemikalije
EEA	Evropska komisija za okolje
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane
ER	estrogenski receptor
EU	Evropska unija
FBS	fetalni goveji serum
FO	farmacevtska oblika
GF	glomerulna filtracija
HM	hormonski motilci
IC ₅₀	inhibitorna koncentracija, ki doseže 50 % maksimalnega učinka
LBD	ligand vezavna domena

LD ₅₀	odmerek snovi, ki povzroči 50 % smrtnost testiranih živali
LDH	laktatna dehidrogenaza
LOAEL	odmerek pri katerem so že opaženi neželeni učinki
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAPQI	N-acetil-para-benzokinon-imin
NIHHS	Nacionalni inštitut za okolijske in zdravstvene vede
NOAEL	odmerek, pri katerem še ni opaženih nobenih neželenih učinkov
NSAID	nesteroidni antirevmatiki
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
PAR	paracetamol
PBS	fosfatni pufer
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGI ₂	prostaglandin I ₂ oz. prostaciklin
PIC	piceatanol
PPAR _γ	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor gama
PR	progesteronski receptor
QSAR	kvantitativno razmerje med strukturo in delovanjem
REACH	Uredba Evropskega parlamenta in Sveta Evrope o registraciji, ocenjevanju, dovoljevanju in omejevanju kemikalij
RSV	resveratrol
RR	ribonukleotid reduktaza
RXR	retinoidni X receptor
T ₃	trijodtironin
T ₄	tiroksin
TBG	tiroksin-vezoči globulin
TBPA	tiroksin-vezoči prealbumin
TR	tiroidni receptor
TRH	tiroliberin
TRR	transtiretin
TSH	tirotropin
TT	telesna teža
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

1.1 HORMONSKI MOTILCI

Živimo v svetu, v katerem je vse več dokazov, da številne kemikalije - tako naravne kot tudi sintezno pridobljene - motijo endokrini sistem. Znanstveniki takim kemikalijam pravijo »hormonski motilci« (HM) (1). Zaskrbljenost o njihovih negativnih vplivih na zdravje je v Evropi, kot tudi drugod po svetu, vedno večja. Številne organizacije, kot so Evropska komisija (EC), Evropska agencija za kemikalije (ECHA), Evropska agencija za varnost hrane (EFSA), Nacionalni inštitut za okoljske in zdravstvene vede (NIEHS) ter Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), vedno znova predstavljajo nove smernice za ugotavljanje in zmanjševanje uporabe le-teh (1, 2). Slednja poleg omenjenih smernic opravlja tudi validacijo metod za testiranje HM.

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je HM definirala kot eksogene snovi ali zmesi, ki spreminjajo funkcije endokrinega sistema ter posledično škodljivo vplivajo na zdravje organizma, njegovih potomcev in celotne populacije (3).

Ljudje smo HM izpostavljeni neprestano preko hrane, zraka, vode in kože. Izpostavljeni smo doma, v šoli, na delovnem mestu, skratka, povsod. Ne gre se za izpostavljenost enemu, ampak več HM hkrati. Snovi s potencialom za povzročanje endokrinih motenj so:

- naravni hormoni iz živali, ki jih le-te sproščajo v okolje
- naravne kemikalije, vključno s toksini, ki jih proizvajajo sestavni deli rastlin (fitoestrogeni genistein in kumestrol) in gliv
- sintetično proizvedena zdravila
- sintezne kemikalije (pesticidi (npr. metoksiklor, klorpirifos, DDT), fungicidi (npr. vinklozolin), industrijska topila in njihovi stranski produkti (npr. polihalogenirani bifenioli, dioksini), monomeri plastike (npr. bisfenol A), zaviralci gorenja, dišave)
- težke kovine (npr. arzen, kadmij) (1, 4, 5, 6).

Za enega izmed začetnikov problematike HM velja dietilstilbestrol (DES). Gre za sintetični estrogen, ki se je v letih 1940-1970 uporabljal za preprečevanje zapletov in splava pri ženskah z rizično nosečnostjo. V začetkih 70-ih let so po naključju odkrili njegov z nosečnostjo povezan neželen oz. toksičen učinek. Izkazalo se je, da se je pri deklicah, ki so bile DES izpostavljene v maternici, lahko že v mladosti (14-22 let) v času pubertete razvila redka oblika raka na maternici (adenokarcinom nožnice). Razvoj reproduktivnega sistema

pa je bil prizadet tudi pri dečkih. Od takrat naprej je uporaba DES v te namene prepovedana (7).

Prva spoznanja glede mehanizmov delovanja HM so vključevala predvsem jedrne receptorje (androgene, estrogenske, progesteronske, retinoidne receptorje ter receptorje za ščitnične hormone). Danes temeljne znanstvene raziskave kažejo, da ti mehanizmi delovanja HM niso omejeni le na slednje, pač pa zajemajo tudi steroidne nejedrne receptorje (npr. membranski estrogenski receptor), nesteroidne receptorje (receptorji za serotonin, dopamin, noradrenalin), t. i. receptorje sirote (npr. receptorji za aril ogljikovodike) ter encimske poti za sintezo ali razgradnjo hormonov (6).

Mehanizmov, s katerimi HM porušijo hormonsko ravnovesje in tako povzročijo škodo v telesu, je še več. V splošnem obstajata dve poti: neposredna vezava na proteinski kompleks hormonskega receptorja ter neposredna vezava na specifično beljakovino, ki je odgovorna za sintezo oz. razgradnjo ali transport hormona. Pri neposredni vezavi na proteinski kompleks receptorja se lahko zgodi, da eksogena snov posnema endogeni hormon in pride do aktivacije receptorja (agonistično delovanje). Lahko pa se zgodi, da eksogena snov kljub vezavi ne povzroči aktivacije receptorja (antagonistično delovanje). Neposredna vezava HM na specifično beljakovino za transport ali sintezo hormonov povzroči spremembo koncentracije le-teh v krvnem obtoku (povečanje ali zmanjšanje), kar pa posledično sproži spremembo normalnega ravnovesja razpoložljivosti nevezanih hormonov (4, 8).

HM so med seboj zelo heterogeni in ne izkazujejo specifičnih fizikalno-kemijskih lastnosti, po katerih bi lahko zanesljivo vedeli, da bodo vplivali na endokrini sistem. Za večino znanih HM velja, da imajo nizko molekularno maso (<1000 g/mol) ter nizko topnost v vodi. Zaradi visoke lipidotopnosti se lahko bioakumulirajo v maščobnem tkivu. V svoji strukturi lahko vsebujejo halogenske funkcionalne skupine (klor in brom) ter fenolne obrobe, ki posnemajo strukturo endogenih steroidnih hormonov (6).

HM imajo v primerjavi z endogenimi hormoni zelo majhno afiniteto do receptorjev. Kljub temu pa je vedno več dokazov, da že v nizki koncentraciji povzročajo motnje v endokrinem sistemu (8). V kakšni meri se le-te razvijejo, je odvisno od več faktorjev. Najpomembnejši med njimi je življenjsko obdobje, v katerem smo izpostavljeni HM. Največje tveganje za razvoj motenj predstavlja izpostavljenost pred rojstvom in v zgodnjem otroštvu. Posledice izpostavljenosti HM se lahko pokažejo takoj, lahko pa šele v odrasli dobi in tudi v naslednjih

generacijah (1, 5). Pomembna faktorja sta tudi časovno trajanje izpostavljenosti HM, ki je praviloma že kronična in pa izpostavljenost več različnim HM hkrati. Učinki le-teh so lahko aditivni ali celo sinergistični, lahko pa tudi antagonistični. Še zadnji faktor, ki prav tako vpliva na razvoj endokrinih motenj, je sam posameznik z edinstveno sestavo telesa. Posebnosti v metabolizmu, prisotne bolezni, genski polimorfizmi; to so dejavniki, ki dodatno povečujejo (zmanjšujejo) škodljivo delovanje HM (6).

Endokrine motnje, ki so posledica izpostavljenosti HM, ne zajemajo samo moduliranja androgenega, estrogenega in ščitničnega sistema. Epidemiološke študije navajajo, da mnogi HM poleg prezgodnje pubertete, neplodnosti, spontanih splavov in raka (prostate in mod pri moških, ter dojk, jajčnikov in maternice pri ženskah), povzročajo še imunske in avtoimunske bolezni, nevrodegenerativne bolezni, diabetes tipa 2 in debelost (1, 8).

Kot že rečeno, znanstveniki številnih organizacij poskušajo najti ustrezne smernice za opredelitev in zmanjševanje uporabe HM. Predvsem OECD se je (in se še vedno) zavzema za razvoj validiranih testnih metod, ki bi na zanesljiv in stroškovno učinkovit način opredelile potenciale škodljive učinke HM. Ustanovila je delovno skupino EDTA (Endocrine Disrupter Testing and Assessment Task Force), ki je razvila večstopenjsko strategijo testov, prikazano v Prilogi 1. Osnovni namen strategije ni testiranje po stopnjah, pač pa naj bi delovala kot okvir za pridobivanje informacij. Strategija je sestavljena iz petih organizacijskih ravni, ki pa se v grobem delijo na dve stopnji. Prva stopnja vključuje 1., 2. in 3. organizacijsko raven. Vključuje *in silico*, *in vitro* ter kratkoročne *in vivo* presejalne teste, s katerimi se pridobijo osnovni identifikacijski podatki o potencialnih učinkih HM na endokrini sistem. Na tej stopnji se tudi določi, katere spojine je smiselno vključit v drugo stopnjo testiranja, ki vključuje 4. in 5. organizacijsko raven. Na slednjih se izvajajo dolgoročne *in vivo* študije na poskusnih živalih. Le-te so namenjene za določanje neželenih učinkov, ki so osnova za izvedbo ocene tveganja (3, 9). Podobno kot OECD v svetovnem merilu je Evropska komisija (EC) na ravni Evrope v okviru uredbe o fitofarmacevtskih sredstvih (Plant Protection Product Regulation-PPPR) ter uredbe o biocidnih pripravkih (Biocides Product Regulation-BPR) junija lani pripravila načrt za identifikacijo HM. Prav tako je Evropska Unija (EU) uvedla posebne zakonske obveznosti, katerih namen je postopno odstranjevanje HM, hkrati pa že od junija 2007 velja uredba REACH (**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and restriction of **C**hemicals), katere namen je z nadzorom nad kemikalijami in njihovo oceno varnosti izboljšati zdravje ljudi in okolja (2).

1.2 ENDOKRINI SISTEM

Endokrini sistem je organski sistem, ki vzdržuje homeostazo in nadzoruje številne funkcije v telesu. Sestavlja ga mreža organov imenovanih endokrine žleze oz. žleze z notranjim izločanjem. Le-te se nahajajo v različnih delih telesa in med seboj niso anatomsko povezane. Med sabo komunicirajo tako, da v kri izločajo snovi, imenovane hormoni. Slednji po krvi potujejo do oddaljenih, tarčnih celic, na katere izvajajo svoje učinke. Tak mehanizem delovanja je endokrini, vendar pa ni edini. Znana sta še dva, in sicer avto- in parakrini. Pri avtokrinem mehanizmu hormon deluje na celice, ki so ga proizvedle, pri parakrinem pa se le-ta izloči v intersticijsko tekočino in po njej potuje do sosednjih celic. Vsaka žleza proizvaja in skladišči drugačno vrsto hormona, zato so tudi učinki le-teh na tarčne celice različni (Priloga 2). Glede na kemijsko strukturo delimo hormone v tri skupine: proteine in polipeptide (hormoni adeno- in nevrohipofize, trebušne slinavke, obščitnice), steroide (hormoni skorje nadledvične žleze, jajčnikov, testisov) in derivate tirozina (hormona ščitnice T4 in T3, hormoni sredice nadledvične žleze) (10). Učinke na tarčne celice hormoni izvajajo preko receptorjev. To so velike proteinske molekule, ki se lahko nahajajo na površini ali v notranjosti celice. Površinski receptorji se lahko nahajajo v ali na celični membrani, ki obdaja posamezno celico. Na njih se vežejo peptidni hormoni in kateholamini, ki zaradi svoje velikosti in vodotopnosti membrane ne morejo preiti. Znotrajcelični receptorji, kot nam že samo ime pove, se nahajajo v notranjosti celice. Lokalizirani so lahko v celični citoplazmi ali pa v celičnem jedru. Slednji so t. i. jedrni receptorji. Učinke preko znotrajceličnih receptorjev izvajajo steroidni hormoni, katerim je prehod preko membrane olajšan zaradi majhnosti in topnosti v lipidih. Enako velja za ščitnična hormona T3 in T4 (11, 12). Vsaka tarčna celica ima lahko več različnih receptorjev za različne hormone (npr. insulin, glukagon), lahko pa ima tudi različne receptorje za iste hormone (npr. α 1- in α 2-adrenergični receptorji za adrenalin) (11). Kljub različnosti hormonov med sabo pa je vsem skupno, da po vezavi na receptor tvorijo kompleks, ki sproži zaporedje znotrajceličnih reakcij. Vsaka naslednja reakcijska stopnja je aktivacijsko močnejša, kar hkrati pojasnjuje učinkovitost hormonov pri tako nizkih koncentracijah (pg- μ g/mL) (12). Nadzor nad izločanjem hormonov poteka preko t. i. povratne zveze, v katero sta vključena hipotalamus in hipofiza. Po navadi gre za negativno povratno zvezo, kjer povečana koncentracija določenega hormona v krvi preko hormonov hipofize inhibira sproščanja le-tega iz endokrine žleze (npr. sproščanje tiroksina). Redkejša je pozitivna povratna zveza, kjer

povečana koncentracija hormona preko hormonov hipofize sproži dodatno sproščanje le tega (npr. sproščanje estrogena) (10).

1.2.1 ŠČITNICA IN ŠČITNIČNI HORMONI

Ščitnica je endokrina žleza, ki se nahaja v predelu vratu, natančneje pred sapnikom. Je ena izmed največjih in zelo dobro prekrvavljenih žlez v telesu. Sestavljena je iz velikega števila zaprtih foliklov, napolnjenih s tekočino, imenovano koloid. Glavna sestavina koloida je glikoprotein tiroglobulin, ki skladišči dva glavna ščitnična hormona. To sta hormona tiroksin (T4) in trijodtironin (T3), na katera se bomo osredotočili v nadaljevanju. Skladiščenje večje količine hormonov je posebna lastnost ščitnice. Glikoprotein tiroglobulin lahko skladišči tolikšno količino T3 in T4, ki pri normalni oskrbi telesa zadostuje za dva do tri mesece. To je tudi ključni razlog, zakaj fiziološki učinki pomanjkanja ščitničnih hormonov, niso opazni več mesecev (12). Poleg dveh glavnih hormonov pa ščitnica izloča še en hormon - kalcitonin, ki uravnava koncentracijo kalcija v telesu (13).

Izločanje hormonov iz ščitnice je v precejšnjem deležu (93 %) pomaknjeno na stran tiroksina, ki je prohormon. Le-ta se tekom potovanja po krvi pretvori v T3, ki predstavlja aktivno obliko. Oba hormona opravljata enake naloge, razlika med njima je le v hitrosti in jakosti delovanja (12). T3 ima štirikrat močnejše delovanje kot T4, njegova obstojnost in koncentracija v krvi pa sta manjši. Razmerje koncentracij v krvi znaša 50:1 v korist T4, prav tako daljša pa je tudi njegova obstojnost. Razpolovni čas T4 znaša sedem dni, T3 pa le en dan (12, 13).

Izločanje hormonov je regulirano preko osi hipotalamus-hipofiza-ščitnica. Hipotalamus izloča hormon tiroliberin (TRH), ki spodbudi adenohipofizo za izločanje tirotropina (TSH). Le-ta spodbudi ščitnico za izločanje T3 in T4. Ko je koncentracija hormonov v krvi 1.75-krat večja od normalne, se po principu negativne povratne zveze v adenohipofizi ustavi izločanje TSH. Stopnja njegovega izločanja praktično pade na nič. Le-ta se spet poveča, ko koncentracija T3 in T4 pade pod normalno. Tak mehanizem negativne povratne zveze omogoča, da je koncentracija hormonov v krvnem obtoku vedno konstantna (12, 14).

Zaradi svoje lipofilnosti sta hormona v krvi večinoma vezana na prenašalne proteine. V prosti obliki je 1 % T3 in le 0,1 % T4. Protein, ki v največjem deležu (70 %) prenaša oba hormona, je tiroksin-vezoči globulin (TBG), v preostalem deležu pa sta vezana na tiroksin-vezoči prealbumin (TBPA) oz. transtiretin (TRR) in albumin (13).

Kemijsko oba ščitnična hormona uvrščamo v skupino aminov oz. derivatov tirozina. Za sintezo sta potrebni dve molekuli tirozina in jod (Priloga 3) (15). Vir tirozina predstavlja glikoprotein tiroglobulin, medtem ko jod v telo vnesemo s hrano (1 mg/teden) (12). T₄, ki je prohormon, v svoji strukturi vsebuje štiri atome joda. Iz njega se z reakcijo dejodizacije tvori aktiven ali reverzni T₃ (rT₃) s tremi atomi joda (13).

1.2.2 MEHANIZEM DELOVANJA ŠČITNIČNIH HORMONOV

Ščitnična hormona svoje učinke izražata preko receptorjev za ščitnične hormone, ki spadajo v skupino znotrajceličnih jedrnih receptorjev. Skupina se glede na ligande, ki se vežejo na receptor, deli v več podskupin. V prvo podskupino uvrščamo receptorje za steroidne hormone (androgene, estrogene, progesterone ter mineralo- in glukokortikoide). Druga podskupina vključuje retinoidni, s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptor (PPAR), arilni ogljikovodikov receptor (ARH), receptor za vitamin D ter tiroidni receptor (TR). Slednjega bomo v nadaljevanju podrobneje opisali. V tretjo, zadnjo, podskupino pa uvrščamo t. i. receptorje sirote, katerih ligandi še niso poznani. Vsi naštetih receptorji so od ligandov odvisni transkripcijski faktorji, ki uravnavajo prepisovanje genov (16).

Tiroidni receptor je v splošnem zgrajen iz štirih strukturnih domen, ki jih označujemo s črkami A/B, C, D in E/F (Priloga 4). Vsaka izmed posameznih domen ima določeno funkcijo. Domena A/B je najbolj variabilna. Predstavlja N-terminalni del receptorja in vsebuje od liganda neodvisen aktivacijski segment AF-1. Domena C je mesto, s katerim se receptor veže na DNA. Imenuje se DNA-vezavna domena. Domena D ima povezovalno funkcijo. Povezuje namreč domeno C in E/F, ki predstavlja C-terminalni del tiroidnega receptorja. Vsebuje od liganda odvisen aktivacijski segment AF-2 in sodeluje pri vezavi hormona ter homo- in heterodimerizaciji. Imenuje se ligand-vezavna domena (LBD) (17).

Prvi korak pri delovanju ščitničnih hormonov predstavlja pretvorba T₄ v T₃ (14). Sledi prehod T₃ skozi membrano (celično in jedrno), ki je zaradi lipofilnosti in majhnosti hormona enostaven (11). V jedru se T₃ veže na TR, ki je preko ligand-vezavne domene (LBD) povezan z retinoidnim X receptorjem (RXR). Skupaj tvorita heterodimer, ki je preko DNA-vezavne domene tiroidnega receptorja povezan s TRE (tiroidni hormon odzivni element) delom na DNA. V odsotnosti liganda tvori TR v kompleksu s korepresorji neaktivno stanje. Po vezavi T₃ na TR se tvori nov kompleks, kompleks hormon-TR, ki sproži disociacijo korepresorjev in vezavo koaktivatorjev (18). Slednji predstavljajo transkripcijske faktorje, ki se vežejo na DNA in sprožijo stopenjsko prepisovanje genov (19). Najprej poteče

transkripcija DNA v mRNA, nato pa translacija na ribosomih v celični citoplazmi. Rezultat translacije je točno določeno zaporedje aminokislin, ki tvorijo specifične proteine. Le-ti so odgovorni za fiziološke učinke ščitničnih hormonov. Receptorji za ščitnične hormone pa niso lokalizirani le v celičnem jedru. Najdemo jih tudi na membrani mitohondrijev, kjer prav tako sprožajo prepisovanje genov (14). Celoten mehanizem delovanja hormonov je prikazan v Prilogi 5.

Učinki, ki jih preko receptorjev izvajata T3 in T4, so zelo raznoliki in vključujejo več organskih sistemov - tako na celični, kot tudi sistemski ravni. Učinki na celični ravni vključujejo procese presnove in metabolizma. Hormona pospešujeta bazalno presnovo, uravnavata porabo kisika v metabolno aktivnih tkivih, pospešujeta sintezo in razgradnjo proteinov, lipolizo, glikogenolizo, glukoneogenezo in absorpcijo glukoze v prebavilih. Sistemski učinki pa vključujejo učinke na srčno-žilni sistem, skeletne mišice, živčevje, kosti in druge endokrine žleze. (12).

Kateri učinki se bodo izrazili po vezavi na receptor, je odvisno od tega, na katero izoobliko receptorja se bo hormon vezal. Poznamo dve osnovni obliki TR, ki sta kodirani z različnima genoma. TR α izraža gen *THRA* (kromosom 17), TR β pa gen *THRB* (kromosom 3). Posamezne oblike TR se delijo na več izooblik, najpogosteje na TR α -1, TR α -2, TR β -1 in TR β -2 (21, 22). Le-te so razporejene na različnih mestih v telesu. Izooblika TR α -1 se nahaja v srcu in je odgovorna za kardiovaskularne učinke ščitničnih hormonov. Izooblika TR β -1 je lokalizirana v jetrih, kjer vpliva na presnovo maščob in v možganih, kjer vpliva na zdrav razvoj le-teh. TR β -2 se nahaja v hipotalamusu in hipofizi, kjer nadzoruje izločanje hormonov, ki sodelujejo v negativni povratni zvezi (23). Prav tako je pogosto izražena izooblika TR α -2, ki pa za razliko od ostalih, zaradi strukturnih sprememb v LBD, ne more vezati hormonov (21, 24).

Zdaj vemo, da lahko tudi eksogene snovi, podobno kot endogeni hormoni, modulirajo TR. V primerjavi z endogenim hormonom lahko izzovejo enak (agonističen) ali nasproten si učinek (antagonističen). Prav tako poznamo mehanizem, preko katerega endogena hormona T3 in T4 izvajata svoje učinke. V naši raziskavi smo preverili, kakšno sposobnost modulacije TR imajo diklofenak (DFC), 4-hidroksidiklofenak (4'OH-DFC), paracetamol (PAR) ter piceatanol (PIC). Slednja dva sicer ne spadata v skupino NSAID, vendar prav tako izražata protivneti učinek. Podrobnosti o poznanih lastnostih in neželenih/toksičnih učinkih le-teh sledijo v nadaljevanju.

1.3 PARACETAMOL

Paracetamol (N-(4-hidroksifenil)etanamid) je eden najpogosteje uporabljenih analgetikov na svetu. Začetki njegove uporabe segajo že v 19. stoletje, čeprav so ga kot samostojno učinkovino na recept pod imenom Tylenol® uvedli šele leta 1955 v ZDA. Skozi leta uporabe se je v terapevtskih odmerkih izkazal kot izredno varna učinkovina, brez neželenih učinkov na gastrointestinalni trakt. Prav tako je zdravilo izbire pri otrocih saj, za razliko od acetilsalicilne kisline (ASA), ne povzroča Rey-evega sindroma (25, 26).

