

## FITOESTROGENY. II. WEWNĄTRZKOMÓRKOWY MECHANIZM DZIAŁANIA W UKŁADZIE ROZRODCZYM SAMICY\*

### PHYTOESTROGENS. II. MOLECULAR MECHANISM OF ACTION IN FEMALE REPRODUCTIVE TRACT

Anna NYNCA<sup>1</sup>, Olga KRASZEWSKA<sup>1</sup>, Maria SŁOMCZYŃSKA<sup>2</sup>,  
Renata CIERESZKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn;

<sup>2</sup>Pracownia Endokrynologii i Hodowli Tkanek Zakładu Fizjologii Zwierząt,  
Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*Streszczenie:* Fitoestrogeny to występujące w wielu roślinach związki chemiczne, które m.in. mogą wpływać na procesy rozrodcze ludzi i zwierząt. W komórkach docelowych mogą naśladować działanie estrogenów endogennych (działanie estrogenne), jak również działać w stosunku do nich antagonistycznie (działanie antyestrogenne). W prezentowanej pracy przedstawiono współczesne poglądy na wewnątrzkomórkowy mechanizm działania fitoestrogenów w komórkach jajnika, macicy i gruczołu mlekowego.

*Słowa kluczowe:* fitoestrogeny, genisteina, daidzeina, wewnątrzkomórkowa transdukcja sygnału, receptory estrogenowe, działanie estrogenne, działanie antyestrogenne, samica.

*Summary:* Phytoestrogens are plant-derived chemical compounds which may affect reproductive processes in humans and animals. In their target cells, phytoestrogens may mimic (estrogenic effects) or antagonize (antiestrogenic effects) action of endogenous estrogens. In the current paper, contemporary views are presented on intracellular mechanism of phytoestrogen action in ovarian, uterine, and mammary gland cells