1.3.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI PARACETAMOLA

Glede na kemijsko strukturo je paracetamol anilid, ki je na para mestu substituiran s hidroksilno funkcionalno skupino. Osnovo molekule anilida predstavlja amin, na katerem je vodik zamenjan z acilnim ostankom očetne kisline (Preglednica I). Po videzu je paracetamol bel kristalinični prašek, brez vonja in rahlo grenkega okusa. Topen je v organskih topilih (metanol, etanol, aceton, etil-acetat), medtem ko je topnost v vodi zelo slaba. Le-ta se povečuje s segrevanjem. Prav tako je slabo topen v etru, netopen pa v petroletru, pentanu in benzenu (27). Ostale osnovne fizikalno kemijske lastnosti so predstavljene v Prilogi 6.

1.3.2 UPORABA PARACETAMOLA

Paracetamol se najpogosteje uporablja v zdravstvu in sicer kot analgetik in antipiretik. Primeren je za zmanjševanje blagih do zmernih akutnih bolečin, kot so glavobol, zobobol, menstrualne bolečine idr. Učinkovit je tudi pri hudih bolečinah, vendar le ob intravenski aplikaciji (26). Za optimalno zmanjševanje bolečine in vročine je priporočeni enkratni odmerek za odrasle 500-1000 mg (28). Na voljo je v več farmacevtskih oblikah (FO), kot so tablete, svečke, sirupi, raztopine za injiciranje itd. ter v različnih kombinacijah z drugimi zdravilnimi učinkovinami (npr. ASA, kodein, kofein, propifenazon, idr.) (29).

Uporaba paracetamola pa ni omejena le na uporabo kot zdravilo. Le-ta se uporablja tudi v industriji pri sintezi zdravil (prekursor za penicilin) in azobarvil ter kot stabilizator H₂O₂ v kozmetičnih izdelkih, ki le-tega vsebujejo (npr. barve za lase) (30).

1.3.3 FARMAKOKINETIKA PARACETAMOLA

Paracetamol se po zaužitju hitro in skoraj popolnoma absorbira iz prebavil. Njegova biološka uporabnost znaša 88 % ± 15 %. Porazdelitev po telesu je hitra in enakomerna. Na plazemske beljakovine se veže v 10-30 % (28). Najvišja serumska koncentracija se doseže 1-2 ure po zaužitju in znaša 5-20 µg/mL oz. 33-132 µmol/L (31). Prehaja v placento in skozi krvno-možgansko pregrado. Majhen delež (0,1-1,85 %) se ga izloči tudi v materino mleko.

Presnova paracetamola v glavnem poteka po dveh poteh. V večinskem deležu se presnavlja v jetrih, kjer tvori konjugate z glukuronsko kislino (60 %), sulfatom (35 %) in cisteinom (3 %). Le-ti se na koncu izločijo preko ledvic. V manjšem deležu se presnavlja z encimom citokromoksidaza P450 2E1 (CYP2E1). Pri tem se tvori reaktivni presnovek N-acetil-parabenzokinon-imin (NAPQI), ki se veže z glutationom in se izloči kot merkapturna kislina. Ob predoziranju pa se NAPQI lahko veže tudi na cistein v proteinih ter povzroči okvare, opisane v nadaljevanju, v podpoglavju »Toksičnost paracetamola«. Približno 1 % paracetamola se izloči v nespremenjeni obliki (31, 28). Prav tako malo, 1-4 %, se ga izloči z žolčem (25).

1.3.4 FARMAKODINAMIKA PARACETAMOLA

Paracetamol je učinkovit analgetik in antipiretik. Njegov mehanizem je kompleksen in še ni dokončno pojasnjen. Zelo verjetno je, da preko vezave v aktivno mesto encima ciklooksigenaze (COX) inhibira sintezo prostaglandinov (PG) iz arahidonske kisline (32). Tak mehanizem delovanja je sicer značilen tudi za NSAID, vendar pa paracetamol za razliko od NSAID ne deluje protivnetno in antitrombotično. Prav tako ne povzroča želodčnih razjed. Analgetičen učinek tako ni povezan z inhibicijo COX-1 in COX-2 kot pri NSAID oz. je le-ta prešibka za izražanje farmakoloških učinkov. Dokazano je, da paracetamol najmočneje inhibira COX v centralnem živčevju (26). Iz tega razloga raziskovalci domnevajo, da v CZŠ obstaja še ena izooblika COX, COX-3, katere inhibicija sproži izražanje farmakoloških učinkov paracetamola (32). Inhibicija COX pa ni nujno vedno neposredna. Obstaja hipoteza, da lahko paracetamol zaradi fenolne skupine v strukturi deluje kot reducent, ki COX inaktivira posredno. Prav tako lahko svoje posredne učinke izraža s poseganjem v sintezo NO ter preko interakcij z opioidnim, kanabinoidnim in serotoninskim sistemom. Pri tem pa je treba poudariti, da so vse to le hipoteze, ki do danes še niso popolnoma potrjene (26).

1.3.5 TOKSIČNOST PARACETAMOLA

Kljub temu, da paracetamol velja za učinkovino z dobrim varnostnim profilom, pa vseeno lahko pride do toksičnih učinkov. Najpogostejši so akutni toksični učinki, ki nastanejo zaradi prevelikega enkratnega odmerka. Odmerek, ki že velja za toksičnega je 7,5 -10 g pri odraslih in 150-200 mg/kg pri otrocih starih od 1-6 let. Znaki akutne toksičnosti so sprva asimptomatski, le-ti se izrazijo šele po 24-48 urah. V splošnem jih lahko razdelimo v štiri faze, predstavljene v Prilogi 7. Jetrna nekroza, ki nastane zaradi predoziranja, je tako najpogostejši toksični učinek paracetamola. Le-ta nastane zaradi izčrpanja zalog glutationa, ki veže reaktivni presnovek NAPQI in tako omogoči, da se le-ta izloči skozi ledvice.

Posledično se, zaradi pomankanja glutationa, presežni NAPQI kovalentno veže na cisteinske preostanke jetrnih proteinov. Z njimi tvori reaktivne produkte (adukte), ki sprožijo oksidacijske reakcije. Slednje povzročijo celično smrt, kar vodi v organsko odpoved. Dovzetnost za hepatotoksičnost dodatno povečujejo še številni dejavniki, kot so npr. zdravljenje z zdravili, ki inducirajo jetrne encime (antiepileptiki, barbiturati idr.), zmanjšana razpoložljivost glutationa, zmanjšana možnost konjugacije, kronično uživanje etanola ter okvarjeno delovanje ledvic in jeter (29, 31). Drugi najpogostejši toksični učinek paracetamola je nefrotoksičnost, katere mehanizem je v osnovi enak kot pri hepatotoksičnosti. Zaradi prekomerne tvorbe NAPQI pride do nekroze ledvičnih tubulov (29). Vedno več pa je tudi predkliničnih študij, kjer z *in vivo* ter *in vitro* testi proučujejo toksičen vpliv paracetamola na razmnoževanje in embrionalni razvoj, genotoksičnost ter rakotovornost. Do danes pridobljeni podatki iz predkliničnih študij ne kažejo posebnega tveganja za človeka (28, 29, 33). Osnovni toksikološki parametri za PAR so zbrani v prilogi 8. Njegov, do danes znan, vpliv na moteno delovanje endokrinega sistema pa je predstavljen v poglavju »Rezultati in razprava - Paracetamol«.

1.4 DIKLOFENAK IN NJEGOV HIDROKSILIRAN METABOLIT (4' OH-DFC)

Diklofenak (2-(2-(2,6-diklorofenilamino)fenil)ocetna kislina) je učinkovina, ki spada v široko skupino nesteroidnih protivnetnih zdravil (NSAID). Skupaj z ostalimi predstavniki te skupine je bil razvit po letu 1900, ko so že dobro vpeljano salicilno kislino nadgradili in razvili acetilsalicilno kislino (ASA) (34). Razvilo ga je podjetje Ciba-Geigy (današnji Novartis) leta 1973 in ga pričelo tržiti pod zaščitenim imenom Voltaren® (35). Skupina NSAID je strukturno zelo heterogena. Kljub tolikšni raznolikosti pa je končni učinek vseh predstavnikov enak. Vsi blažijo bolečino in vnetje ter znižujejo povišano telesno temperaturo (34).

1.4.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI DIKLOFENAKA

Diklofenak je derivat očetne kisline, ki je substituirana s fragmentom sestavljenim iz dveh fenilnih obročev, povezanih preko aminske funkcionalne skupine (Preglednica I). Obroč, ki ne vsebuje karboksilne funkcionalne skupine, je na mestih 2 in 6 substituiran s klorom. Karboksilna funkcionalna skupina v strukturi omogoča pripravo soli, ki izboljšujejo fizikalno kemijske lastnosti diklofenaka, pomembne za ugodnejšo farmakokinetiko od same kisline. Terapevtsko uporabni obliki soli sta sol z natrijem in sol s kalijem (36). Po videzu je diklofenak bel kristaliničen prašek. Topnost v vodi znaša 2,37 g/L in se manjša z nižanjem

pH. V kislih raztopinah je le-ta manjša od 1 g/L. Obsežnejši podatki o topnosti se nanašajo predvsem na njegovo obliko z natrijem, saj je najpogostejša. Za natrijev diklofenak velja, da je dobro topen v metanolu, topen v etanolu, acetonu in DMSO, medtem ko je topnost v cikloheksanu, acetonitrilu in HCl slaba. Netopen je v etru (37). Ostale osnovne fizikalno kemijske lastnosti, vključno z lastnostmi 4'OH-DFC, so predstavljene v Prilogi 9.

1.4.2 UPORABA DIKLOFENAKA

Diklofenak je učinkovina z analgetičnim, antipiretičnim ter antiflogističnim (protivnetnim) delovanjem (41). V terapevtske namene se ne uporablja v osnovni obliki, pač pa v obliki soli. Najpogosteje uporabljeni obliki sta že omenjeni soli s kalijem in natrijem (42). Kalijev diklofenak, ki se hitreje raztopi in posledično tudi hitreje absorbira, je primeren za lajšanje bolečine, kjer je potreben hiter nastop delovanja. Uporablja se pri bolečinah v mišicah in križu, pri menstrualnih krčih, zobobolu, migrenskem glavobolu, pri poporodnih bolečinah, bolečinah zaradi ledvičnih ali žolčnih kamnov, pri športnih poškodbah itd. (41). Za razliko od kalijevega, pa je absorpcija natrijevega diklofenaka počasnejša. Le-ta je zato primeren za zmanjševanje vnetja pri revmatskih boleznih (revmatoidni artritis, osteoartritis, protin) in drugih vnetnih stanjih (42, 43). Diklofenak je na voljo v različnih FO (tablete, svečke, geli, raztopine za injiciranje), primernih za sistemsko kot tudi lokalno aplikacijo (42). Njegov terapevtski odmerek za odrasle znaša 75-150 mg na dan (43).

1.4.3 FARMAKOKINETIKA DIKLOFENAKA

Farmakokinetični podatki se v literaturi nanašajo predvsem na natrijev diklofenak. Le-ti se od kalijevega bistveno ne razlikujejo (41).

Natrijev diklofenak se po zaužitju hitro in dobro absorbira. Absorpcija je več kot 90-odstotna, vendar njegova biološka uporabnost zaradi učinka prvega prehoda znaša le 60 % (43). Najvišja serumska koncentracija se doseže v 1-4 urah po zaužitju in znaša od 1,4-3,0 µg/mL oz. 4,7-10,1 µmol/L(44). Na plazemske beljakovine, predvsem albumin, je vezan v 99 %. Dobro prehaja v tudi sinovialno tekočino, kjer doseže 60-70 % plazemske koncentracije (43). Presnavlja se v jetrih in sicer s hidroksilacijo in metoksilacijo (CYP2C9, CYP3A4 in CYP3A5), nakar sledi konjugacija z glukuronsko kislino ali sulfatom (45, 46). Približno 70 % presnovljenega natrijevega diklofenaka se izloči z urinom. Samo 1 % se ga izloči v nespremenjeni obliki, preostali del pa z žolčem ali blatom (43). V človeškem urinu in plazmi so odkrili pet različnih metabolitov diklofenaka in sicer, 4'-hidroksi, 5-hidroksi, 3'-hidroksi, 4',5-dihidroksi in 3'-hidroksi-4'-metoksidiklofenak (Priloga 10). Glavni med

njimi je 4'-hidroksidiklofenak, ki izkazuje 30 % protivnetne in antipiretične aktivnosti osnovne spojine (45, 46).

1.4.4 FARMAKODINAMIKA DIKLOFENAKA

Za razliko od paracetamola je mehanizem delovanja diklofenaka bolj poznan. NSAID, katerih predstavnik je diklofenak, delujejo preko inhibicije encima COX in tako zavirajo nastanek vnetnih prostaglandinov iz arahidonske kisline. Do danes poznamo tri izoblike encima COX, vendar NSAID v večini delujejo le na COX-1 in COX-2. Njihov učinek na COX-3 je zaradi slabšega prehajanja skozi krvno-možgansko pregrado izražen v manjši meri. Za diklofenak in še dva predstavnika NSAID (ibuprofen in indometacin) velja, da inhibirajo vse tri izoblike encima. Med njimi ima največjo inhibicijsko aktivnost prav diklofenak. Terapevtske učinke diklofenak izvaja preko inhibicije encima COX-2 (COX-3), medtem ko je inhibicija COX-1 povezana z njegovimi neželenimi učinki. COX-2 je inducibilen encim, ki katalizira sintezo vnetnih prostaglandinov pri poškodbah ter bolezenskih stanjih. COX-1 pa je, za razliko od COX-2, konstitutiven encim in je v telesu aktiven neprestano. Preko sinteze prostaglandina PGI₂ in tromboksana vpliva na delovanje ledvic, aktivacijo trombocitov ter zaščito želodca. Inhibicija vseh izoblik COX tako res odpravi bolečino, vročino in vnetje, vendar kronična uporaba diklofenaka, zaradi inhibicije COX-1 povzroča želodčne razjede ter neželene učinke na ledvicah (48).

1.4.5 TOKSIČNOST DIKLOFENAKA

Literaturni podatki kažejo, da so učinki pri akutnem predoziranju z diklofenakom vezani predvsem na prebavo, CŽS, ledvice in jetra. Prebavne težave se kažejo s slabostjo, bruhanjem in bolečinami v trebuhu, motnje CŽS pa kot omotičnost, šumenje v ušesih, razdražljivost, motnje zavesti in tudi kot depresija dihanja (43). Nefrotoksičnost je posledica inhibicije konstitutivnega encima COX-1 (48). Zaradi inhibicije se zmanjša sinteza vazodilatatornih prostaglandinov PGE₂ in PGI₂, ki v ledvicah skupaj z vazokonstriktornim angiotenzinom II ohranjajo konstanten pretok in glomerulno filtracijo (GF). Pomankanje privede do prevlade vazokonstriktornega delovanja angiotenzina II, kar vodi v zmanjšanje pretoka ter posledično v akutno ledvično odpoved (48, 49). Za razliko od nefrotoksičnosti, pa mehanizem hepatotoksičnosti diklofenaka še ni do konca raziskan. V eni izmed številnih študij so preučevali učinke diklofenaka na jetrnih celicah človeka in podgan. Rezultati so pokazali, da je hepatotoksičnost diklofenaka predvsem posledica disfunkcije hepatocitnih mitohondrijev. Diklofenak in njegovi hidroksilirani metaboliti namreč omejujejo sintezo

adenozin trifosfata (ATP), kar posledično oslabi vse od ATP odvisne procese v hepatocitih (glukoneogenezo, sintezo albumina idr.) in povzroči propad le-teh (50). Podatki o kronični toksičnosti ne navajajo posebnih tveganj za človeka. *In vitro* ter *in vivo* študije so pokazale, da lahko diklofenak povzroči fototoksičnost, medtem ko kancerogenega, mutagenega ter teratogenega učinka ne izkazuje (43). Osnovni toksikološki parametri za DFC so zbrani v prilogi 8. Njegov, do danes znan, vpliv na moteno delovanje endokrinega sistema pa je predstavljen v poglavju »Rezultati in razprava - Diklofenak«.

1.5 PICEATANOL

Piceatanol (3',3,4',5-tetrahidroksistilben) je naravni metabolit resveratrola (3,4',5-trihidroksistilbena) (53). Spada v skupino topnih polifenolnih spojin, imenovano stilbeni. Najdemo ga povsod, kjer najdemo resveratrol, vendar v manjših koncentracijah. Rastline oz. živila, ki vsebujejo piceatanol so naslednja: japonski dresnik, borovnice, robide, vrste rdečega grozdja (*Vitis vinifera* in *Vitis thunbergii*), rabarbara, arašidi, mandlji, kamilica, rdeče vino ter črni in zeleni čaj (54, 55). Piceatanol in ostale polifenolne spojine, delujejo kot fitoaleksini in predstavljajo naravno zaščitno sredstvo za rastline. Njihova sinteza pospešeno poteka ob neugodnih razmerah, kadar so rastline izpostavljene patogenom (virusom, glivam in bakterijam), ultravijolični svetlobi ali težkim kovinam iz tal. Zaradi svojega antioksidativnega, protivnetnega, antitumorskega in antikancerogenega delovanja so potencialne snovi za izboljševanje zdravstvenega stanja ljudi (54, 56).

1.5.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI PICEATANOLA

Piceatanol je spojina naravnega ali sintetičnega izvora. V svoji strukturi vsebuje dva fenolna obroča, ki sta med seboj povezana preko stirenske dvojne vezi (Preglednica I). Le-ta omogoča vrtljivost in obstoj molekule v dveh izomernih oblikah, *cis* ali *trans*. Slednja je geometrijsko bolj stabilna (54). Po videzu je svetlo rjav do rumen kristaliničen prašek, topen v DMSO in etanolu. Netopen je v vodi (54, 57). Ostale osnovne fizikalno kemijske lastnosti so predstavljene v Prilogi 11.

1.5.2 UPORABA PICEATANOLA

Uporaba piceatanola še ni tako razširjena zaradi pomankanja dokazov o učinkovitosti spojine. Študije navajajo, da ima piceatanol zaradi strukturne podobnosti z resveratrolom enako širok spekter delovanja (56). Nekatere celo navajajo, da je njegova učinkovitost zaradi dodatne hidroksilne skupine v strukturi boljša kot pri resveratrolu. Slednji se namreč zelo hitro metabolizira in izgubi biološko aktivnost. Vendar pa kljub dobrim fizikalno kemijskim

lastnostim piceatanol do danes še ni primeren za klinično uporabo. Potrebne so namreč dodatne študije, ki bodo podrobneje preučile njegove biološke, presnovne ter toksične poti v organizmu (59). Na voljo je le v obliki prehranskih dopolnil, skupaj z resveratrolom in drugimi stilbeni, ki dopolnjujejo delovanje antioksidantov, vitaminov in encimov pri obrambi pred oksidativnim stresom. (55).

1.5.3 FARMAKOKINETIKA PICEATANOLA

Farmakokinetični podatki o piceatanolu so pridobljeni z *in vitro* ter *in vivo* študijami. Rezultati *in vivo* študij na podganah so pokazali, da se piceatanol po peroralnem zaužitju hitro absorbira, njegova maksimalna plazemska koncentracija se vzpostavi po 45-120 minutah in znaša 710 ± 219 ng/mL. Biološka uporabnost, kadar se kot nosilec za piceatanol uporablja 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, znaša $50,7 \pm 15,0$ % (54). V krvi se zaradi slabe topnosti piceatanol veže na prenašalne proteine in sicer na transtiretin (TRR), transportni protein za tiroksin (55). Glede metabolizma piceatanola obstajata dve *in vitro* študiji (56). Obe potrjujeta, da se piceatanol presnavlja s konjugacijo s sulfatom ali glukuronsko kislino. Pri tem nastanejo piceatanol monoglukuronidi, monosulfati in disulfati, ki se pretežno izločajo preko jeter, saj je skupni jetrni očistek ($1,43 \text{ L h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) večji od skupnega plazemskega ($2,13 \pm 0,92 \text{ L h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$). Glukuronidirane presnovke so delno zaznali tudi v urinu. Poleg vseh navedb so avtorji ugotovili tudi manjše povečanje plazemske koncentracije piceatanola na vsakih 6 ur. Iz tega sklepajo, da je piceatanol podvržen enterohepatičnemu kroženju (56).

1.5.4 FARMAKODINAMIKA PICEATANOLA

Številne *in vitro* študije navajajo, da ima piceatanol širok spekter bioloških aktivnosti (54). Potrjeno je, da deluje kot antioksidant, ima protivnetni učinek, deluje proti več vrstam raka, zavira adipogenezo, deluje kot antidiabetik, spodbuja aktivnost osteoblastov, ima potencial za preprečevanje Alzhajmerjeve bolezni in astme ter učinkovito pomaga pri preprečevanju kardio-vaskularnih bolezni (54, 59). Mehanizmi, s katerimi deluje proti vsemu naštetemu, so predstavljeni v Prilogi 12.

1.5.5 TOKSIČNOST PICEATANOLA

Piceatanol velja za spojino ki ima, zaradi širokega razpona blagodejnih učinkov visok terapevtski potencial. Njegovi neželeni učinki še niso poznani. Na morebitno toksičnost nakazujejo le podatki iz študij, ki pravijo, da spojina izkazuje hormetičen učinek. To je učinek, ki v odvisnosti od odmerka daje nasprotujoč si učinek. Dokazano je, da piceatanol v

nizkih koncentracijah (50 nM) deluje prokancerogeno, medtem ko nasproten, antikancerogen učinek, doseže pri koncentracijah > 25 µM. To so podatki, ki izvirajo iz *in vitro* študij. Zelo malo pa je študij na normalnih (nerakavih) celicah in živalih. Za uveljavitev piceatanola v terapevtske namene je tako potrebno s predkliničnimi študijami pridobiti zanesljive podatke o njegovi toksičnosti pri ljudeh (56). Do sedaj znani podatki o delovanju PIC na endokrini sistem so predstavljeni v poglavju »Rezultati in razprava - Piceatanol«.

1.6 PREISKOVANE SPOJINE V OKOLJU

Zaradi vse pogostejše uporabe zdravil - tako v humani, kot tudi v veterinarski medicini - se je v zadnjem desetletju povečala tudi njihova prisotnost v okolju. V vodnem območju, ki zajema površinske, odpadne, podzemne in celo pitno vodo, so jih znanstveniki zaznali v nano oz. v nizkem mikro območju na liter (Priloga 13) (60). Glavne skupine zdravil, ki so potencialno škodljive za okolje, so naslednje: antibiotiki, hormoni, antikancerogene učinkovine ter analgetiki in protivnetna zdravila. V slednje dve skupini spadajo tudi naše preiskovane spojine. Zdravilne učinkovine po vnosu v telo delujejo na tarčne celice, se nato metabolizirajo in izločijo iz telesa. Ko pridejo v okolje, nespremenjene ali v obliki aktivnih metabolitov, lahko na isti način delujejo pri živalih, ki imajo identične ali podobne tarčne organe in celice. Problem dodatno povečuje kompleksnost delovanja zdravilnih učinkovin. Le-te namreč ne delujejo le na en receptor, tarča njihovega delovanja jih je lahko več ali pa so posredi tudi drugi nereceptorski mehanizmi (61).

Ekotoksikološki učinki zdravil na vodne in kopenske organizme v okolju so še vedno slabo poznani. Trenutno največ raziskav poteka na področju akutnih ekotoksikoloških vplivov zdravilnih učinkovin na vodne organizme. Ti so zanimivi predvsem zato, ker so praktično vse življenje izpostavljeni ostankom slabo prečiščenih odpadnih vod. V literaturi obstajajo podatki o akutni toksičnosti zdravilnih učinkovin za vodne organizme, vendar zgolj ti niso dovolj za določitev ocene tveganja. Pri oceni potencialne toksičnosti učinkovin za okolje si lahko, poleg eksperimentalnih podatkov, pomagamo tudi z matematičnimi modeli (npr. QSAR - Quantitative Structure-Activity Relationship). Modeli so sicer uporabni, vendar ne morejo nadomestiti *in vivo* ter *in vitro* poskusov. Rezultati dosedanjih raziskav o akutni izpostavljenosti nizkim koncentracijam zdravilnih učinkovin v okolju nakazujejo, da le-ta ne predstavlja posebnega tveganja za človeka in okoljske organizme. Problem nastane, ko se vprašamo, kako pa je s kronično izpostavljenostjo nizkim koncentracijam. Podatki o tem sicer večinoma še niso na voljo, vendar pa se predvideva, da bo ocena tveganja drugačna, kot pri akutni izpostavljenosti (61).

2 NAČRT DELA

Okolje, v katerem živimo, je vse prej kot čisto. Zaradi sodobnega načina življenja je v njem vedno več snovi, ki niso naravno prisotne. Le-te imajo potencial, da preko posrednih ali neposrednih učinkov škodljivo vplivajo na zdravje ljudi in živali. Za raziskovalce so vse bolj zanimive snovi, ki delujejo kot HM. Številne avtoimunske in druge bolezni so namreč pogojene prav z motnjami v delovanju endokrinega sistema. Do sedaj je znanih največ raziskav o vplivu HM na estrogenski in androgeni hormonski sistem, medtem ko so ostala endokrina področja še precej neraziskana. Iz tega razloga smo se odločili, da bomo v magistrski nalogi poskusili ovrednotiti učinke nekaterih protivnetnih učinkovin na tiroidne receptorje. Morebitne agonistične in antagonistične učinke izbranih učinkovin bomo določali z *in vitro* testom. Kot modelni sistem za ugotavljanje le-teh bomo uporabili celično linijo GH3.TRE-Luc, ki izraža funkcionalne tiroidne α - in β -receptorje. Za testiranje bomo uporabili štiri učinkovine s podobnim farmakološkim delovanjem. Razdelimo jih lahko na dve skupini. V prvo spadajo DFC, predstavnik NSAID, in njegov hidroksiliran metabolit - 4'OH-DFC ter PAR. Skupno vsem je, da imajo analgetični, antipiretični ter protivnetni učinek. Slednji je pri PAR šibkeje izražen, zato ga ne uvrščamo med NSAID. Pa vendar je PAR, enako kot DFC, najpogosteje uporabljena zdravilna učinkovina. Prav zaradi njune (pre)pogoste uporabe nas zanimajo morebitni učinki na tiroidni sistem. Predstavnik druge skupine je PIC. Za testiranje smo ga izbrali zato, ker prav tako deluje protivnetno kot predhodno omenjene spojine, hkrati pa izkazuje še številne druge blagodejne učinke na telo. Ker še ti niso popolnoma raziskani, prav tako ne njegovi neželeni učinki, je potreba po določanju vpliva tudi na TR še toliko večja.

Eksperimentalni del bo sestavljen iz dveh delov. V prvem delu bomo s pomočjo testa celične proliferacije (test citotoksičnosti z resazurinom) določali citotoksičnost preiskovanih spojin z začetno koncentracijo 200 μ M. V primeru, da se bo spojina izkazala za citotoksično, bomo poiskali ustrezno nižjo koncentracijo in le-to uporabili za testiranje v drugem delu. Drugi del bo namenjen določanju agonističnih in antagonističnih učinkov izbranih spojin na TR. Uporabili bomo že dobro uveljavljen *in vitro* presejalni test, tj. luciferazni test. Vsako učinkovino bomo testirali v več koncentracijah. Začeli bomo z najvišjo necitotoksično in nato zniževali koncentracijo do tistih, ki so lahko terapevtsko prisotne v organizmu. Agonistično delovanje spojin bomo določali neposredno. Kot pozitivno kontrolo bomo uporabili agonist na TR, T3. Antagonistično delovanje pa bomo določali posredno, preko

zmanjševanja učinka naknadno dodanega agonista T3. Kot pozitivno kontrolo bomo uporabili antagonist na TR, BPA.

S tem testom bomo poskušali potrditi ali zavrniti naslednje hipoteze:

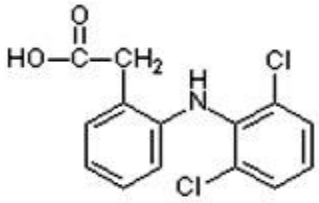
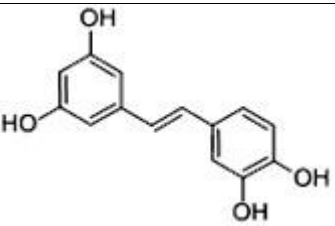
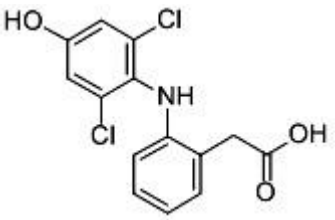
1. Izbrane spojine so sposobne modulirati TR, saj vse v svoji strukturi vsebujejo vsaj en strukturni element, značilen za endogeni hormon trijodtironin (prosta hidroksilna skupina, halogeni element, prosta karboksilna skupina).
2. Najmočnejši agonist TR je 4'OH-DFC, saj edini v svoji strukturi vsebuje vse strukturne elemente, značilne za trijodtironin.

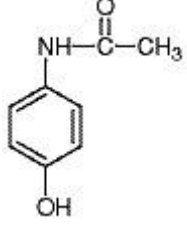
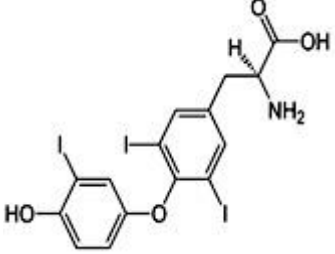
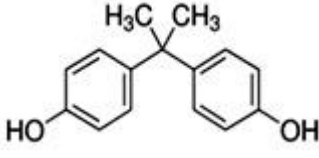
3 MATERIALI IN METODE

3.1 TESTIRANE SPOJINE

Spojine, katerih učinke smo preiskovali na tiroidnih receptorjih (TR), so bile paracetamol (PAR), diklofenak (DFC), 4-hidroksidiklofenak (4'OH-DFC) ter piceatanol (PIC). V luciferaznem testu smo kot kontrolne spojine uporabili trijodtironin (T3), ki je agonist na TR ter bisfenol A (BPA), ki je antagonist na TR. Vse preiskovane spojine, vključno s kontrolama, so predstavljene v preglednici I.

Preglednica I: *Preiskovane spojine in kontroli, vključno z imenom ter oznako posamezne spojine, kemijsko strukturo ter molekularno maso. Podčrtano ime pod imenom spojine predstavlja kemijsko ime le-te, beseda v oklepaju njenega proizvajalca, navedeni odstotki pa se nanašajo na čistost posamezne spojine.*

Ime spojine	Oznaka	Kemijska struktura	Molska masa (g/mol)
DIKLOFENAK <u>2-(2-(2,6-diklorofenilamino)fenil)ocetna kislina</u> (TCI) > 98 %	DFC		296,15
PICEATANOL <u>3',3,4',5-tetrahidroksistilben</u> (TCI) > 98 %	PIC		244,24
4-HIDROKSIDIKLOFENAK <u>2-(2-(2,6-dikloro-4-hidroksifenilamino)fenil)ocetna kislina</u> (TRC) ≥ 97 %	4'OH-DFC		312,15

Ime spojine	Oznaka	Kemijska struktura	Molska masa (g/mol)
PARACETAMOL <u>N-(4-hidroksifenil)etanamid</u> (Sigma Aldrich) ≥ 99 %	PAR		151,16
TRIJODTIRONIN (T3) <u>2-amino-3-[4-(4-hidroksi-3-jodo-fenoksi)-3,5-dijodo-fenil]propanojska kislina</u> (Sigma Aldrich) 95 %	T3		650,98
BISFENOL A <u>2,2-bis(4-hidroksifenil)propan</u> (Sigma Aldrich) ≥ 99 %	BPA		228,29

3.1.1 PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN

Raztopine testiranih spojin smo pripravljali v mikrocentrifugirkah, katerih izhodiščne koncentracije so bile 1000-krat višje od dejansko testiranih. Spojine smo natehtali na analitski tehtnici (Mettler toledo, Greifensee, Švica) in jih raztopili v 99,9 % DMSO (Sigma-Aldrich, MO, ZDA). Nato smo spojine 1000-krat redčili s PCM medijem, katerega sestava je opisana v podpoglavju »Osnove dela s celicami - Izčrpavanje celic«. V nadaljevanju, da bi pridobili ustrezno nižje koncentracije, smo za redčenje uporabili raztopino 0,1 % DMSO v PCM mediju. Končna koncentracija DMSO-ja v vseh raztopinah je znašala 0,1 % (v/v). Tako nizko koncentracijo DMSO-ja je potrebno vzdrževati, kajti koncentracija, višja od 1 %, deluje citotoksično.

Preglednica II: *Koncentracije testiranih spojin. Vsako posamezno spojino smo testirali v vseh navedenih koncentracijah. Le-te smo pridobili z redčenjem po postopku, opisanem v prejšnjem odstavku.*

VZOREC	KONCENRACIJA SPOJINE (μM)
1	200
2	100
3	10
4	1
5	0,1
6	0,01
7	0,001*
8	0,0001**

* Koncentracija je bila testirana pri določanju agonističnega in antagonističnega delovanja 4'OH-DFC (luciferazni test)

** Koncentracija je bila testirana le pri določanju antagonističnega delovanja 4'OH-DFC (luciferazni test)

3.2 CELIČNA LINIJA GH3.TRE–Luc

V študiji smo uporabljali celično linijo GH3.TRE–Luc (darilo univerze Wageningen, Nizozemska). GH3 celice so epiteljske celice tumorja hipofize podgane, ki izražajo funkcionalne tiroidne α - in β -receptorje. Morfološko jih uvrščamo med pritrjene oz. adherentne celice (69, 70).

Celična linija GH3.TRE–Luc je bila pridobljena s postopkom stabilne transfekcije. V celice GH3 so vstavili pGL4CP - SV40 - 2xtaDR4- reporterski plazmid, ki kodira encim luciferazo. Tako so pridobili stabilno reportersko celično linijo primerno za preizkušanje spojin ali so sposobne modilirati transkripcijske aktivnosti TR (α in β).

Rezultati študij kažejo, da je na novo razvita celična linija GH3.TRE–Luc zanesljiva pri *in vitro* testih visoke zmogljivosti. Omogoča preprosto, hitro in specifično testiranje učinkovin za agonistično in antagonistično delovanje na TR (α in β). Dobra ponovljivost rezultatov hkrati potrjuje testiranje na tej celični liniji kot obetavno orodje za identifikacijo in kvantifikacijo učinkovin, ki delujejo kot hormonski motilci na TR (71).

3.2.1 OSNOVE DELA S CELICAMI

Celotno delo s celicami je potekalo v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka-LAF komori (Iskra, Šentjernej, Slovenija), ki je nameščena v prostoru, ločeno od preostalega dela laboratorija. V prostoru veljajo posebna pravila za aseptično delo, ki zagotavljajo sterilnost. Pravila vključujejo postopke čiščenja in razkuževanja s 70-odstotnim etanolom, ki preprečujejo razmnoževanje in prenos mikroorganizmov na površine in materiale s katerimi delamo. Dostop mikroorganizmom na delovno površino onemogoča tudi sama LAF komora s svojo zgradbo in stalnim pretokom filtriranega zraka v vertikalni smeri od zgoraj navzdol.

Pred pričetkom dela smo komoro pol ure obsevali z ultravijolično svetlobo in jo na tak način razkužili. Nato smo vse delovne površine komore očistili s 70-odstotnim etanolom. Le-tega smo uporabljali tudi za razkuževanje pribora in reagentov pred vnosom v LAF komoro ter za razkuževanje rokavic, ki smo jih uporabljali med samim delom.

ODMRZOVANJE CELIC

Pred pričetkom dela s celicami je bilo potrebno le-te odmrzniti. V obliki suspenzije so bile shranjene v krioviali (TPP, Transadingen, Švica) z volumnom 1 mL in zmrznjene pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. V enem mililitru je bilo shranjenih približno $3,2 \times 10^6$ celic. Ko smo celice vzeli iz zamrzovalne komore, smo jih prenesli v vodno kopel s približno $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jih odtajali v času 2-3 minut. Nato smo celice prenesli v centrifugirko, v kateri je že bilo 9 mL gojitvenega medija, katerega sestava je opisana v naslednjem podpoglavju, »Gojenje celic«. Celotno zmes smo centrifugirali v centrifugi (Tehtnica, Železniki, Slovenija) 5 minut pri 1000 obratih/min. Po končanem centrifugiranju smo supernatant odstranili s pipeto in zavrgli ter na tak način odstranili krioprotektant (10 % DMSO). K preostanku celic, ki so ostale v sedimentu, smo nato dodali 5 mL svežega gojitvenega medija in premešali na vibracijskem mešalu (Tehtnica, Železniki, Slovenija). Na koncu smo celotno vsebino iz centrifugirke prenesli v sterilno gojitveno posodo s površino 75 cm^2 (TPP, Transadingen, Švica), dodali še 5 mL gojitvenega medija in inkubirali v specializiranem inkubatorju MCO-18AIC (Sanyo, ZDA) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v atmosferi s 5 % CO_2 .

GOJENJE CELIC

Celice za svoje preživetje in uspešno razmnoževanje potrebujejo ustrezne pogoje, ki jih zagotovimo tako, da jih shranjujemo v kontroliranem okolju in ustreznem gojitvenem mediju. Kontrolirano okolje zagotovimo tako, da celice gojimo v sterilnih gojitvenih posodah v specializiranem inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Sterilne gojitvene posode so prozorne posode v obliki črke T s perforiranim zamaškom. Vrat posode je narejen tako, da omogoča enostavno dodajanje in odzemanje medija s pipeto, hkrati pa onemogoča izlivanje. Notranje površine so opto-mehansko obdelane, kar povečuje celično adhezijo in rast (72).

Ustrezen gojitveni medij je tisti, ki vsebuje sestavine, ki omogočajo celicam, da preživijo in se uspešno razmnožujejo. Gojitveni medij za celično linijo GH3.TRE–Luc je bil sestavljen iz:

- 500 mL medija DMEM/F12 (Gibco, ZDA)
(DMEM/F12 je osnovni medij, sestavljen iz anorganskih soli, aminokislin, vitaminov in drugih snovi, potrebnih za uspešno rast in razmnoževanje celic. Na tržišču je na voljo že v naprej pripravljeni obliki)
- 50 mL fetalnega govejega seruma - FBS (Gibco, ZDA)
- 5 mL raztopine antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 µg/mL (Sigma-Aldrich, MO, ZDA).

Tako pripravljen gojitveni medij smo shranjevali v hladilniku in ga pred uporabo v inkubatorju segreli na 37 °C. Celicam smo ga zamenjali na 2-3 dni.

ŠTETJE CELIC

Štetje celic je postopek, s katerim smo si izračunali volumen v mediju suspendiranih celic, ki je vseboval priporočeno število celic za presaditev oz. nasaditev. Pri presajanju je bilo priporočeno doseči 6×10^6 celic na gojitveno posodo, pri nasajanju pa koncentracijo 3×10^5 celic/mL. Celoten protokol presajanja in nasajanja celic je opisan v nadaljevanju. Celice smo šteli s pomočjo barvila tripan modro (Gibco, ZDA). To je vitalno barvilo, ki ni toksično za celice, prehaja pa v mrtve celice in jih obarva modro. Žive celice ostanejo bele in te mi štejemo (bele pike na modri podlagi).

Za štetje smo si v mikrocentrifugirki pripravili mešanico celic v suspenziji z barvilom tripan modro v razmerju 1:1 (80 μ L celic in 80 μ L barvila). 1 μ L tako pripravljene mešanice smo nanegli na hemocitometer (Brand, Wertheim, Nemčija). Gre za objektno stekelce s pravokotno zarezo, ki ustvarja komoro. S pomočjo kapilarnega vleka napolnimo to komoro z našo mešanico in pod invertnim svetlobnim mikroskopom Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japonska) preštejemo celice. Pod mikroskopom vidimo 4 kvadrante. Vedno smo prešteli celice v dveh kvadrantih v razponu 16 kvadratov (4x4). Šteli smo trikrat in nato izračunali povprečno vrednost celic v dveh kvadrantih.

Postopek za izračun volumna celic, ki smo jih potrebovali za presajanje, je bil enak kot pri nasajanju (štetje celic in izračun volumna po enačbi).

PRESAJANJE:

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

c... koncentracija povprečnega števila prešteti celic v dveh kvadrantih ($_ \times 10^4$ celic/mL)

N... priporočeno število celic, ki ustreza 80 % konfluenci (6 x 10^6 celic)

V... volumen zmesi, ki ga računamo ($V=N/c$)

Enačba 1: Izračun potrebne volumna celic pri presajanju

NASAJANJE:

$$V = \frac{V(\text{cel}) \times c(\text{prip})}{c(\text{dej})}$$

V... volumen celic v suspenziji, ki nas zanima

V(cel)... volumen celotne zmesi (celice + medij), ki ga potrebujemo za vse vdolbinice na plošči (izračunamo ga tako, da število vdolbinic pomnožimo z volumnom v eni vdolbinici (100 μ L) in še prištejemo 3 mL zaradi izgub)

c(prip)... priporočena koncentracija (3 x 10^5 celic/mL)

c(dej)... koncentracija (dejanska), ki jo dobimo s štetjem

Enačba 2: Izračun potrebne volumna celic pri nasajanju

PRESAJANJE CELIC

Celice smo presajali v fazi, ko so dosegle 90 % konflueno. Le-to smo preverili pod invertnim svetlobnim mikroskopom Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japonska). Ker je celična linija GH3.TRE–Luc metabolno zelo aktivna, smo postopek presajanja izvajali na približno 7 dni. Potrebovali smo naslednje reagente:

- fosfatni pufer-PBS (Gibco, ZDA)
- 0,25 % tripsin (Gibco, ZDA)
- gojitveni medij
- barvilo tripan modro (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Pred pričetkom smo vse reagente, razen barvila tripan modro in PBS, v inkubatorju segreti na približno 37 °C. Posebno previdni smo bili pri tripsinu, saj predolgo segrevanje zmanjšuje njegovo aktivnost (73).

Pri presajanju smo morali najprej iz gojitvene posode odstraniti izrabljeni gojitveni medij. Le-tega smo s serološko pipeto za enkratno uporabo (TPP, Transadingen, Švica) izvlekli in zavrgli. Nato smo celice spirali s 5 mL PBS, da smo zares odstranili ves gojitveni medij in ga nato zavrgli. Dodali smo 1 mL 0,25 % tripsina, ki je povzročil, da so se celice začele odlepljati od podlage. Gojitveno posodo s tripsinom smo premikali približno 30 sekund, da smo omočili celotno površino. Nato samo tripsin izvlekli in zavrgli. Proces odlepljanja celic traja 5 minut. Za ta čas smo celice inkubirali pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Po inkubacijskem času smo celice pogledali pod mikroskopom in preverili, ali so se celice res odlepili od podlage. Odlepljenim celicam smo dodali 10 mL svežega gojitvenega medija, da je zaustavil delovanje tripsina in vse skupaj s pipeto prenesli v 15 mL centrifugirko. Vsebinsko smo premešali na vibracijskem mešalu, nato pa s pipeto izvlekli 80 µL zmesi, ki smo jo prenesli v mikrocentrifugirko, h kateri smo dodali enak volumen barvila tripan modro. Tako pripravljena zmes nam je služila za štetje celic na hemocitometru. V novo gojitveno posodo smo prenesli takšen volumen celic, ki je zagotovil priporočeno število celic (6×10^6). Kolikšen je bil ta volumen, smo preračunali iz števila prešteti celic na hemocitometru (Enačba 1). Tako pripravljene gojitvene posode smo inkubirali 24 ur pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂.

IZČRPAVANJE CELIC

Da bi preprečili preveliko namnožitev celic, ki bi lahko vplivala na uspešnost metode, smo dodali medij, ki je s svojimi sestavinami preprečil ugodno rast in razmnoževanje celic ter hkrati onemogočil, da bi sestavine gojitvenega medija delovale na celično linijo in dale lažno pozitivne rezultate. To je bil t. i. PCM medij, sestavljen iz:

- 500 mL medija DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 112 μ L etanolamina (Sigma-Aldrich, Nemčija, ≥ 99 %)
- 500 μ L insulina (Sigma-Aldrich, Nemčija, ≥ 95 %)
- 6,25 mL govejega serumskega albumina-BSA (Sigma-Aldrich, Nemčija, ≥ 98 %)
- 100 μ L humanega apo-transferina (Sigma-Aldrich, Nemčija, ≥ 98 %)
- 100 μ L natrijevega selenita (Sigma-Aldrich, Nemčija ≥ 98 %)
- 5 mL raztopine antibiotika penicilina 10000 U/mL in streptomicina 10000 μ g/mL (Sigma-Aldrich, MO, ZDA).

Medij ne vsebuje seruma.

Za izčrpavanje celic smo potrebovali naslednje reagente:

- fosfatni pufer-PBS (Gibco, ZDA)
- PCM medij.

Najprej smo iz gojitvene posode s sterilno pipeto izvlekli izrabljen gojitveni medij in ga zavrgli. Nato smo spirali s 5 mL PBS, da smo odstranili ves gojitveni medij in ga nato zavrgli. Na koncu smo dodali 10 mL PCM medija in inkubirali 24 ur pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂.

NASAJANJE CELIC

Celice smo nasajali na bele mikrotitrne plošče Micrololon Lumitrac 600 (Greiner bio-one, Kremsmünster, Avstrija) s 96 vdolbinicami. Za izvedbo postopka smo potrebovali naslednje reagente:

- fosfatni pufer-PBS (Gibco, ZDA)
- 0,25 % tripsin (Gibco, ZDA)
- inhibitor tripsina-DTI (Gibco, ZDA)
- PCM medij
- barvilo tripan modro (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Iz sterilne gojitvene posode smo s serološko pipeto za enkratno uporabo najprej izvlekli star PCM medij ter ga zavrgli. Nato smo celice, enako kot pri procesu presajanja, najprej spirali s 5 mL PBS. Po odstranitvi PBS smo dodali 1 mL tripsina, ki je povzročil, da so se celice začele odlepljati od podlage. Proces odlepljanja je bil enak kot pri presajanju. Ko so se celice odlepili od podlage, smo jim dodali 1 mL inhibitorja tripsina DTI in 9 mL svežega PCM medija. Celotno zmes smo prenesli v centrifugirko in premešali na vibracijskem mešalu. Enako kot pri presajanju smo tudi pri nasajanju izvedli postopek štetja celic na hemocitometru ter nato izračunali ustrezen volumen zmesi, ki je zadostoval, da smo napolnili vse vdolbinice na plošči in hkrati dosegli želeno koncentracijo 3×10^5 celic/mL v PCM mediju (Enačba 2). V vsako vdolbinico smo z avtomatsko multikanalno pipeto (Biohit, Helsinki, Finska) prenesli 100 μ L homogene suspenzije celic v PCM-u ter tako pripravljene plošče inkubirali pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Inkubacija je trajala toliko časa, dokler si nismo pripravili ustreznih koncentracij spojin, ki smo jih kasneje nanесли (cca. 1-2 uri).

DODAJANJE SPOJIN in DOLOČANJE UČINKA LE-TEH

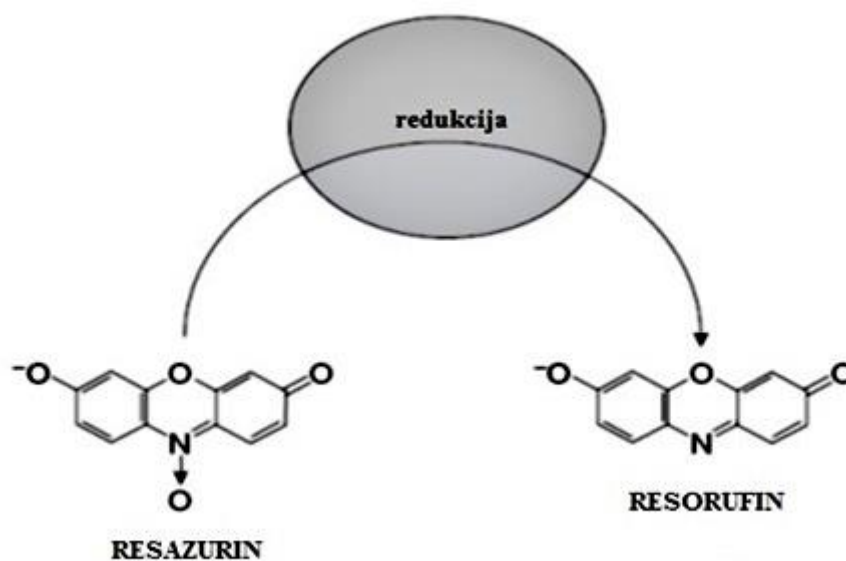
Spojine smo na plošče nanašali v različnih koncentracijah (Preglednica II), katere smo dosegli z redčenjem z 0,1 % DMSO v PCM-u, katerega postopek je opisan v podpoglavju »Priprava vzorcev testiranih spojin«. Vedno smo delali tri paralelke, kar pomeni, da smo v tri vdolbinice na plošči nanесли isto koncentracijo spojin. Tako smo lažje spremljali ponovljivost rezultatov. Plošče z dodanimi spojinami smo inkubirali 24 ur pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂ ter nato izvedli citotoksični in luciferazni test.

3.2.2 TEST CITOTOKSIČNOSTI Z RESAZURINOM

Gre za fluorimetrični test, s pomočjo katerega lahko določimo število metabolno aktivnih celic po tretiranju le-teh s preiskovanimi spojinami. Reagent, ki nam omogoča potek reakcije, je vitalno barvilo resazurin (CellTiter-Blue® Reagent (Promega, Madison, WI, ZDA)), ki nam pokaže, ali je metabolna aktivnost celic ohranjena ali ne. Celice, ki preživijo, ostanejo metabolno aktivne in tako reducirajo barvilo resazurin do resorufina, ki fluorescira pri 590 nm. Za razliko od živih, pa mrtve celice te sposobnosti nimajo, zato do fluorescence ne pride. Intenzivnost fluorescence nam poda količino nastalega produkta, ki je sorazmeren številu živih, metabolno aktivnih celic. Število preživelih celic pa lahko določimo tudi z

merjenjem absorbance pri 573 nm (absorpcijski maksimum za resorufin). Vrednost absorbance pri dani valovni dolžini je prav tako sorazmerna številu preživelih celic. Za interpretacijo rezultatov lahko torej merimo fluorescenco ali absorpcijo. Oba načina nam sicer dajeta primerljive rezultate, vendar je metoda fluorescence bolj občutljiva in enostavnejša za izračunavanje (74).

Velja pravilo, da je spojina citotoksična takrat, kadar je metabolna aktivnost celic manjša od 80 %.



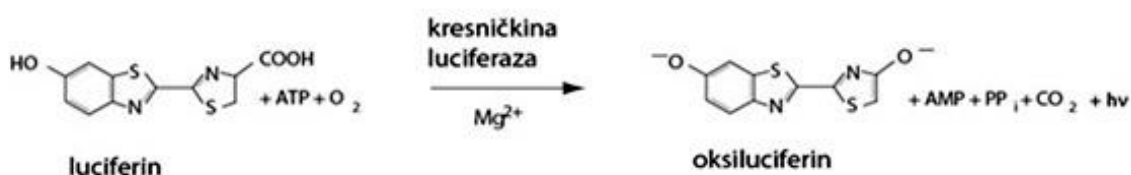
Slika 1: *Strukturni prikaz redukcijske reakcije v metabolno aktivnih celicah (74).*

Za izvedbo testa smo potrebovali samo barvilo resazurin. Delali smo v LAF komori, v kateri zaradi občutljivosti barvila na svetlobo nismo prižgali luči. Po 24-urni inkubaciji celic s spojinami ali brez njih smo v vsako vdolbinico na mikrotitrski plošči dodali 10 μ L resazurina. Uporabili smo avtomatsko multikanalo pipeto. Ko smo zapolnili vse vdolbinice, smo mikrotitrške plošče pokrili z aluminijasto folijo in jih inkubirali 2 uri pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Po preteklem inkubacijskem času smo plošče vzeli iz inkubatorja in pričeli z merjenjem fluorescence pri $\lambda_{\text{ex}}=530$ nm in $\lambda_{\text{em}}=590$ nm (čitalec mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader (Bio Tek, USA)). Fluorescenco PCM medija (brez celic; slepi vzorec) smo posneli kot ozadje in na koncu (pri izračunavanju) to vrednost odšteli od ostalih dobljenih vrednosti. Vse vrednosti smo potem normalizirali na 0,1 % DMSO v PCM-u.

3.2.3 LUCIFERAZNI TEST

Po tretiranju celic s spojinami, ki imajo sposobnost preko TR povzročiti biološki odgovor, se v njih sprožijo signalne reakcije, ki ukažejo sintezo specifičnih proteinov. Le-ti so odgovorni za končni izid. V *in vitro* testih se končni izid določa posredno, preko merljivih parametrov, ki pa so v neposredni povezavi z jakostjo delovanja oz. s koncentracijo preiskovane aktivne spojine. Tak posreden test je luciferazni test. Gre za že dobro uveljavljen test, ki temelji na izražanju reporterskega gena, ki kodira zapis za encim luciferazo. Reporterski gen je določen s promotorskim zaporedjem, na katero se veže TR (v obliki kompleksa z ligandom) kot transkripcijski faktor. Aktivacija transkripcije sproži zaporedje reakcij, ki povečajo nastajanje encima luciferaze. Le-ta pa je pokazatelj biološke aktivnosti testiranih spojin.

Luciferaza je encim, ki katalizira reakcijo bioluminiscence - oksidacijo luciferina do oksiluciferina. Pri tem luciferin nastopa kot substrat za luciferazo, ATP in magnezijev ion pa imata vlogo kofaktorja. Reakcija poteka preko hidroperoksidnega intermediata, ki na koncu ciklizira in pri razpadu odda svetlobo (75).



Slika 2: Reakcija bioluminiscence, ki jo katalizira kresničkina luciferaza (75).

Spojine, ki smo jih preiskovali, smo v izhodišču začeli testirati pri koncentraciji 200 μM. Nekaterim smo zaradi citotoksičnosti ali obarjanja v mediju morali koncentracijo ustrezno zmanjšati, tj. 10 μM, 100 μM ali 150 μM. Pri testiranju smo uporabljali tudi kontrole, ki so nam potrjevale naše delo. Kot negativno kontrolo, pri kateri ne pride do aktivacije transkripcije, smo uporabili gojitveni medij. Kot pozitivni kontroli pa smo uporabili 0,25 nM T3, ki poveča aktivnost luciferaze (agonist na TR) ter 52,70 μM BPA, ki le-to zniža (antagonist na TR). Kot kontrolo topila smo uporabili raztopino 0,1 % DMSO-ja v PCM-u.

Pri testiranju agonističnega delovanja so celice bile izpostavljene le preiskovanim spojinam. Morebiten agonističen potencial smo tako določali neposredno. Pri testiranju antagonističnega delovanja pa smo celicam najprej dodali preiskovane spojine, ki so

zasedele TR, nato pa še naknadno dodali 50 μ L 0,25 nM T3. Antagonističen učinek preiskovanih spojin smo določali posredno, preko zmanjšanja učinka 0,25 nM T3.

Za izvedbo luciferaznega testa smo potrebovali:

- fosfatni pufer-PBS (Gibco, ZDA)
- izhodni lizirni pufer Reporter Lysis 5X Buffer (Promega, Madison, WI, ZDA)
- luciferazni reagent Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI, ZDA).

Luciferazni test smo izvedli na belih mikrotitrskih ploščah, enako kot test citotoksičnosti. Po 24-urni inkubaciji celic s spojinami pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂, smo z avtomatsko multikanalo pipeto izvlekli vsebino iz vdolbinic mikrotitrskje plošče in morebiten zaostanek sprali še s 100 μ L fosfatnega pufra. Tega smo nato izvlekli in zavrgli. Sledilo je dodajanje lizirnega pufra RLB 5x, 20 μ L v vsako vdolbinico. Lizirni pufer je povzročil lizo celic (poškodoval celično steno) in tako omogočil dostop luciferinu v naslednji stopnji. Plošče z lizirnim pufrom smo za 24 ur zamrznili na -80 °C. Naslednji dan smo plošče odtajevali približno 4 ure in nato v vsako vdolbinico dodali 35 μ L luciferaznega reagenta z luciferinom, ki smo ga pripravili neposredno pred uporabo. Komplet luciferaznega reagenta vsebuje vialo z luciferaznim reagentom v obliki prahu ter vialo z vodo. V vialo s praškastim luciferaznim reagentom smo s pipeto prenesli celotno količino vode iz druge vialo ter premešali. Sledilo je merjenje luminiscence s čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrid Reader (17,75).

3.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Rezultate meritev smo pridobili s programom GraphPad Software Inc (San Diego, CA, USA, www.graphpad.com). Le-te smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel. Prikazali smo jih kot povprečno vrednost najmanj treh neodvisnih meritev. Vsako novo meritev smo izvajali na novi pasaži celic. Poleg preiskovane spojine v določeni koncentraciji smo vsakič testirali tudi kontrolo topila (0,1 % DMSO v PCM-u). Rezultate preiskovanih spojin in kontrole smo primerjali s Studentovim t-testom. Odstopanja od kontrole topila so bila statistično značilna, kadar je bila verjetnost, da sta vzorec in kontrola enaka, manjša od 5 % (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Rezultate smo grafično prikazali tako, da smo jih najprej normalizirali glede na kontrolo (0,1 % DMSO v PCM-u), katere vrednost smo izbrali za 100 %. Nato smo normaliziranim, povprečnim vrednostim poskusov določili še standardne deviacije.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI

S testom citotoksičnosti smo želeli določiti koncentracije preiskovanih spojin, pri katerih le-te ne delujejo toksično na celice. Izvedli smo ga po postopku opisanem v poglavju »Materiali in metode - Test citotoksičnosti z resazurinom«. Vse spojine smo testirali v območju šestih koncentracij, razen pri 4'OH-DFC smo jih testirali sedem. Začeli smo s koncentracijo 200 μM oz. 150 μM pri DFC in nadaljevali z redčenjem z 0,1 % DMSO v PCM-u (postopek redčenja je opisan v podpoglavju »Priprava vzorcev testiranih spojin«), da smo dobili naslednje koncentracije: 100 μM , 10 μM , 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM , in še 0,001 μM pri 4'OH-DFC. Višjih koncentracij zaradi obarjanja spojin v mediju nismo testirali.

Citotoksičnost spojin na celični liniji GH3.TRE–Luc smo testirali na dva načina. Najprej smo določali toksičnost samih preiskovanih spojin, nato pa smo le-tem dodali še trijodtironin (T3). Na tak način smo preverili ali morebitna prisotnost endogenega ščitničnega hormona vpliva na viabilnost (preživetje) celic omenjene celične linije.

Nivo citotoksičnosti spojin smo določili tako, da smo dobljene vrednosti normalizirali glede na vrednost, ki smo jo dobili pri celicah, ki niso bile tretirane s spojinami, ampak so imele dodan samo 0,1 % DMSO v PCM-u.

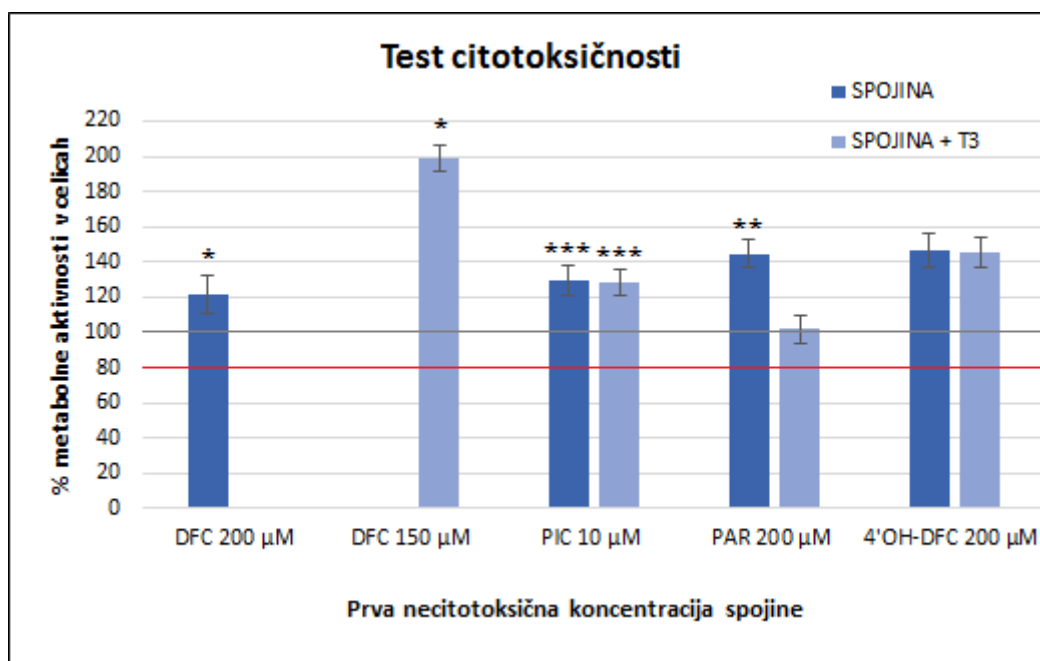
Spojina velja za citotoksično takrat, kadar metabolna aktivnosti celic pade pod 80 %. Če se je izkazalo, da je spojina pri določeni koncentraciji citotoksična, potem le-ta ni bila primerna za nadaljnje testiranje. Potrebno je bilo poiskati ustrezno nižjo koncentracijo, ki ni bila citotoksična. Prva dobljena necitotoksična koncentracija je tako v nadaljevanju pri luciferaznem testu pomenila zgornjo mejo testiranega koncentracijskega območja.

V našem primeru se je kot citotoksičen izkazal samo PIC, in sicer v koncentracijah 200 μM ter 100 μM . Metabolna aktivnost celic je pri teh koncentracijah znašala 18 % in 32 %, pri testiranju spojine same ter 11 % in 23 %, pri testiranju v kombinaciji s T3. PIC je viabilnost celic v povprečju tako zmanjšal za 80 %. Prva, za nadaljnje testiranje primerna je bila šele koncentracija 10 μM , pri kateri se je izkazalo, da je metabolna aktivnost celic bila celo višja od kontrole (0,1 % DMSO v PCM-u). Pri testiranju samega PIC je le-ta znašala enako kot v kombinaciji s T3, tj. 129 %. Citotoksičnost PIC potrjujejo tudi drugi podatki iz literature. Obstajata dve *in vitro* študiji, ki sta za določevanje citotoksičnosti uporabili t. i. MTT test. V prvi študiji je Radkar s sodelavci (76) preiskoval vpliv PIC na viabilnost mišjih

makrofagov (RAW264.7) v treh koncentracijah, 10 μM , 30 μM in 50 μM . PIC je viabilnost celic zmanjšal na 96 %, 67 % in 42 %, v enakem zaporedju kot predhodno navedene testne koncentracije. Iz podatkov je razvidno, da je citotoksičen pri koncentracijah 30 μM in 50 μM , saj je viabilnost celic zmanjšal za več kot 20 %. Pri koncentraciji 10 μM pa je le-to zmanjšal za 4 %, kar pomeni, da pri tej koncentraciji za celice ni toksičen. Do enakega spoznanja smo prišli tudi mi, čeprav Heliawati s sodelavci (77) v *in vitro* študiji na celicah P-388 (mišje levkemične celice) pravi, da je PIC, izoliran iz semen vrste palme - *Corypha utan* Lamk, citotoksičen tudi v koncentraciji nižji od 10 μM . Pri koncentraciji 1.56 ppm, kar ustreza 6.39 μM , je viabilnost celic zmanjšal za 50 %. Različni tipi celic so torej očitno različno občutljivi na toksičnost PIC. To dodatno potrjuje *in vitro* študija na gladkih mišičnih celicah aorte (HASMC), kjer so Hwa Choi in sodelavci (78), prav tako z MTT testom, določali citotoksičnost PIC v koncentracijah 5 μM , 10 μM in 20 μM . Izkazalo se je, da le-ta ni citotoksičen niti v najvišji koncentraciji, tj. 20 μM . Viabilnost celic namreč pri nobeni od testiranih koncentracij ni padla pod 80 %. Na tem mestu je potrebno poudariti tudi to, da poleg različne občutljivosti celic na preiskovane spojine, sama izbira citotoksičnega testa vpliva na pridobljene rezultate. Slednje dejstvo je pri interpretaciji rezultatov prav tako potrebno upoštevati.

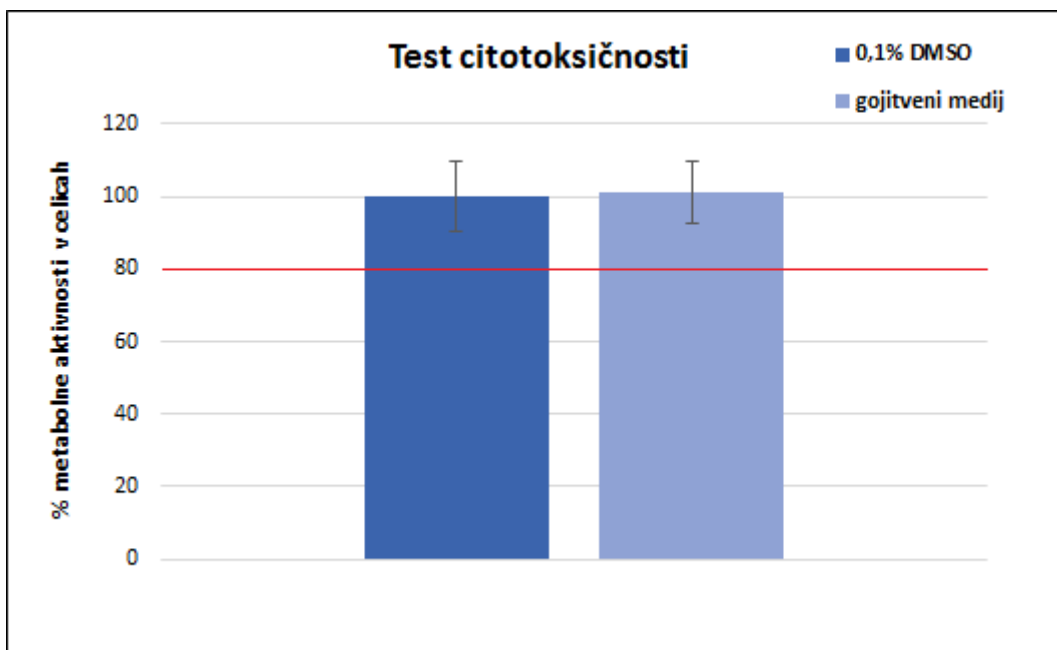
Iz pridobljenih rezultatov testiranja citotoksičnosti smo ugotovili, da, z izjemo PIC, vse ostale preiskovane spojine (PAR, DFC in 4'OH-DFC) že v najvišji testirani koncentraciji (200 μM oz. 150 μM) niso toksične za celice v celični liniji GH3.TRE–Luc. Rezultati hkrati tudi kažejo, da dodatek endogenega ščitničnega hormona (T3) ne vpliva na viabilnost omenjenih celic. Le-ti se med seboj sicer nekoliko razlikujejo, vendar razlika ni tolikšna, da bi vplivala na določanje prve necitotoksične koncentracije.

Metabolna aktivnost celic pri prvih necitotoksičnih koncentracijah preiskovanih spojin, samih ter v kombinaciji s T3, je prikazana na Sliki 3.



Slika 3: Rezultati testa citotoksičnosti pri prvi necitotoksični koncentraciji spojin. Podane so povprečne vrednosti metabolne aktivnosti celic, glede na kontrolo, 0,1 % DMSO v PCM-u ($\% \pm SD$), katere nivo je označen s sivo črto. Rdeča črta označuje spodnjo mejo (80 %) metabolne aktivnosti celic, ki je še primerna za nadaljnje testiranje. Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Istočasno kot preiskovane spojine smo testirali tudi 0,1 % DMSO v PCM-u in pa gojitveni medij. Oba sta nam služila kot kontroli. Rezultat, kako vplivata na celice prikazuje Slika 4. Iz nje lahko razberemo, da sta oba ohranila metabolno aktivnost celic na približno istem nivoju. S tem smo potrdili predpostavko, da enako kot gojitveni medij, tudi 0,1 % DMSO v PCM-u ne deluje toksično na celično linijo GH3.TRE–Luc. Tako njegova uporaba kot medij za redčenje ni problematična.



Slika 4: Primerjava 0,1 % DMSO v PCM-u in gojitvenega medija. Podane so povprečne vrednosti metabolne aktivnosti celic (% \pm SD). Rdeča črta označuje spodnjo mejo (80 %) še ustrezne metabolne aktivnosti celic.

4.2 DOLOČEVANJE UČINKA PREISKOVANIH SPOJIN NA TIROIDNIH RECEPTORJIH α in β

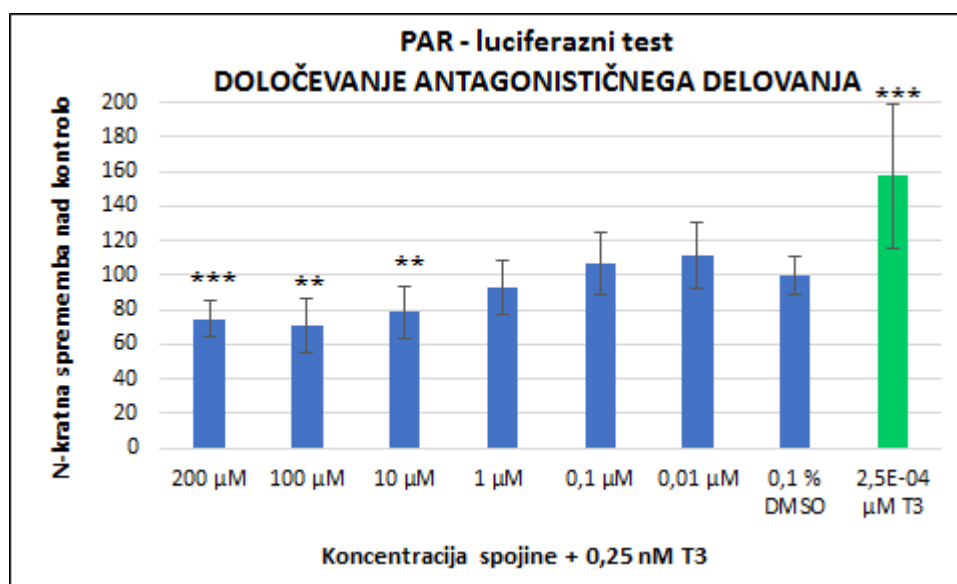
Učinek preiskovanih spojin, PAR, DFC, 4'OH-DFC in PIC, na TR α in β smo določali s pomočjo luciferaznega testa. Le-tega smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju »Materiali in metode - Luciferazni test«. Kot pozitivno kontrolo za agoniste smo uporabili 0,25 nM T3, za antagonist pa 52,70 μ M BPA. Agonističen učinek preiskovanih spojin smo na celični liniji GH3.TRE–Luc določali neposredno, z merjenjem povečanja aktivnosti luciferaze. Antagonističen učinek pa smo določali posredno, preko zmanjševanja aktivnosti luciferaze, po naknadno dodanem agonistu T3 (0,25 nM). Rezultati so bili, enako kot pri citotoksičnem testu, tudi pri tem testu normalizirani glede na kontrolo, 0,1 % DMSO v PCM-u.

Vzporedno z določanjem agonističnih in antagonističnih lastnosti preiskovanih spojin pa smo določili še njihove efektivne (EC_{50}) in inhibitorne (IC_{50}) koncentracije, ki na TR izzovejo 50 % maksimalnega učinka agonista oz. le-tega zmanjšajo za isto vrednost. Le-te smo določili tudi pozitivnima kontrolama, T3 in BPA.

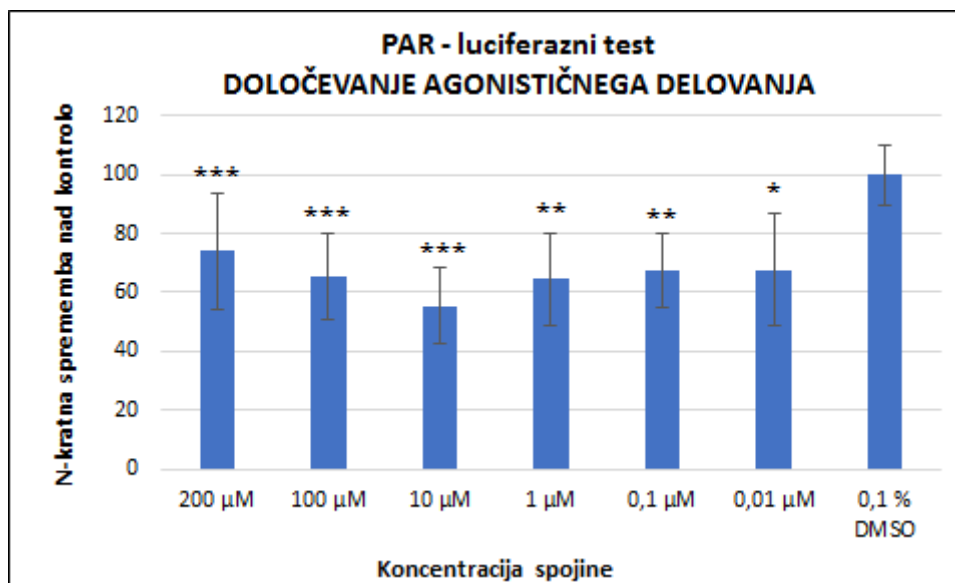
4.2.1 PARACETAMOL

PAR se je v naših testiranjih v primerjavi z ostalimi preiskovanimi spojinami in kontrolo (BPA) izkazal kot najmočnejši antagonist na TR. Njegova IC_{50} je znašala $1,81 \mu\text{M}$.

Antagonistični učinki, pridobljeni v luciferaznem testu, so bili signifikantni pri koncentracijah $200 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ in $10 \mu\text{M}$. Le-ti se med seboj niso bistveno razlikovali. Aktivnost luciferaze je pri danih koncentracijah znašala 75 %, 71 % in 79 % (Slika 5). PAR je aktivnost luciferaze tako v povprečju znižal za 25 %. Za razliko od izkazanega antagonističnega učinka na TR, pa PAR le-tega ni izkazal pri agonističnem testiranju. Pridobljeni rezultati so sicer bili signifikantni pri vseh testiranih koncentracijah, vendar relativna aktivnost luciferaze pri nobeni od njih ni presegla relativne luciferazne aktivnosti kontrole (0,1 % DMSO v PCM-u), katere vrednost je znašala 100 %. (Slika 6).



Slika 5: Rezultati luciferaznega testa za PAR, DOLOČEVANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA. Podane so povprečne vrednosti relativne luciferazne aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Oznaka + 0,25 nM T3 pomeni, da je bila plošča pri testiranju antagonističnega delovanja po dodatku spojine izpostavljena še agonistu T3. Zeleni stolpec prikazuje relativno aktivnost luciferaze, povečane s strani pozitivne kontrole (0,25 nM T3), brez predhodno dodanih spojin. Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.



Slika 6: Rezultati luciferaznega testa za PAR, DOLOČEVANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA. Podane so povprečne vrednosti relativne luciferazne aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Iz rezultatov, pridobljenih v naši raziskavi, lahko trdimo, da je PAR antagonist na TR α in β . Teh rezultatov sicer ne moremo primerjati z rezultati iz drugih raziskav na TR, saj jih kljub skrbnemu pregledu dostopne literature nismo zasledili, vendar pa obstajajo raziskave o delovanju PAR na druge jedrne receptorje, npr. na ER. V *in vitro* študiji na ER so Miller in sodelavci (79) dokazali, da ima PAR sposobnost, da v koncentraciji 50 μM zmanjša z estradiolom pogojeno proizvodnjo vitelogenina v izoliranih hepatocitih postrvi. Proizvodnja se je pri dani koncentraciji zmanjšala za 50 % in se popolnoma zaustavila pri koncentraciji 300 μM . Koncentracijo 50 μM tako lahko delno ovrednotimo kot IC_{50} , čeprav inhibicija ne poteka neposredno preko modulacije ER. Kakšen je pravzaprav mehanizem delovanja, do zdaj še ni znano, dokazano pa je, da PAR ne tekmuje z estradiolom za vezavno mesto na ER (79). V primerjavi z IC_{50} na ER lahko vidimo, da PAR močneje modulira TR. Njegova koncentracija, potrebna za doseg istega učinka na TR, je v primerjavi z ER 28-krat manjša. Zaradi strukturne podobnosti PAR z ednogenima ligandoma na ER, estrogenom (fenolna funkcionalna skupina) in progesteronom (acetatna funkcionalna skupina) (80) je znanih več *in vitro* študij, ki prav tako nakazujejo, da PAR deluje na z estrogeni in/ali progesteronom pogojene procese v celicah. Ena izmed njih je študija na Ishikawa celicah (endometrijske celice adenokarcinoma), kjer je Dowdy s sodelavci (81) ugotovil, da PAR v koncentracijah 30-300 μM zmanjšuje z estradiolom inducirano aktivnost alkalne fosfataze (AF). Tudi pri

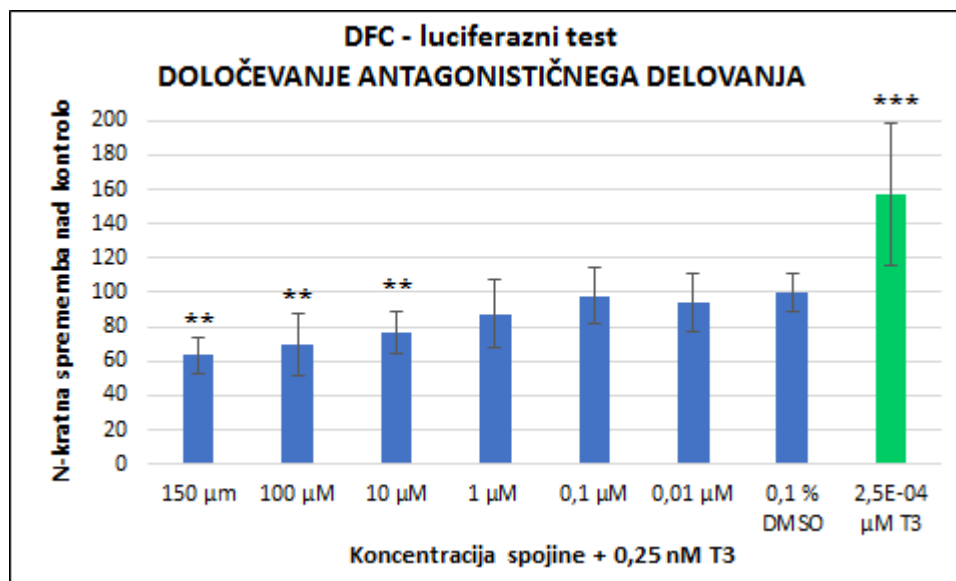
tež študiji mehanizem inhibicije ni dokončno poznan. Ker PAR ne deluje preko neposredne modulacije ER, raziskave nakazujejo, da le-ta svoje učinke izraža preko vezave na PPAR ali RXR, ki se v obliki heterodimera PPAR/RXR nahajata v tkivih, ki izražajo ER. Promotor v genu AF vsebuje ERE element (Estrogen Response Element). Vezava kompleksa PAR s heterodimerom na ta element tako zavre vezavo kompleksa estradiola z ER na isto mesto, kar pa posledično inhibira z estradiolom inducirano aktivnost AF v Ishikawa celicah. Šibko antiestrogensko delovanje PAR dokazuje tudi *in vivo* študija na mladih miših, kjer sta Patel in Rosengren (82) pokazala, da PAR v kombinaciji z estradiolom vpliva na peroksidazno aktivnost ter na koncentracijo progesteronskih receptorjev (PR) v maternici. Miškam so dnevno, tri dni zapored, aplicirali 200 mg PAR/kg telesne teže (TT) v kombinaciji z estradiolom (10 µg/kg TT). Peroksidazna aktivnost v maternici se je glede na aplikacijo samega estradiola v kombinaciji s PAR zmanjšala za približno 75 %, kar posledično vodi v zmanjšano detoksifikacijo reaktivnih produktov, ki nastanejo pri metabolizmu estradiola in povzročajo oksidativni stres (83). Kombinacija PAR in estradiola je prav tako negativno vplivala na koncentracijo PR v jedru celic maternice. Le-ta je pri estradiolu znašala 39.7 ± 6.6 fmol/mg, v kombinaciji s PAR pa se je zmanjšala na 23.7 ± 3.4 fmol/mg. Pa vendar PAR ne deluje samo preko inhibicije z estrogeni pogojenih procesov. Harnagea-Theophilus in Miller (84) sta v *in vitro* študiji na MCF-7, T47-D in ZR-571 rakastih celicah dojke pokazala, da PAR v koncentraciji 100-300 µM signifikantno deluje kot agonist na ER, saj stimulira z estradiolom inducirano sintezo DNA v omenjenih na estrogen odzivnih celicah. Učinek pri tej koncentraciji je ekvivalenten učinku, ki ga povzroči 3 nM estradiol. Podatki iz študije tako nakazujejo na zelo šibko agonistično delovanje PAR, saj le-ta učinkuje v koncentracijskem območju, ki je za rang 10^5 večji od endogenega liganda, estradiola. Kakšen pa je mehanizem delovanja na rakave celice, so raziskovali Gadd in sodelavci (80). V *in vitro* študiji so testirali hipotezo, da PAR stimulira proliferacijo estrogen odzivnih celic z indukcijo izražanja estrogen reguliranih genov. Testirali so tri različne celične linije ((MCF-7, Ishikawa in MDA-MB-231), ki različno izražajo ER. Zaradi različnih učinkov na ekspresijo genov so povzeli, da učinek PAR ni odvisen od ER, pač pa od tipa celic, na katere deluje. Obstaja tudi *in vitro* študija, kjer je Harnagea-Theophilus s sodelavci (85) na MCF-7 ter T47D rakavih celicah dojke testirala prokancerogen učinek PAR. Zraven PAR so testirali še dva njegova izomera, katera sta imela -OH-skupino vezano na mestih orto in meta. Ugotovili so, da je indukcija proliferacije testiranih celic v terapevtski koncentraciji 100 µM najmočnejša pri PAR in se zmanjšuje v vrstnem redu meta, orto.

Iz vseh podatkov, pridobljenih z več raziskavami, tako lahko povzamemo, da PAR na ER izraža t. i. pleiotropen učinek, kar pomeni, da v različnih celicah izraža različne učinke. Pri tem je treba poudariti, da se večina učinkov - tako antagonističnih kot tudi agonističnih - izrazi v koncentracijah, ki se v plazmi vzpostavijo, če zaužijemo že 1-2 tableti PAR naenkrat (30-120 μM) (84). Slednje dejstvo potrjujejo tudi rezultati naše raziskave, saj je PAR signifikante antagonistične učinke na TR izkazal že pri koncentraciji 10 μM . Menimo, da bi bilo zanimivo testirati delovanje PAR še na drugih vrstah celicah, ki prav tako izražajo funkcionalne TR (α in β). Tako bi namreč ugotovili ali PAR tudi na omenjenih receptorjih (TR) izraža pleiotropen učinek.

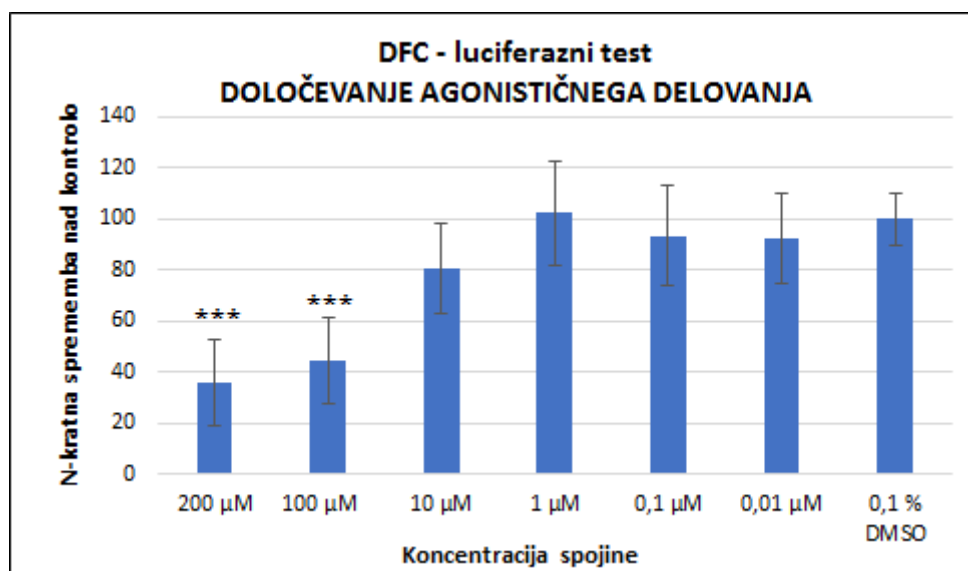
4.2.2 DIKLOFENAK

DFC je v primerjavi z ostalimi preiskovanimi spojinami in kontrolo (BPA) drugi najmočnejši antagonist na TR. Njegova IC_{50} znaša 4,11 μM , kar pomeni, da je njegova jakost delovanja v primerjavi z že omenjenim PAR, 2-krat manjša in 13-krat večja glede na kontrolo BPA, katere IC_{50} smo prav tako določili in znaša 52,70 μM .

Pri določanju antagonističnega delovanja DFC na TR smo zaradi obarjanja spojine v mediju testiranje začeli pri nižji koncentraciji, tj. 150 μM . Rezultati luciferaznega testa so pokazali, da DFC relativno aktivnost luciferaze signifikantno zmanjšuje pri koncentracijah 150 μM , 100 μM in 10 μM . Le-ta je pri danih koncentracijah znašala 63 %, 70 % in 76 % (Slika 7). Enako kot PAR pa tudi DFC ne izkazuje agonističnega učinka na TR. Pri testiranju agonističnega delovanja smo kot najvišjo koncentracijo uporabili 200 μM . Rezultati luciferaznega testa so bili signifikatni pri koncentracijah 200 μM in 100 μM , kjer relativna aktivnost luciferaze ni preseгла vrednosti relativne aktivnosti luciferaze pri kontroli (0,1 % DMSO v PCM-u). V tem zaporedju navedenih koncentracij je le-ta znašala 36 % in 45 % (Slika 8).



Slika 7: Rezultati luciferaznega testa za DFC, DOLOČEVANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA. Podane so povprečne vrednosti relativne luciferazne aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Oznaka + 0,25 nM T3 pomeni, da je bila plošča pri testiranju antagonističnega učinka po dodatku spojine izpostavljena še agonistu T3. Zeleni stolpec prikazuje relativno aktivnost luciferaze, povečane s strani pozitivne kontrole (0,25 nM T3), brez predhodno dodanih spojin. Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.



Slika 8: Rezultati luciferaznega testa za DFC, DOLOČEVANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA. Podane so povprečne vrednosti relativne luciferazne aktivnosti glede na kontrolo ($\pm SD$). Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Obsežnih podatkov iz drugih študij, ki bi potrjevale naše rezultate in opredelile morebiten mehanizem delovanja DFC na TR, še ni. Predvidevamo pa, da je za učinek DFC na TR odgovoren halogenski fragment, tj. klor. Le-ta namreč izraža podobne lastnosti kot jod v strukturi ednogenega hormona T3.

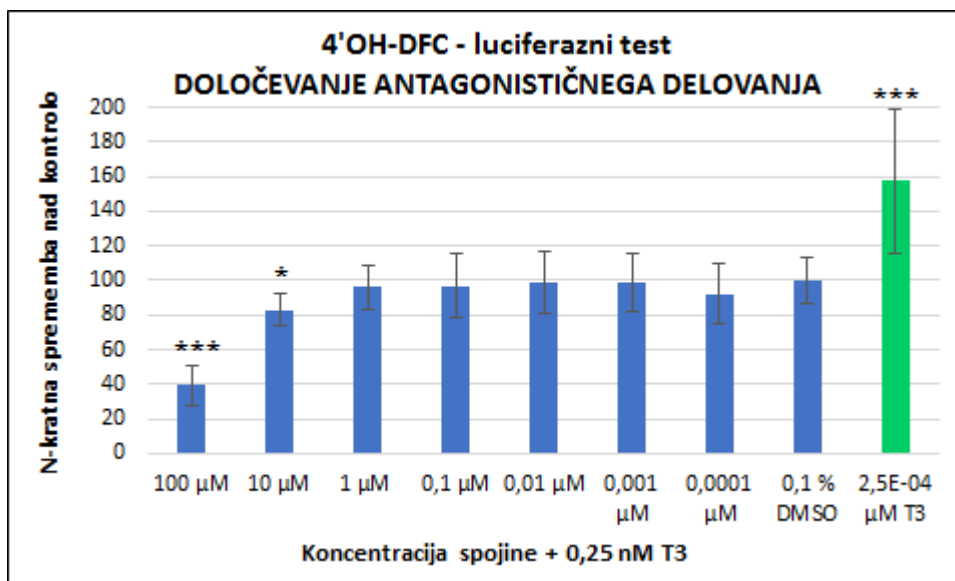
Več je znanih študij, ki opredeljujejo delovanje DFC na druge receptorje. Obstaja študija, kjer je Cheng s sodelavci (86) s pomočjo *in silico* metode NBI (Network-based inference) ugotovil, da je diklofenak spojina, ki ne deluje samo preko inhibicije sinteze vnetnih prostaglandinov. Njihova spoznanja kažejo, da deluje tudi na ER α in β in sicer kot antagonist. Njegova IC₅₀ na ER α znaša 7,59 μ M in 2,32 μ M na ER β . Poleg estrogenskega delovanja je dokazano, da diklofenak deluje tudi na PPAR γ in sicer kot agonist. *In vitro* študija apoptoze sinovialnih celic pri revmatoidnem artritisu (87) je pokazala, da diklofenak v koncentraciji 28,9 μ M sproži 25-kratno aktivacijo PPAR γ (luciferazni test). Za primerjavo, endogeni ligand prostaglandin J2 (15d-PGJ2) sproži isti učinek pri 36-krat nižji koncentraciji (0,8 μ M). Na PPAR γ pa deluje tudi indometacin, prav tako predstavnik NSAID. Lehmann s sodelavci (88) je v *in vitro* študiji dokazal, da le-ta v koncentraciji 0,1 mM povzroči 40-kratno aktivacijo PPAR γ . Aktivacija PPAR γ pri tej koncentraciji je primerljiva z maksimalno indukcijo PPAR γ , povzročeno iz strani že omenjenega nativnega liganda PPAR γ , prostaglandina J2 (15d-PGJ2) (0,1 mM). Na PPAR γ pa delujejo tudi drugi predstavniki NSAID (npr. fenoprofen, ibuprofen, flufenaminska kislina idr.) ter številne strukturno različne spojine (npr. prostanoidi, dolgoverižne maščobne kisline, tiazolidindionski antidiabetiki, fibrati idr.). Skupno vsem je to, da v svoji strukturi vsebujejo lipofilni ter kisli fragment (običajno karboksilat) (88).

Glede na pridobljene podatke iz naše in iz drugih raziskav lahko tudi pri DFC vidimo, da modulacija TR in ER poteka pri koncentraciji, ki sovpada s terapevtsko plazemsko koncentracijo, tj. 0,5-3 μ g/mL oz. 1,7-10,1 μ M (89), medtem ko modulacija PPAR γ poteka pri višjih koncentracijah (28,9 μ M) (87). Povzamemo lahko, da ima DFC vključno z ostalimi NSAID potencial, da modulira različne jedrne receptorje. To dejstvo še dodatno potrjuje *in vitro* študija, v kateri je Zhou s sodelavci (90) ugotovil, da je predstavnik NSAID, sulindak, antagonist na RXR α , ki v koncentraciji 80 μ M (IC₅₀) povzroči apoptozo rakavih celic.

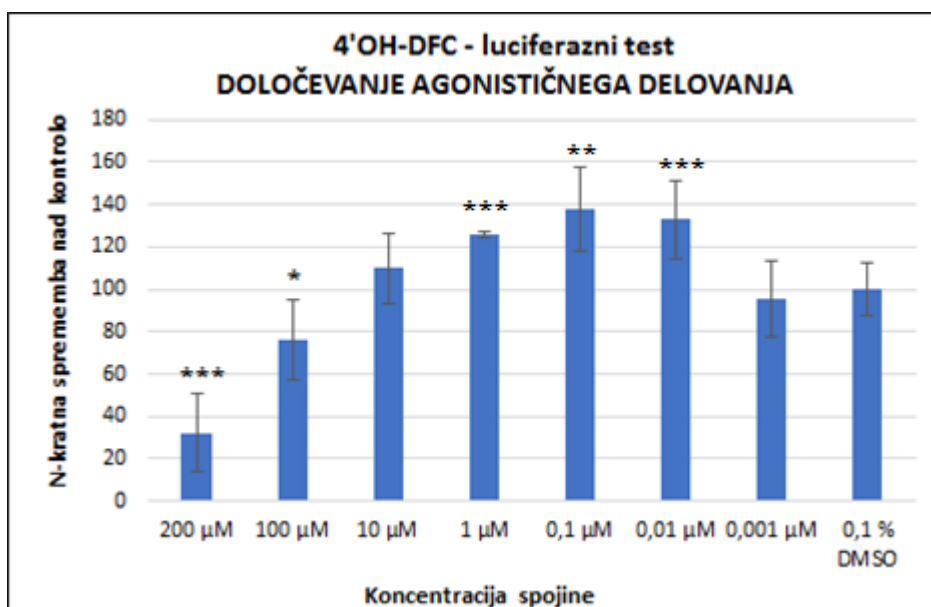
4.2.3 4-HIDROKSIDIKLOFENAK

4'OH-DFC je posebnež med testiranimi spojinami. Je edina spojina, katero smo testirali v sedmih različnih koncentracijah in hkrati tudi edina spojina, ki izkazuje signifikantne agonistične in hkrati tudi antagonistične lastnosti na TR α in β . Njegova EC_{50} znaša 604,2 μ M. Le-ta je v primerjavi z EC_{50} kontrole (T3), za katero smo ugotovili, da znaša $1,644 \times 10^{-4}$ μ M, 3.675.000-krat večja. Iz tega lahko zaključimo, da je aktivacija TR s strani 4'OH-DFC zelo šibka. Prav tako šibko je tudi njegovo antagonistično delovanje na TR. Njegova IC_{50} znaša 62,14 μ M, ki je, za razliko od ostalih preiskovanih spojin, celo večja od kontrole BPA, katere IC_{50} znaša 52,70 μ M. 4'OH-DFC je tako edini izmed testiranih spojin, ki izkazuje agonistične učinke na TR, hkrati pa je tudi (najšibkejši) antagonist na omenjenih receptorjih. Glede na omenjene rezultate lahko tukaj potrdimo, v namenu našega dela, postavljeno hipotezo, da je 4'OH-DFC najmočnejši agonist na TR.

Testiranje agonističnega in antagonističnega delovanja 4'OH-DFC na TR je, zaradi obarjanja spojine v mediju, potekalo pri različnih koncentracijah. Najvišja testirana koncentracija pri ugotavljanju antagonističnega delovanja je bila 100 μ M, najnižja pa 0,0001 μ M. Vmesne koncentracije so bile enake kot pri ostalih testiranih spojinah (Preglednica II). Rezultati luciferaznega testa so bili signifikantni v koncentracijah 100 μ M in 10 μ M, pri katerih je relativna aktivnost luciferaze znašala 39 % in 83 % (Slika 9). Za razliko od antagonističnega pa smo pri agonističnem testiranju kot najvišjo koncentracijo 4'OH-DFC izbrali 200 μ M, najnižjo pa 0,001 μ M. Vmesne koncentracije so tudi v tem primeru bile enake kot pri ostalih spojinah (Preglednica II). Rezultati luciferaznega testa so bili signifikantni v koncentracijah 200 μ M, 100 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M in 0,01 μ M, vendar je 4'OH-DFC agonistične lastnosti na TR izkazoval le v koncentracijah 1 μ M, 0,1 μ M in 0,01 μ M. Vrednosti relativne aktivnosti luciferaze so v zaporedju slednjih znašale 126 %, 138 % in 133 %, kar je v povprečju za 32 % več kot pri kontroli (0,1 % DMSO v PCM-u) (Slika 10).



Slika 9: Rezultati luciferaznega testa za 4'OH-DFC, DOLOČEVANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA. Podane so povprečne vrednosti relativne luciferazne aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Oznaka + 0,25 nM T3 pomeni, da je bila plošča pri testiranju antagonističnega učinka po dodatku spojine izpostavljena še agonistu T3. Zeleni stolpec prikazuje relativno aktivnost luciferaze, povečane s strani pozitivne kontrole (0,25 nM T3), brez predhodno dodanih spojin. Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.



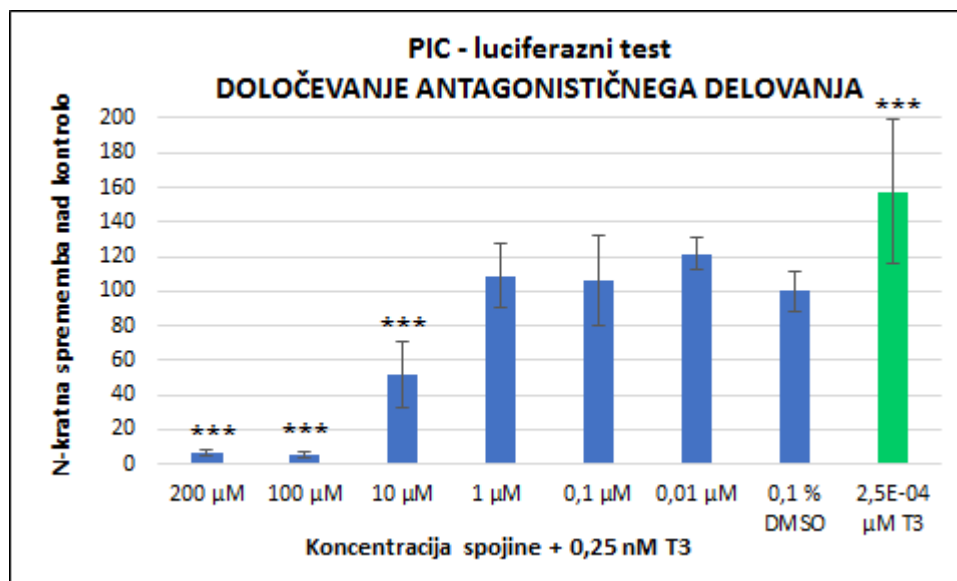
Slika 10: Rezultati luciferaznega testa za 4'OH-DFC, DOLOČEVANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA. Podane so povprečne vrednosti relativne luciferazne aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Glede na pridobljene rezultate lahko povzamemo, da ima 4'OH-DFC sposobnost, da na isti receptor deluje kot agonist in antagonist hkrati. Nizke koncentracije 4'OH-DFC (0,01-1 μM) povzročijo aktivacijo TR, medtem ko višje koncentracije (10-100 μM) le-tega inhibirajo. Gre za t. i. hormetičen učinek, katerega izkazuje tudi PIC, predstavljen v nadaljevanju.

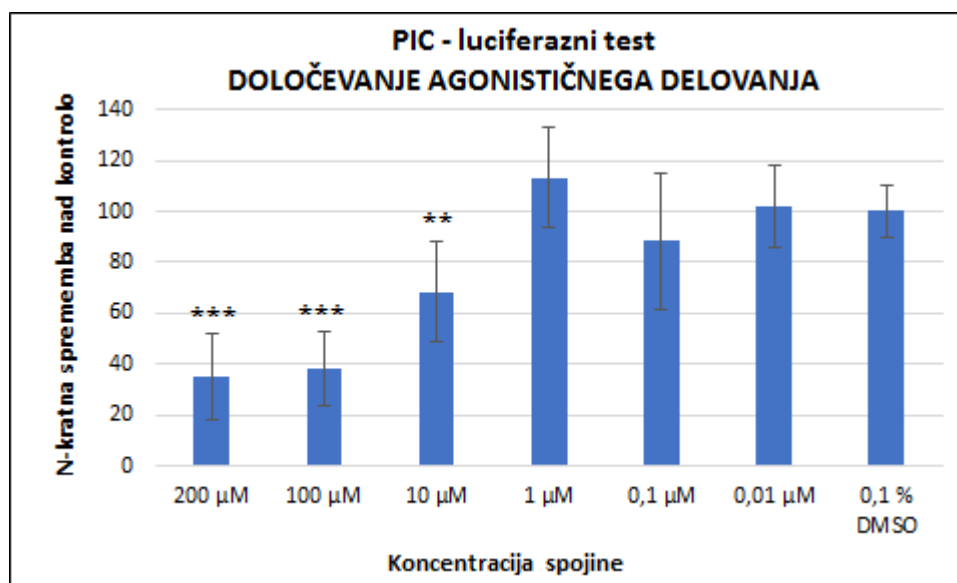
4.2.4 PICEATANOL

PIC je spojina, ki se je v prvem delu testiranj, za razliko od drugih testiranih spojin v koncentracijah 200 μM ter 100 μM , izkazala za citotoksično. Pridobljene rezultate smo pri le-teh kljub signifikantnosti zanemarili. Prva, za interpretacijo primerna (necitotoksična), je tako bila koncentracija 10 μM . Ugotovili smo, da PIC na TR deluje kot antagonist. Njegova IC_{50} znaša 13,61 μM , kar nam sicer pove, da je njegova jakost delovanja glede na predhodno omenjena PAR in DFC nižja, vendar še vseeno višja kot jakost delovanja kontrole (BPA). IC_{50} slednje je namreč kar 4-krat večja (52,70 μM).

Antagonistično testiranje na TR je pokazalo, da PIC signifikantno zmanjšuje relativno aktivnost luciferaze samo pri najvišji necitotoksični koncentraciji, tj. 10 μM . Njegovo delovanje na TR je relativno aktivnost luciferaze, povečano iz strani naknadno dodanega T3, zmanjšalo skoraj za polovico. Le-ta je namreč pri dani koncentraciji znašala le 52 % (Slika 11). Tudi pri agonističnem testiranju na TR smo signifikanten rezultat dobili samo pri koncentraciji 10 μM . V tem primeru je relativna aktivnost luciferaze znašala le 68 % (Slika 12), kar je nižje od relativne luciferazne aktivnosti kontrole (0,1 % DMSO v PCM-u).



Slika 11: Rezultati luciferaznega testa za PIC, DOLOČEVANJE ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA. Podane so povprečne vrednosti relativne luciferazne aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Oznaka + 0,25 nM T3 pomeni, da je bila plošča pri testiranju antagonističnega učinka po dodatku spojine izpostavljena še agonistu T3. Zeleni stolpec prikazuje relativno aktivnost luciferaze, povečane s strani pozitivne kontrole (0,25 nM T3), brez predhodno dodanih spojin. Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.



Slika 12: Rezultati luciferaznega testa za PIC, DOLOČEVANJE AGONISTIČNEGA DELOVANJA. Podane so povprečne vrednosti relativne luciferazne aktivnosti glede na kontrolo ($\% \pm SD$). Statistična signifikantnost; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Učinki PIC na endokrini sistem so slabo raziskani, vseeno pa obstajajo raziskave o njegovem delovanju na nekatere hormonske receptorje. Predvsem so zanimive študije na ER, saj je struktura PIC zelo podobna strukturi sintetičnega estrogena DES (76). V *in vitro* študiji je Vo s sodelavci (91) ugotavljala vpliv PIC na ER in PR odzivne MCF-7 rakave celice dojke. Ugotovili so, da je učinek PIC na omenjene celice odvisen od koncentracije. Visoke koncentracije PIC (rang 10^{-6} M) delujejo inhibitorno na celično proliferacijo, medtem ko nizke (rang 10^{-9} M) le-to stimulirajo. Koncentracija 25-50 μ M zaradi inhibicije ribonukleotid reduktaze (RR) ter zmanjšanja ekspresije c-myc protoonkogenov neodvisno od ER in PR zmanjša celično proliferacijo za približno 50 %. Še višje koncentracije PIC, 150 μ M, pa inducirajo apoptozo MCF-7 celic. Apoptozo lahko PIC izzove tudi pri nižji koncentraciji, odvisno od občutljivosti celic. Omenjene MCF-7 celice so zaradi zmanjšane izražanja proapoptotične kaspaze 3 manj občutljive na toksičnost PIC, medtem ko je občutljivost ovarijskih celic hrčka (CHO) ter HL-60 promielocitnih levkemičnih celic večja. PIC izzove njihovo apoptozo že pri koncentraciji 25 μ M. Za razliko od mikromolarnih pa nanomolarne koncentracije PIC preko modulacije PR povečajo ekspresijo c-Myc protoonkogenov in tako stimulirajo proliferacijo MCF-7 celic. Pri koncentraciji 50 nM je le-ta povečana za približno 20 % in se skoraj podvoji pri koncentraciji 250 nM. Obstaja tudi študija, kjer so Maggiolini in sodelavci (92) preučevali agonistično delovanje PIC na ER α v MCF-7 celicah, ki so vsebovale dva različna reporterska plazmida za luciferazo (XETL in TFF1/pS2-ERE). V celicah z XETL reporterskim plazmidom je PIC v koncentraciji 1 μ M povečal aktivnost luciferaze za približno 7-krat glede na kontrolo, v celicah z TFF1/pS2-ERE reporterskim plazmidom pa 3-krat. Obe aktivaciji ER sta bili po dodatku 1 μ M ER antagonistu ICI 182780 zmanjšane za isti faktor, kar nakazuje, da PIC sodeluje v kompetativnem antagonizmu na ER α . O morebitnem agonističnem delovanju PIC pri nižjih koncentracijah (1 μ M in 0,01 μ M) pa govorijo tudi rezultati naše študije. Ti sicer niso signifikantni, pa vendar nakazujejo na hormetičen učinek PIC tudi na TR.

Kako pa je PIC povezan z modulacijo PPAR, je preiskoval Rimando s sodelavci (93). V *in vitro* študiji na hepatocitih podgan so določali sposobnosti resveratrola ter treh njegovih strukturnih analogov (piceatanola, pterostilbena in resveratrol trimetiletra) za aktivacijo α -izooblike PPAR. Morebitne agonistične lastnosti so določali z luciferaznim testom. Ugotovili so, da je pterostilben edini izmed testiranih spojin, ki izkazuje agonistične lastnosti na PPAR α . Iz tega so sklepali, da je za agonističen učinek potrebna prisotnost največ dveh metoski skupin. Le-teh piceatanol nima, zato ne izraža agonističnih lastnosti na PPAR α .

Ker se PIC, zaradi nedokončanih predkliničnih študij, ne uporablja v terapevtske namene, ne vemo kakšna je njegova terapevtska koncentracija. Vemo pa, da je njegova prisotnost v telesu posledica metabolizma resveratrola (RSV). Slednji se kot zdravilo še sicer tudi ne uporablja, je pa na tragu na voljo kot prehransko dopolnilo pri obrambi pred oksidativnim stresom. Njegova vsebnost v prehranskih dopolnilih znaša 50-200 mg (odvisno od izdelka) (94), njegov priporočeni dnevni odmerek pa znaša 25-100 mg (95). Če zaužijemo 25 mg RSV, njegova plazemska koncentracija znaša 1-5 ng/mL oz. 0,004-0,022 μM in šele pri odmerku višjem od 5 g doseže koncentracijo okoli 500 ng/mL oz. 2,19 μM (96). Ker pa RSV (97) in PIC (91) izkazujeta hormetičen učinek tudi na ER, je za dosego želenega terapevtskega učinka (inhibicija proliferacije na estrogen odzivnih rakavih celic), ki se vzpostavi pri koncentraciji $> 10 \mu\text{M}$, potrebno zaužiti več kot 115 kapsul v katerih je vsebnost RSV 200 mg. Odmerek se še poveča, če želimo to koncentracijo doseči pri PIC, ki le delno nastane pri metabolizmu zaužitega RSV. V nasprotnem primeru se lahko zgodi, da je plazemska koncentracija (RSV in PIC) tako nizka (0,1-1 μM), da izzove neželen terapevtski učinek na ER (indukcija proliferacije na estrogen odzivnih rakavih celic). Prav tako veliko količino PIC pa je potrebno vnesti v telo tudi, če želimo doseči antagonističen učinek na TR, ki se prav tako zrazi pri koncentraciji 10 μM .

Omenjeni rezultati *in vitro* študij ter dejstvo, da je učinkovitost PIC zaradi dodatne hidroksilne skupine v strukturi boljša kot pri RSV (59), tako res obetajo dobre rezultate pri uporabi PIC v terapevtske namene. Vseeno pa je končni odgovor odvisen od rezultatov pridobljenih s predkliničnimi študijami ter tehnoloških postopkov, kateri bodo omogočili vgraditev tako velike količine zdravilne učinkovine v bolniku prijazno FO.

4.3 PREISKOVANE SPOJINE V OKOLJU

Literaturni podatki kažejo, da se preiskovane spojine nahajajo tudi v okolju. Koncentracije posameznih spojin so bile izmerjene na različnih območjih po svetu ter v različnih vodnih virih (reke, potoki, odpadne ter podzemne vode) (Priloga 13). Ugotovili smo, da naša najmanjša testirana koncentracija spojin, tj. 0,001 μM in 0,0001 μM pri 4'OH-DFC ter 0,01 μM pri ostalih spojinah (PIC, DFC in PAR), ustreza največjim izmerjenim koncentracijam spojin v okolju. Literaturni podatki kažejo, da se PAR v Ameriki (Kanada, Kalifornija, ZDA) v podzemnih vodah nahaja v koncentraciji do 0,012 μM ter v potokih do 0,013 μM . Še višje koncentracije so izmerili pri DFC in sicer v odpadnih vodah v Evropi (Francija, Italija, Grčija, Balkan). Koncentracija na teh območjih znaša 0,014-0,018 μM . Hidroksiliran metabolit DFC, 4'OH-DFC se v okolju nahaja v nižjih koncentracijah kot predhodno

omenjena PAR in DFC. Literaturni podatki kažejo, da njegova koncentracija v Nemčiji v odpadnih vodah znaša 0,002-0,005 μM , ter v Pakistanu 0,006 μM . Podatkov o okoljskih koncentracijah za PIC v literaturi nismo zasledili.

Na podlagi okoljskih ugotovitev lahko povzamemo, da smo poleg neposredne izpostavljenosti preko terapevtskih odmerkov na posreden način izpostavljeni tudi nizkim koncentracijam preiskovanih spojin iz okolja. Le-te so, kljub nizkim vrednostim, dovolj visoke, da motijo endokrini sistem.

Neizogibno je, da spojina po zaužitju ne bi prešla v okolje. Le-ta se namreč po tem, ko v telesu izvede farmakološki učinek, metabolizira in izloči iz telesa. Metabolizem zdravilne učinkovine lahko vodi do tvorbe farmakološko nekativnih ali aktivnih metabolitov. Slednji lahko svoje učinke izražajo naprej, na okoljskih organizmih. Ni pa nujno, da se učinkovina metabolizira v celoti. Lahko se (po navadi v manjšem deležu) izloči in naprej učinkuje tudi v nespremenjeni obliki. Ne glede na vrsto in obseg metabolizma zdravilne učinkovine, le-ta na koncu preko kanalizacije doseže okolje. Gre za naraven proces, v katerem največji problem predstavlja količina izločene zdravilne učinkovine. Že dolgo je namreč znano, da uporaba protibolečinskih in protivnetnih zdravil presega meje normalne uporabe. Predvsem starejši del populacije se le-teh poslužuje kronično, bodisi za lajšanje težave same, bodisi za lajšanje neželenih učinkov, ki jih povzročajo druga zdravila. Celotno stanje dodatno poslabša še dejstvo, da so nekatere zdravilne učinkovine - v našem primeru je to PAR - na trgu na voljo tudi kot zdravilo brez recepta. Nadzor nad uporabo takih zdravil je tako še manjši, kar ima za posledico vedno večje onesnaženje okolja.

Ostanke zdravilnih učinkovin iz okolja se s procesi odstranjevanja (adsorpcija ali biorazgradnja) delno res lahko odstrani, vendar dodaten problem predstavlja tvorba nerazgradljivih produktov zdravilnih učinkovin ali produktov z dolgo razpolovno dobo, ki so lahko še bolj toksični kot osnovna spojina. Le-ti se kopičijo v okolju, kjer neposredno škodljivo vplivajo na vodne organizme ter posredno, preko pitne vode in hrane, tudi na človeka in ostale kopenske živali. Primer učinkovine, preiskovane v naši raziskavi, ki se v okolju razgradi do toksičnih produktov, je DFC. Zanj je znano, da je podvržen fotolizi. Izpostavljenost DFC soncu (posredna in/ali neposredna) tako privede do tvorbe različnih metabolitov, ki zaradi tvorbe radikalov sprožijo reakcije oksidacije na lipidih, proteinih ali DNA. Najpogostejši med njim so hidrosilirani metaboliti (4'hidroksi in 5'hidroksi-diklofenak) in kinon-iminski derivati, ki so med drugim tudi glavni povzročitelji hepatotoksičnosti DFC. Prav tako so med najpogostejšimi cianidni razgradni produkti ter

karbazolni derivati. Slednji lahko povzročijo celo lizo redečih krvničk. Obstajajo pa tudi subkronične in kronične študije toksičnosti DFC na različnih vrstah rib (postrvi, šarenke, medaka ribe) (37). Le-te navajajo, da DFC, v okoljsko primerljivi koncentraciji, tj. 1 µg/L, na ribe deluje citotoksično in genotoksično ter posega v z estrogeni pogojene procese (npr. proizvodnjo vitelogenina). Histopatološki pregled tkiv je hkrati tudi pokazal, da DFC povzroči neželene spremembe na jetrih, ledvicah ter škrgah preiskovanih rib. Pa vendar se DFC in njegovi metaboliti v okolju ne nahajajo sami. K onesnaženosti okolja in tveganju za zdravje vodnih organizmov prispevajo tudi mnoge druge zdravilne učinkovine, ki skupaj povzročajo močnejše učinke, kot pa če bi bili izpostavljeni vsaki učinkovini posebj (37). Zelo malo pa je znanih podatkov o pojavnosti zdravilnih učinkovin v pitni vodi. Koncentracije le-teh so po navadi tako nizke (pg/L), da jih niti z naprednimi analitičnimi tehnikami ne gre zaznati. Pa vendar obstajajo izjeme. Mompelat je s sodelavci (98) preučeval pojavnost najpogosteje uporabljenih zdravilnih učinkovin v pitni vodi (antibiotiki, NSAID, antidepressivi, opioidni analgetiki, antikonvulzivi, itd.) v Evropi. Predstavnik NSAID, DFC so v Nemčiji zaznali v koncentraciji 6-35 ng/L ter v Franciji v koncentraciji 2 ng/L. Različno pojavnost DFC v sosednjih državah gre pripisati različni gostoti prebivalstva na posameznem geografskem območju ter obdobju v katerem so bile izvedene analitične meritve (npr. sušno ali deževno obdobje) (98). Podatkov za pojavnost PAR v pitni vodi v literaturi nismo zasledili. Prav tako nismo zasledili, kakšna je ocena tveganja pri izpostavljenosti zdravilnim učinkovinom preko vodnih virov. Do danes znane študije še le-te namreč niso dokončno opredelile (99).

5 SKLEP

Zanimanja raziskovalcev za raziskovanje vpliva hormonskih motilcev (HM) na ljudi in živali je v zadnjem času vse več. Največ znanih raziskav govori o delovanju HM na estrogenski ter androgenski sistem, medtem ko so ostala področja raziskana v manjši meri. V magistrskem delu smo se osredotočili na manj raziskane vplive HM na moduliranje TR. Vrednotili smo vpliv paracetamola (PAR), diklofenaka (DFC) in njegovega hidroksiliranega metabolita (4'OH-DFC) ter piceatanola (PIC) na TR.

Na osnovi rezultatov našega eksperimentalnega dela lahko zaključimo naslednje:

- Prvotno izbrana koncentracija, tj. 200 μM se je izkazala za citotoksično le pri PIC. Prav tako se je zaradi obarjanja spojine v mediju izkazala kot neustrezna pri DFC. Koncentracija, primerna za nadaljnje testiranje je tako znašala 10 μM pri PIC ter 150 μM pri DFC. Pri PAR ter 4'OH-DFC smo za testiranje uporabili prvotno izbrano koncentracijo 200 μM .
- Pri testiranju agonističnega delovanja spojin na TR je le 4'OH-DFC, v koncentracijah 0,01-1 μM , izkazal signifikanten učinek. Rezultati pri DFC in PIC so pri istih koncentracijah sicer nakazali potencial spojine za šibko agonistično delovanje, vendar le-ti niso bili signifikantni, zato jih ne moremo potrditi. PAR ni izkazal potenciala za agonistično delovanje na TR.
- Testiranje antagonističnega delovanja na TR je pokazalo, da so vse preiskovane spojine antagonisti na TR. Rezultati kažejo, da vse spojine, v koncentracijah 10-200 μM , signifikantno zmanjšujejo aktivnost luciferaze. Vrstni red jakosti inhibicije TR je naslednji: PAR > DFC > PIC > 4'OH-DFC.
- PAR in DFC sta v terapevtskih koncentracijah sposobna zmanjšati aktivnost TR.
- Okoljske koncentracije vseh preiskovanih spojin, razen PIC (ni podatkov), so kljub majhnim vrednostim (rang 10^{-9} M) dovolj visoke, da izzovejo modulacijo TR.

V okviru magistrske naloge smo potrdili obe, v namenu dela postavljeni hipotezi:

1. Vse preiskovane spojine imajo sposobnost, da statistično značilno modulirajo TR
2. 4'OH-DFC je najmočnejši agonist na TR

V magistrskem delu smo ugotovili, da imajo vse preiskovane spojine vpliv na TR. Pri tem je pomembno poudariti, da se učinki le-teh izrazijo pri koncentracijah, ki se v krvi vzpostavijo že pri terapevtskem odmerjanju (neposredna izpostavljenost HM). Prav tako pa smo iz literaturnih podatkov o koncentracijah preiskovanih spojin v okolju ugotovili, da so ponekod po svetu le-te že tako visoke, da je modulacija TR možna tudi na posreden način. Izpostavljenost HM, ki je praviloma že kronična (tako neposredna kot tudi posredna), lahko predstavlja resno tveganje za zdravje. Iz tega vidika so potrebne nove, obsežne raziskave, kjer se bo pridobilo podatke, s pomočjo katerih se bo lahko nedvoumno opredelilo, kakšno je tveganje za zdravje ljudi ter kakšne posledice prinese kronična izpostavljenost nizkim odmerkom HM. Hkrati pomemben del raziskav v skrbi za zdravje predstavlja tudi neprestano predstavljanje novih smernic za ugotavljanje in zmanjševanje uporabe HM, še posebno pa določanje mej izpostavitve, ki ne vplivajo na zdravje ljudi in drugih živih organizmov.

6 LITERATURA

1. Hormonski motilci - NIEHS

http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf Dostop: 7.5.2015

2. Hormonski motilci - EC

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm Dostop: 7.5.2015

3. A. Kortenkamp, M. Olwenn, M. Faust, R. Evans, R. McKinlay, F. Orton in E. Rosivatz: State of the art assessment of endocrine, Final Report 2011; 13, 21-26

4. Kaj so hormonski motilci? - EC

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis_en.htm Dostop: 7.5.2015

5. Hormonski motilci

<http://endocrinedisruption.org/assets/media/documents/EDFactSheet11-7-11.pdf> Dostop: 7.5.2015

6. E. Diamanti-Kandarakis, J.P. Bourguignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller in A. C. Gore: Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. Endocrine Reviews 2009; 30 (4): 293–342

7. Hormonski motilci - EDSP (Endocrine Disruptor Screening Program)

<http://www.epa.gov/scipoly/ospendo/pubs/edspoverview/whatare.htm> Dostop: 7.5.2015

8. Å. Bergman, J. J. Heindel, S. Jobling, K. A. Kidd in R. T. Zoeller: State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012; 11-13

9. H.P. Gelbke, M. Kaysera in A. Poole: OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. Toxicology 2004; 205: 17–25

10. J. Wu in J. M. McAndrews: Introduction To The Endocrine System: Part 1: Basic Concepts And Anatomy. Amwa Journal 2012, Vol. 27, No. 4; 152-156

11. S. Silbernagl: Color Atlas of Physiology, 6th edition, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009: 270-287

12. A. C. Guyton in J. E. Hall: Textbook of Medical Physiology, 12th Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2011: 884-887, 907-915
13. J. G. Meszaros s študentoma E. R. Olson in J. E. Naugle: Endocrine and Reproductive Systems, 1st Edition, Elsevier Mosby, Philadelphia, 2006: 29-35
14. L. S. Costanzo: Physiology, 15th Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2014: 407-413
15. Slika sinteze hormonov T3 in T4
<http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/thyroid-disorders/overview-of-thyroid-function> Dostop: 7.5.2015
16. J. Janošek, K. Hilscherová, L. Bláha in I. Holoubek: Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. Toxicology in Vitro 2006, Vol. 20, No. 1; 18-37
17. T. Panker: Diplomaska naloga: Določanje učinka nekaterih bisfenolov in parabenov na androgenske in glukokortikoidne receptorje, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013: 7; 46-48
18. J. W. Apriletti, R. C.J. Ribeiro, R. L. Wagner, W. Feng, P. Webb, P. J. Kushner, B. L. West, S. Nilsson, T. S. Scanlan, R. J. Fletterick in J. D. Baxter: Molecular And Structural Biology Of Thyroid Hormone Receptors. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 1998; 25: S2-S11
19. B. M. Koeppen in B. A. Stanton: Berne and Levy Physiology, 6th Edition, Mosby Elsevier, Philadelphia, 2009: 87
20. P. M. Yen: Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. Physiological Reviews Published 2001, Vol. 81, No. 3; 1097-1142
21. J.H. D. Bassett, C. B. Harvey in G. R. Williams: Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. Molecular and Cellular Endocrinology 2003, Vol. 213, No.1; 1-11
22. M. Pedrelli, C. Pramfalk in P. Parini: Thyroid hormones and thyroid hormone receptors: Effects of thyromimetics on reverse cholesterol transport. World Journal of Gastroenterolgy 2010, Vol. 16, No. 46; 5958-5964

23. G. Raparti, S. Jain, K. Ramteke, M. Murthy, R. Ghanghas, S. Ramanand in J. Ramanand: Selective thyroid hormone receptor modulators. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2013, Vol. 17, No. 2; 211-218
24. P. White in M. J. Dauncey: Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *Journal of Molecular Endocrinology* 1999; 23: 241–254
25. A. Bertolini, A. Ferrari, A. Ottani, S. Guerzoni, R. Tacchi in S. Leone: Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. *CNS Drug Reviews* 2006, Vol. 12, No. 3-4; 250–275
26. K. Toussaint, X. C. Yang, M. A. Zielinski, K. L. Reigle, S. D. Sacavage, S. Nagar in R. B. Raffa: What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2010; 35: 617–638
27. Paracetamol - PUBCHEM
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetaminophen#section=Top> Dostop: 7.5.2015
28. Lekadol® - povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC)
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/CC18250038223E4AC12579C2003F557B/\\$File/s-011848.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/CC18250038223E4AC12579C2003F557B/$File/s-011848.pdf) Dostop: 7.5.2015
29. Paracetamol - profil tveganja
http://www.mattilsynet.no/kosmetikk/stoffer_i_kosmetikk/risk_profile_acetaminophen.9864/binary/Risk%20Profile%20Acetaminophen Dostop: 7.5.2015
30. Paracetamol - CHEMICALLAND21
<http://www.chemicalland21.com/lifescience/phar/ACETAMINOPHEN.htm> Dostop: 7.5.2015
31. Toksičnost paracetamola - MedScape
<http://emedicine.medscape.com/article/820200-overview#aw2aab6b2b2> Dostop: 7.5.2015
32. R. M. Botting: Mechanism of Action of Acetaminophen: Is There a Cyclooxygenase 3? *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31:S202-210

33. Paracetamol - EMA

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015516.pdf Dostop: 7.5.2015

34. J. R. Vane in R. M. Botting: Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. The American Journal of Medicine 1998, Vol. 104, No. 3; 2S–8S

35. Voltaren® - Novartis

<http://www.novartis.com/about-novartis/company-history/index.shtml> Dostop: 7.5.2015

36. Voltaren® - LiveScience

<http://www.livescience.com/42922-diclofenac.html> Dostop: 7.5. 2015

37. A. A. A. Mohamad: Environmental Chemical Analysis Related to Drug Industries: Fate Monitoring of Diclofenac in Water/Sediment Systems 2010; 5-6, 22-27, 33-34

38. Diklofenak - PUBCHEM

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3033?from=summary#section=Top> Dostop: 7.5.2015

39. Diklofenak - LookChem

<http://www.lookchem.com/newsell/search.aspx?key=diclofenac> Dostop: 7.5.2015

40. 4-hidroksidiklofenak - LookChem

<http://www.lookchem.com/4--Hydroxydiclofenac/> Dostop: 7.5.2015

41. B. Chuasuwan, V. Binjesoh, J.E. Polli, H. Zhang, G.L. Amidon, H.E. Junginger, K.K. Midha, V.P. Shah, S. Stavchansky, J.B. Dressman in D.M. Barends: Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Diclofenac Sodium and Diclofenac Potassium. Journal of pharmaceutical sciences 2009, Vol. 98, No. 4; 1206–1219

42. Diklofenak - LiveScience

<http://www.livescience.com/42922-diclofenac.html> Dostop: 7.5.2015

43. Naklofen duo® - povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC)

[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/22C5037AA9F57381C1257BAB008358CB/\\$File/s-015206.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/22C5037AA9F57381C1257BAB008358CB/$File/s-015206.pdf) Dostop: 7.5.2015

44. J. V. Willis, M. J. Kendall, R. M. Flinn, D. P. Thornhill in P. G. Welling: The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1979, Vol. 16, No. 6; 405-410

45. Voltaren®-XR - Novartis

https://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/voltaren_xr.pdf Dostop: 7.5.2015

46. C. D. Van Der Marel, B. J. Anderson, J. Rømsing , E. Jacqz-Aigrain in D. Tibboel: Diclofenac and metabolite pharmacokinetics in children. *Pediatric Anesthesia* 2004; 14: 443–451

47. R. Bort, K. Macé, A. Boobis, M. J. Gómez-Lechón, A. Pfeifer in J. Castell: Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochemical Pharmacology* 1999, Vol. 58, No. 5; 787–796

48. T. Dolinar in A. Mrhar: Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo? *Farmacevtski vestnik* 2005, letnik 56, št. 4; 229-241

49. Razlika med NSAID (diklofenak) - eMedExpert

<http://www.emedexpert.com/compare/nsaids.shtml#differences> Dostop: 7.5.2015

50. R. Bort, X. Ponsoda, R. Jover, M. J. Gomez-Lechon in J. V. Castell: Diclofenac Toxicity to Hepatocytes: A Role for Drug Metabolism in Cell Toxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999, Vol. 288, No. 1; 65–72

51. Diklofenak - EMA

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500013751.pdf Dostop 7.5. 2015

52. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022122_PharmR_P2.pdf
Dostop 7.5. 2015

53. Y. Setoguchi, Y. Oritani, R. Ito, H. Inagaki, H. Maruki-Uchida, T. Ichiyanagi in T. Ito: Absorption and Metabolism of Piceatannol in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014; 62: 2541–2548
54. A. Kukreja, A. Mishra in A. Tiwari: Source, Production And Biological Activities Of Piceatannol: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2013, Vol. 4, No. 10; 3738-3745
55. Piceatanol - Examine
<http://examine.com/supplements/Piceatannol/> Dostop: 7.5.2015
56. H. Piotrowska, M. Kucinska in M. Murias: Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2012, Vol. 750, No. 1; 60–82
57. Piceatanol - LookChem
<http://www.lookchem.com/trans-Piceatannol/> Dostop: 7.5.2015
58. Piceatanol - Santa Cruz Biotechnology
<http://www.scbt.com/datasheet-200610-piceatannol.html> Dostop: 7.5. 2015
59. A. Kukreja, N. Wadhwa in A. Tiwari: Therapeutic Role of Resveratrol and Piceatannol in Disease Prevention. *Journal of Blood Disorders & Transfusion* 2014, Vol. 5, No. 9; 1-6
60. Farmacevtiki v pitni vodi - WHO
http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals_20110601.pdf Dostop: 7.5.2015
61. M. Lovšin: Diplomaska naloga: Vpliv okolju tujih presnovkov nekaterih zdravil na izbrane testne organizme, Biotehniška fakulteta, Ljubljana 2009: 5-12
62. P. Kima, Y. Parkb, K. Jib, J. Seob, S. Leeb, K. Choic, Y. Khod, J. Parke in K. Choi: Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere* 2012, Vol. 89, No. 1; 10–18
63. W.C. Li: Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution* 2014, Vol. 187; 193–201

64. M. S. Frama in K. Belitz: Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Science of The Total Environment* 2011, Vol. 409, No. 18; 3409–3417
65. Y. Kima, K. Choia, J. Junga, S. Parka, P. Kimb in J. Park: Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International* 2007, Vol. 33, No. 3; 370–375
66. Diklofenak, okoljske koncentracije
http://www.up.ethz.ch/education/term_paper/termpaper_hs07/JISKRA_rev_termpaper_hs07.pdf Dostop: 7.5.2015
67. D. Stülten, S. Zühlke, M. Lamshöft in M. Spiteller: Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Science of The Total Environment* 2008, Vol. 405, No. 1–3; 310–316
68. M. Scheurella, S. Frankea, R.M. Shahb in H. Hühnerfuss: Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan. *Chemosphere* 2009, Vol. 77, No. 6; 870–876
69. Celična linija GH3.TRE–Luc
http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=87012603&collection=ecacc_gc Dostop: 7.5.2015
70. Celična linija GH3.TRE–Luc
<http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0179201-thyroid-hormone-regulation-of-an-entire-gene-expression-network-during-amphibian-metamorphosis.html> Dostop: 7.5.2015
71. J. Freitas, P. Canoa, C. Craig-Veitb, M. L. Goodsonc, J. D. Furlowb in A. J. Murk: Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicology in Vitro* 2011, Vol. 25, No. 1; 257–266
72. Sterilne gojitvene posode http://www.tpp.ch/page/produkte/01_zellkultur_flasche.php
 Dostop: 7.5.2015

73. Trypsin (certifikat - Promega)

<http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/n/sequencing%20grade%20modified%20trypsin%20protocol.pdf> Dostop: 7.5.2015

74. Citotoksični test z rezazurinom (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay-Promega)

<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/CellTiter-Blue%20Cell%20Viability%20Assay%20Protocol.pdf> Dostop: 7.5.2015

75. Luciferazni test (Luciferase Assay System-Promega)

<http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/01/luciferase%20assay%20system%20protocol.pdf> Dostop: 7.5.2015

76. V. Radkar, D. Hardej, C. Lau-Cam in B. Billack: Evaluation Of Resveratrol And Piceatannol Cytotoxicity In Macrophages, T Cells, And Skin Cells*. Arh Hig Rada Toksikol 2007; 58: 293-304

77. L. Heliawati, A. Kardinan, T. Mayanti in R. Tjokronegoro: Piceatannol: Anti-Cancer Compound From Gewang Seed Extract, Journal of Applied Pharmaceutical Science 2015, Vol. 5, No. 1; 110-113

78. K. H. Choi, J. Kim, N. R. Song, J. E. Son, M. K. Hwang, S. Byun, J. H. Kim, K. W. Lee in H. J. Lee: Phosphoinositide 3-kinase is a novel target of piceatannol for inhibiting PDGF-BB-induced proliferation and migration in human aortic smooth muscle cells. Cardiovascular Research 2010; 85: 836–844

79. M. R. Miller, E. Wentz in S. Ong: Acetaminophen Alters Estrogenic Responses in Vitro: Inhibition of Estrogen-Dependent Vitellogenin Production in Trout Liver Cells. Toxicological Sciences 1999; 48: 30–37

80. S. L. Gadd, G. Hobbs in M. R. Miller: Acetaminophen-Induced Proliferation of Estrogen-Responsive Breast Cancer Cells Is Associated with Increases in c-myc RNA Expression and NF- κ B Activity. Toxicological Sciences 2002; 66: 233–243

81. J. Dowdy, S. Brower in M. R. Miller: Acetaminophen Exhibits Weak Antiestrogenic Activity in Human Endometrial Adenocarcinoma (Ishikawa) Cells Toxicological Sciences 2003; 72: 57–65

82. R Patel in R.J Rosengren: Acetaminophen elicits anti-estrogenic but not estrogenic responses in the immature mouse. *Toxicology Letters* 2001, Vol. 122, No. 1; 89–96
83. K. Geršak, J. Ž. Černe: Genetika raka dojke in hormonsko nadomestno zdravljenje. *Zdravniški Vestnik* 2008; 77: III-49–54
84. E. Harnagea-Theophilus in M. R. Miller: Acetaminophen Alters Estrogenic Responses in Vitro: Stimulation of DNA Synthesis in Estrogen-Responsive Human Breast Cancer Cells. *Toxicological Sciences* 1998; 46: 38–44
85. E. Harnagea-Theophilus , M. R. Miller in N. Rao: Positional isomers of acetaminophen differentially induce proliferation of cultured breast cancer cells. *Toxicology Letters* 1999; 104: 11–18
86. F. Cheng, C. Liu, J. Jiang, W. Lu, W. Li, G. Liu, W. Zhou, J. Huang in Y. Tang: Prediction of Drug-Target Interactions and Drug Repositioning via Network-Based Inference. *PLoS Computational Biology* 2012, Vol. 8, No. 5; 1-13
87. R. Yamazaki, N. Kusunoki, T. Matsuzaki, S. Hashimoto in S. Kawai: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Apoptosis in Association with Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Rheumatoid Synovial Cells. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2002; 302:18–25
88. J. M. Lehmann, J. M. Lenhard, O. B. Beverly, G. M. Ringold in S. A. Kliewer: Peroxisome Proliferator-activated Receptors α and γ Are Activated by Indomethacin and Other Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*. *The Journal Of Biological Chemistry* 1997, Vol. 272, No. 6; 3406–3410
89. M. Schulz in A. Schmoldt: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie* 2003; 58: 447–474
90. H. Zhou, W. Liu, Y. Su, Z. Wei, J. Liu, S. K. Kolluri, H. Wu, Y. Cao, J. Chen, Y. Wu, T. Yan, X. Cao, W. Gao, A. Molotkov, F. Jiang, W. G. Li, B. Lin, H. P. Zhang, J. Yu, S. P. Luo, J. Z. Zeng, G. Duester, P. Q. Huang in X. K. Zhang: NSAID Sulindac and Its Analog Bind RXR α and Inhibit RXR α -Dependent AKT Signaling. *Cancer Cell* 2010, Vol. 17, No. 6; 560–573

91. N. T. P. Vo, S. Madlener, Z. B. Horvath, I. Herbacek, N. Stark, M. Gridling, P. Probst, B. Giessrig, S. Bauer, C. Vonach, P. Saiko, M. Grusch, T. Szekeres, M. F. Szekeres, W. Jäger, G. Krupitza in A. Soleiman: Pro- and anticarcinogenic mechanisms of piceatannol are activated dose dependently in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2010, Vol. 31 No. 12; 2074–2081
92. M. Maggiolini, A. G. Recchia, D. Bonofiglio, S. Catalano, A. Vivacqua, A. Carpino, V. Rago, R. Rossi in S. Andò: The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor in human breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005; 35: 269–281
93. A. M. Rimando, R. Nagmani, D. R. Feller in W. Yokoyama: Pterostilbene, a New Agonist for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α -Isoform, Lowers Plasma Lipoproteins and Cholesterol in Hypercholesterolemic Hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 3403-3407
94. P3 Profesional - Prehranska dopolila, resveratrol
http://www.covirias.si/primerjava_laiki/primerjava.php?page=1&ob=B_ime&search=resveratrol&kategorija= Dostop: 7.5.2015
95. Resveratrol Recommended Dosage
<http://www.livestrong.com/article/443759-resveratrol-recommended-dosage/> Dostop: 7.5.2015
96. A. Carrizzo, M. Forteb, A. Damato, V. Trimarcoc, F. Salzanod, M. Bartoloe, A. Maciagf, A. Pucaf in C. Vecchionea: Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 61: 215–226
97. W. Chao, Z. Xuexin, S. Jun, C. Ming, J. Hua, G. Li, C. Tan in W. Xu: Effects of resveratrol on cell growth and prolactin synthesis in GH3 cells. *Experimental and therapeutic medicine* 2014; 7: 923-928
98. S. Mompelat, B. Le Bot in O. Thomas: Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International* 2009, Vol. 35, No. 5; 803–814

99. E. Tourauda, B. Roiga, J. Sumpterb in C. Coetsiera: Drug residues and endocrine disruptors in drinking water: Risk for humans? *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2011; 214: 437– 441

7 PRILOGE

Priloga 1: Prikaz večstopenjske strategije testov za ugotavljanje potencialnih škodljivih učinkov HM, pripravljene s strani delovne skupine EDTA (3, 9).

1. STOPNJA	1. raven Razvrščanje spojin po pomembnosti z uporabo že obstoječih podatkov	- fizikalno-kemijske lastnosti - toksikološki podatki - napovedi QSAR in ADME modelov - izpostavljenost
	2. raven <i>In vitro</i> presejalni testi za določevanje mehanizma delovanja spojin	- testi vezave na receptor (ER, AR) - test aktivacije transkripcije - test proliferacije celic MFC-7
	3. raven <i>In vivo</i> presejalni testi za določevanje endokrine aktivnosti spojin	- uterotropni test - Hershbergerjev test - testi na ribah
2. STOPNJA	4. raven <i>In vivo</i> testi za določevanje stranskih učinkov spojin na organskih sistemih	- posodobljen test OECD 407 - histopatološki test endokrinih žlez (ribe) - metamorfozni test (žabe) - pubertetni test (moški in ženske) - študije kronične toksičnosti in kancerogenosti - razvojna nevrotoksičnost
	5. raven <i>In vivo</i> testi za določevanje endokrinih učinkov spojin na eni ali več generacijah	- študije toksičnosti na eni ali dveh generacijah (ribe, ptice) - celotna ali delna analiza življenjskega cikla rib in ptic

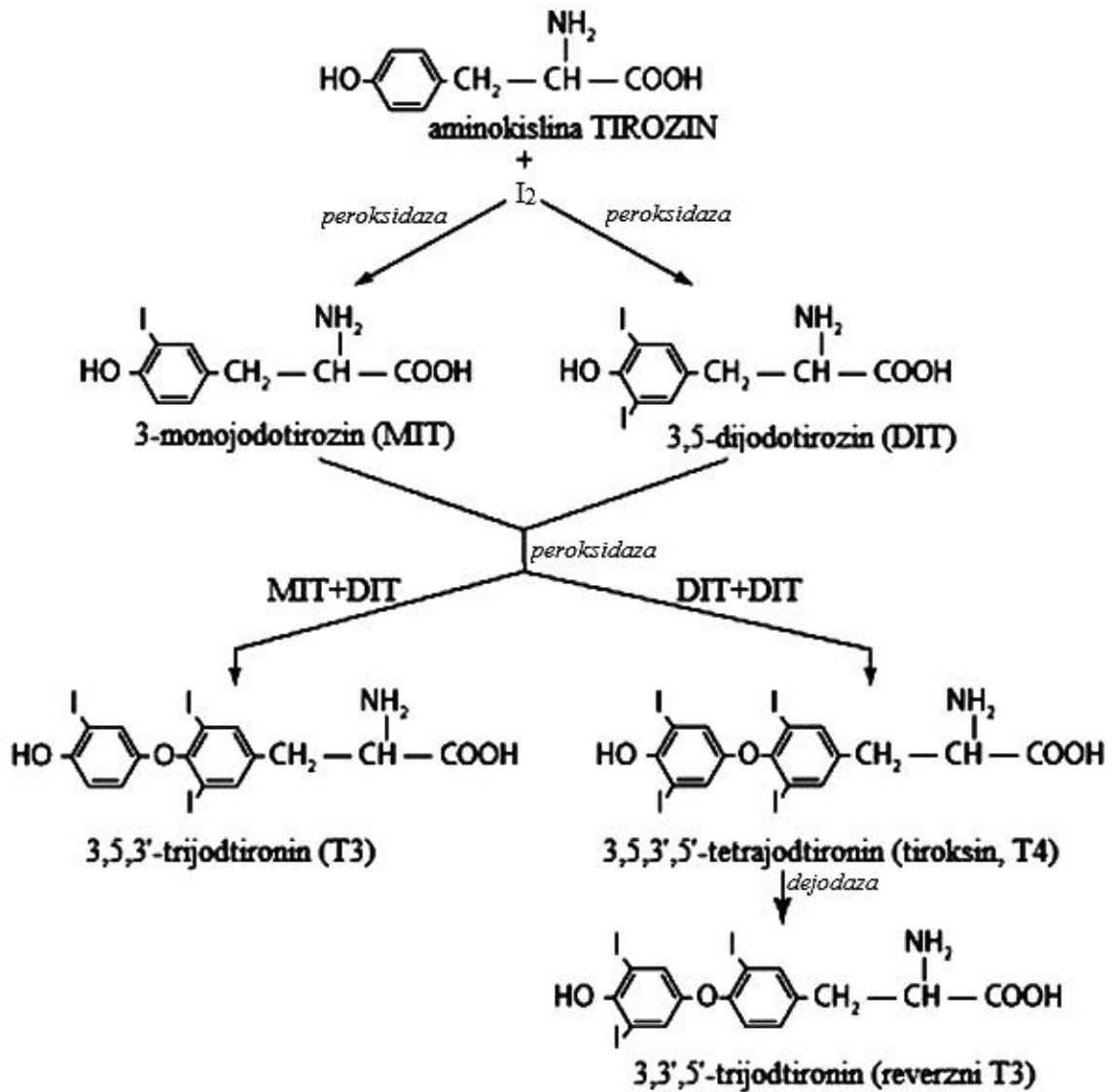
Priloga 2: Endokrine žleze in njihovi hormoni s pripadajočimi funkcijami ter kemijsko strukturo (10, 11, 12).

ENDOKRINA ŽLEZA	HORMON (-i)	FUNKCIJA	KEM. STRUKTURA
HIPOTALAMUS	- tiroliberin (TRH)	- pospešuje izločanje tirotropina (TSH)	- polipeptid
	- gonadoliberin (GnRH)	- pospešuje izločanje gonadotropinov (LH in FSH)	- polipeptid
	- somatoliberin (GHRH)	- pospešuje izločanje ravnega hormona (GH)	- polipeptid
	- kortikoliberin (CRH)	- pospešuje izločanje adenokortikotropnega hormona (ACTH)	- polipeptid
	- somatostatin (GHIH)	- inhibira izločanje ravnega hormona (GH)	- polipeptid
	- prolaktostatin (PIH)	- inhibira izločanje prolaktina (PRL)	- amin
ADENOHIPOFIZA (prednji režanj)	- tirotropin (TSH)	- stimulira sintezo in izločanje hormonov ščitnice (tiroksin (T4) in trijodtironin(T3))	- polipeptid
	- folitropin (FSH)	- stimulira rast foliklov v jajčnikih in dozorevanje sperme v Sertolijevih celicah testisov	- polipeptid
	- luteotropin (LH)	- stimulira ovulacijo, tvorbo rumenega telesca, sintezo progesterona in estrogena v jajčnikih ter sintezo testosterona v Leydigovih celicah testisov	- polipeptid
	- adenokortikotropni hormon (ACTH)	- stimulira izločanje hormonov nadledvične žleze (kortizol in aldosteron)	- polipeptid
	- rastni hormon (GH)		- polipeptid

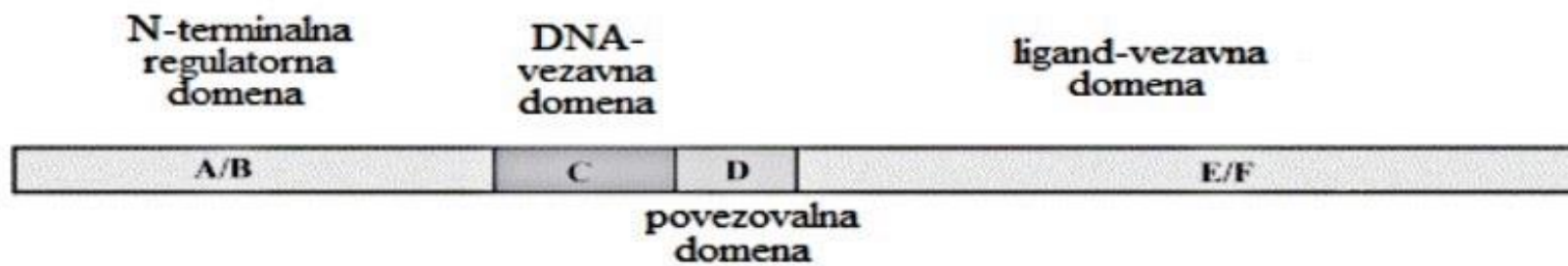
ENDOKRINA ŽLEZA	HORMON (-i)	FUNKCIJA	KEM. STRUKTURA
-nadaljevanje, ADENOHIPOFIZA (prednji reženj)	- prolaktin (PRL)	- stimulira rast in razvoj celic, tkiv - stimulira produkcijo mleka	- polipeptid
NEVROHIPOFIZA (zadnji reženj)	- antidiuretični hormon (ADH) / vazopresin - oksitocin	- povečuje resorpcijo vode v ledvicah in krvni tlak, povzroča vazokonstrikcijo - pospešuje izločanje mleka iz prsi, sproža krčenje maternice	- polipeptid - polipeptid
ŠČITNICA	- tiroksin (T4) in trijodtironin (T3) - kalcitonin	- regulirata rast in razvoj, presnovo, telesno temperaturo in porabo kisika - pospešuje odlaganje kalcija v kosteh, zmanjšuje konc. kalcija in fosfatov v krvi (poveča izločanje skozi ledvice)	- amin - polipeptid
OBŠČITNICA	- parathomon (PTH)	- pospešuje sproščanje kalcija iz kosti, povečuje konc. kalcija in fosfatov v krvi (povečana resorpcija v ledvicah)	- polipeptid
NADLEDVIČNA ŽLEZA - skorja	- kortizol - aldosteron	- nadzoruje presnovo beljakovin, ogljikovih hidratov in maščob, deluje protivnetno, regulira koncentracijo glukoze in odziv na stres - regulira količino vode in elektrolitov (zmanjšuje izločanje natrija in vode, pospešuje izločanje kalija)	- steroid - steroid

ENDOKRINA ŽLEZA	HORMON (-i)	FUNKCIJA	KEM. STRUKTURA
NADLEDVIČNA ŽLEZA - sredica	- kateholamini (adrenalin in noradrenalin)	- stimulacija simpatika	- amin
TREBUŠNA SLINAVKA	- insulin - glukagon	- spodbuja vstop glukoze v celice in zmanjšuje njeno konc. v krvi - povečuje sintezo in sproščanje glukoze iz jeter, povečuje njeno konc. v krvi	- polipeptid - polipeptid
JAJČNIKI	- estrogen - progesteron	- spodbuja rast in razvoj ženskih spolnih organov, vpliva na sekundarne ženske spolne znake - nadzoruje menstrualni cikel	- steroid - steroid
TESTISI	- testosteron	- spodbuja rast in razvoj moških spolnih organov, vpliva na moške spolne znake	- steroid
ČEŠERIKA	- melatonin	- uravnava cirkadiane ritme (npr. spanje in budnost)	- amin

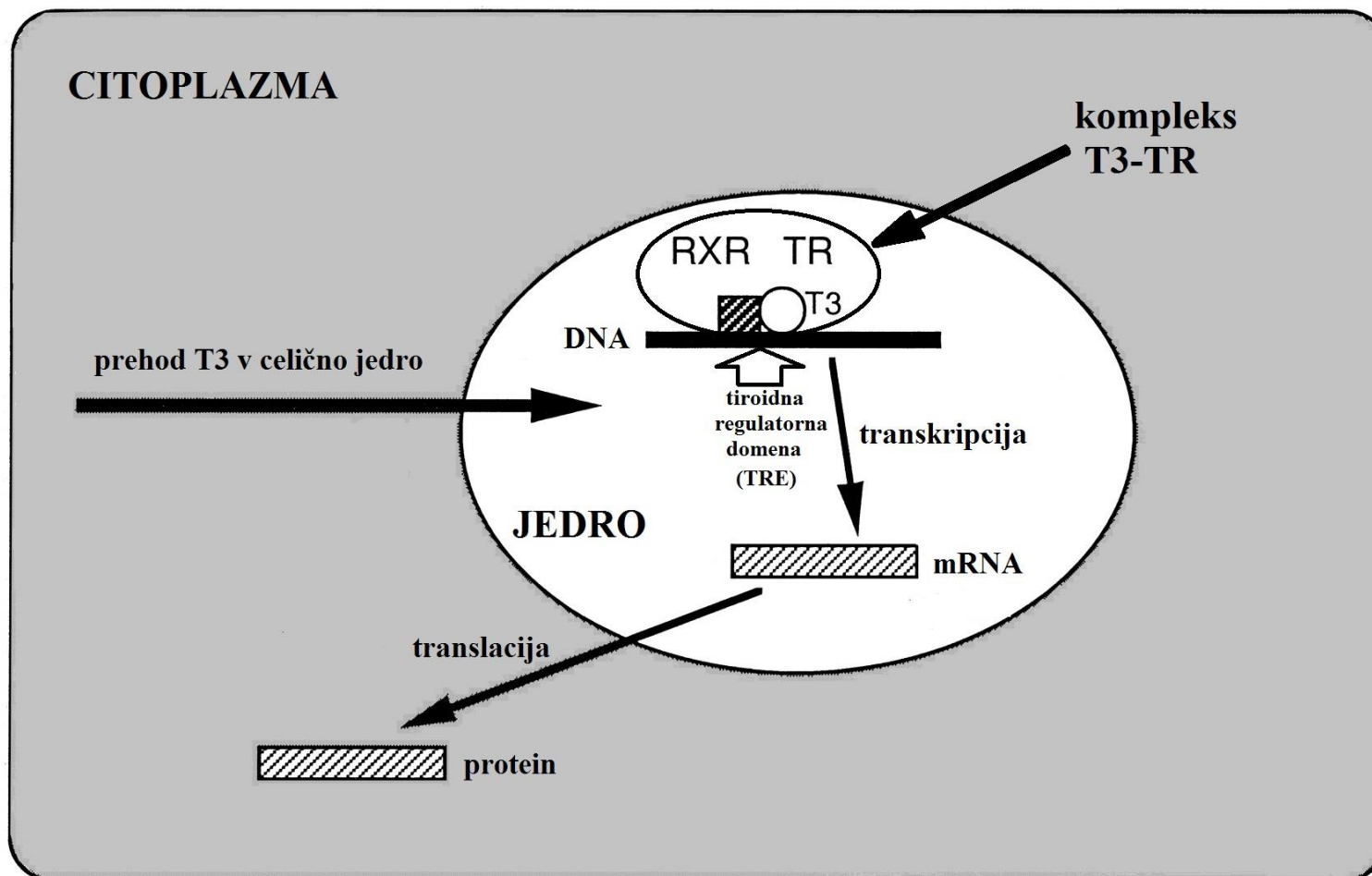
Priloga 3: Sinteza ščitničnih hormonov T3 in T4. Beseda na puščicah predstavlja ime encima, ki katalizira delne reakcije sinteze (15).



Priloga 4: *Prikaz strukturnih domen tiroidnega receptorja (20).*



Priloga 5: Shematski prikaz delovanja ščitničnih hormonov preko tiroidnega receptorja (20).



Priloga 6: Osnovne fizikalno kemijske lastnosti paracetamola (27).

<i>LASTNOST</i>	<i>VREDNOST</i>
<i>CAS številka</i>	103-90-2
<i>Molekulska formula</i>	$C_8H_9NO_2$
<i>Molekulska masa</i>	151.16 g/mol
<i>Vrelišče</i>	> 500 °C
<i>Tališče</i>	169-170 °C
<i>LogP</i>	0,49
<i>pKa</i>	9,38
<i>Gostota</i>	1,293 g/cm ³
<i>Topnost v vodi (20°C)</i>	14 g/L
<i>pH (vodna raztopina)</i>	5,5-6,5

Priloga 7: Znaki akutne toksičnosti paracetamola, razdeljeni po fazah (32).

<i>FAZA I: <u>0,5 - 24 ur po zaužitju</u></i>	<ul style="list-style-type: none">- slabost- bruhanje- slabo počutje- bledica- znojenje- utrujenost
<i>FAZA II: <u>24 - 72 ur po zaužitju</u></i>	<ul style="list-style-type: none">- bolečine v trebuhu- slabost- bruhanje- izguba apetita- tahikardija- hipotenzija- zmanjšano izločanje seča (oligurija)
<i>FAZA III: <u>72 - 96 ur po zaužitju</u></i>	<ul style="list-style-type: none">- bolečine v trebuhu- slabost- bruhanje- NEKROZA JETER, ki se kaže z:<ul style="list-style-type: none">- zlatenico- motnjami koagulacije- hipoglikemijo- jetrno encefalopatijo- akutna odpoved ledvic- smrt
<i>FAZA IV: <u>3 - 4 tedne po zaužitju</u></i>	<ul style="list-style-type: none">- obnavljanje organov, če je predozirani preživel fazo III

Priloga 8: Osnovni toksikološki parametri za PAR in DFC pri testiranju akutne in kronične toksičnosti. Besedilo v oklepaju za toksikološkim parametrom se nanaša na način aplikacije zdravilne učinkovine, vrsto organizma, na katerem je bilo testiranje izvedeno ter na čas izpostavljenosti (pri testiranju kronične toksičnosti) zdravilni učinkovini.

<p>PARACETAMOL</p> <p>•</p> <p>AKUTNA TOKSIČNOST</p>	<p>LD₅₀ (<i>per os</i>*, miši): 400-900 mg/kg (33)</p> <p>LD₅₀ (<i>per os</i>, podgane): 3000-4500 mg/kg (28)</p> <p>LD₅₀ (<i>per os</i>, človek): 250-500 mg/kg (33)</p>
<p>PARACETAMOL</p> <p>•</p> <p>KRONIČNA TOKSIČNOST</p>	<p>LOAEL (<i>per os</i>, podgane, 13 tednov): 1600 mg/kg/dan (33)</p> <p>NOAEL (<i>per os</i>, podgane, 13 tednov): 400-800 mg/kg/dan (33)</p>
<p>DIKLOFENAK</p> <p>•</p> <p>AKUTNA TOKSIČNOST</p>	<p>LD₅₀ (<i>per os</i>, miši): 95-1300 mg/kg (51)</p> <p>LD₅₀ (<i>per os</i>, podgane): 53-1500 mg/kg (51)</p> <p>LD₅₀ (<i>per os</i>, opice): 3200 mg/kg (52)</p>
<p>DIKLOFENAK</p> <p>•</p> <p>KRONIČNA TOKSIČNOST</p>	<p>LOAEL (<i>per os</i>, opice, 6 mesecev): 75 mg/kg/dan (43)</p> <p>LOAEL (<i>per os</i>, podgane, 6 mesecev): 16 mg/kg (43)</p> <p>NOAEL (<i>per os</i>, psi, 13 tednov): 0,3 mg/kg/dan (51)</p> <p>NOAEL (<i>i.m.</i>** , psi, 90 dni): 0,1 mg/kg/dan (51)</p>

* peroralna aplikacija (skozi usta)

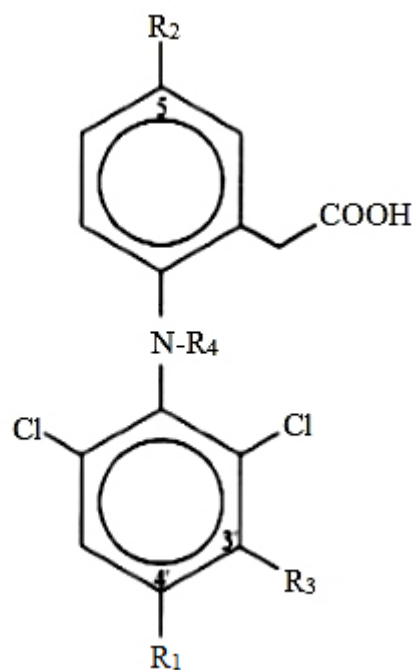
** intramuskularna aplikacija (v mišico)

Priloga 9: Osnovne fizikalno kemijske lastnosti diklofenaka in njegovega hidroksiliranega metabolita (37, 38, 39, 40).

<i>LASTNOST</i>	<i>VREDNOST</i>	
	<i>DIKLOFENAK</i>	<i>4'OH-DFC</i>
<i>CAS številka</i>	15307-86-5	64118-84-9
<i>Molekulska formula</i>	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃
<i>Molekulska masa (g/mol)</i>	296,15	312,15
<i>Vrelišče (pri 760 mmHg) (°C)</i>	412	433
<i>Tališče (°C)</i>	156-158	178-185
<i>LogP</i>	4,51	4,56
<i>pKa</i>	4,15	4,40
<i>Gostota (g/cm³)</i>	1,43	1,52
<i>Topnost</i>	voda	DMSO, etanol, metanol

Priloga 10: *Struktura diklofenaka in njegovih metabolitov (47).*

SPOJINA	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
diklofenak	H	H	H	H
3'-hidroksi diklofenak	H	H	OH	H
4'-hidroksi-diklofenak	OH	H	H	H
5-hidroksi-diklofenak	H	OH	H	H
4',5-dihidroksi-diklofenak	OH	OH	H	H
3'-hidroksi-4'-metoksi-diklofenak	OCH ₃	H	OH	H



Priloga 11: Osnovne fizikalno kemijske lastnosti piceatanola (55, 58).

<i>LASTNOST</i>	<i>VREDNOST</i>
<i>CAS številka</i>	10083-24-6
<i>Molekulska formula</i>	C ₁₄ H ₁₂ O ₄
<i>Molekulska masa (g/mol)</i>	244.24
<i>Vrelišče (pri 760 mmHg) (°C)</i>	507
<i>Tališče (°C)</i>	223-227
<i>LogP</i>	2,69
<i>pKa</i>	9,17
<i>Gostota (g/cm³)</i>	1,47
<i>Topnost</i>	DMSO, etanol

Priloga 12: Pregled bioloških aktivnosti piceatanola s pripadajočimi mehanizmi delovanja

	MEHANIZEM DELOVANJA
ANTIOKSIDANT	- vezava radikalov (54)
PROTIVNETNO DELOVANJE	- inhibicija COX-2 (55) - zmanjšanje izločanja interleukina 8 (IL-8) in dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- α) (54)
ANTI-KANCEROGENO DELOVANJE	
rak dojke	- nanomolarne koncentracije delujejo pro-kancerogeno, pride do aktivacije proto-onkogenega (c-Myc), ki povzroči proliferacijo in rast MCF-7 rakavih celic dojke; mikromolarne koncentracije delujejo anti-kancerogeno, pri konc. 25-50 μ M je rast in proliferacija MCF-7 celic inhibirana, pri 150 μ M pride do celične smrti (apoptoze) (54)
rak prostate	- inhibicija Janus kinaze (JAK1), z deaktivacijo STAT3 (<i>in vitro</i>) (56) - inhibicija metastaze z deaktivacijo STAT3 (<i>in vivo</i>) (54) - inhibicija rasti in proliferacije LNCaP rakavih celic prostate (<i>in vitro</i>) (55) - aktivacija kaspaze 8, 9, 7, 3 (54) - aktivacija proapoptotičnih faktorjev Bid, Bax, Bik, Bok in Fas (56) - zmanjšanje ravni beljakovin preživetja (antiapoptotičnih dejavnikov) Bcl-xL in Mcl-1 (56) - Inhibicija signalne poti IL-6 / STAT3 (54) - inhibicija metaloproteinaz (56) - inhibicija izločanja urokinaznega aktivatorja plazminogena (uPA) in vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (VEGF) v rakavih celicah prostate (56)

rak debelega črevesa	- povečanje zaostajanja CaCo-2, and HCT-116 rakavih celic debelega črevesa v G1 in S fazi celičnega cikla (<i>in vitro</i>) (56)
rak jeter	<ul style="list-style-type: none"> - inhibicija TCDD-odvisne indukcije CYP1A1 in CYP1B1 v HepG2 rakavih celic jeter (56) -kopičenje AH109A rakavih celic v G2 in M fazi celičnega cikla (<i>in vitro</i>) (54) -inhibicija proliferacije AH109A rakavih celic jeter (konc. 25μM) (54) - aktivacija apoptoze (konc. 100μM) (54)
rak mehurja	<ul style="list-style-type: none"> - inhibicija proliferacije T24 in HT1376 rakavih celic mehurja (56) - blokada napredovanja celičnega cikla v G0/G1 fazo (56) - aktivacija apoptoze rakavih celic (56)
levkemija in limfom	<ul style="list-style-type: none"> - povečanje aktivnosti proapoptotičnih proteinov Fas in FasL (59) - zmanjšanje izražanja antiapoptotičnih dejavnikov BCL-2 in cIAP-2 (59) - kopičenje celic v sub G1 fazi celičnega cikla (59) - zmanjšanje izločanja TNF-α in aktivacije NF-kB v U937 levkemičnih celicah (55) - aktivacija apoptoze v THP-1, HL-60, HUT78 levkemičnih celicah (56)
ANTIDIABETIČNO DELOVANJE	<ul style="list-style-type: none"> - spodbujanje privzema glukoze v celice - povečanje ekspresije (izražanja) fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) - povečanje fosforilacije AMPK (5'-adenozin-monofosfat protein kinaze) - povečanje aktivnosti GLUT 4 transporterja glukoze (54)

<p>ANTIADIPOGNEZNO DELOVANJE</p>	<p>- zaviranje proadipogeneznih faktorjev C/EBP in PPAR (59) - inhibicija fosforilacijskih in kinaznih signalnih poti (IR in PI3K/Akt) (59)</p>
<p>ANTIATEROSKLEROTIČNO DELOVANJE</p>	<p>- inhibicija fosforilacije ravnega faktorja PDGF-BB z encimi Akt, p70S6K in P38 (56) - preprečevanje zmanjšane proliferacije gladkih mišičnih celic žil, povzročene z rastnim faktorjem (56) - zmanjšanje aktivnosti PI3K (56) - zmanjšanje transkripcijske aktivnosti NF-κB in TNF-α (56)</p>
<p>TVORBA KOSTI</p>	<p>- povečanje tvorbe kostnega morfogenetskega proteina (BMP-2), ki preko aktivacije osteoblastov sproži tvorbo kosti (59)</p>
<p>ASTMA</p>	<p>- inhibicija sproščanja histamina in levkotrenov zaradi inhibicije selektivne tirozin kinaze (Syk) (59) - inhibicija sproščanja vnetnih celic (T in B celic ter monocitov) zaradi inhibicije Syk (59)</p>
<p>ALZHEIMERJEVA BOLEZEN</p>	<p>- vezava na tetramer transtiretin (TRR) prepreči, da bi se le-ta pretvoril v monomer in bi tako tvoril amiloidne obloge na nevronih (55)</p>

Priloga 13: Okoljske koncentracije preiskovanih spojin (ng/L).

	OKOLJSKE KONC.	LOKACIJA	REF.
<u>PARACETAMOL</u>	12-61	površinske vode, Koreja	(62)
	2.24	površinske vode, ZDA	(62)
	52-289	površinske vode, Velika Britanija	(62)
	66	reka Elbe, Nemčija	(62)
	1890	podzemne vode, Kanada	(63)
	40	reke, Španija	(63)
	180-1890	podzemne vode, Kalifornija	(64)
	1950	potoki, ZDA	(65)
	165-264	reka Temza, Velika Britanija	(65)
<u>DIKLOFENAK</u>	4200	odpadne vode, Balkan	(63)
	740	odpadne vode, Španija, Italija	(63)
	350-1160	tla, Kitajska	(63)
	1760	odpadne vode, Koreja	(63)
	1-7	jezera, Švica	(66)
	25	jezera, Nemčija	(66)
	5-35	pitna voda, Nemčija	(66)
	310-930	odpadne vode, Švica	(66)
	250-5450	odpadne vode, Francija, Italija, Grčija	(66)
	24	podzemne vode, Evropa	(63)
	49 - 282	reka Krka, Slovenija	(61)
	9	reka Sava, Slovenija	(61)
	41	reka Mura, Slovenija	(61)
	26 - 32	reka Drava, Slovenija	(61)
<u>4-HIDROKSIDIKLOFENAK</u>	1700	odpadne vode, Nemčija	(67)
	400-1800	kanalizacija, odplake, Pakistan	(68)
	60-710	odplake iz čistilnih naprav, Nemčija	(68)
<u>PICEATANOL</u>	-	-	-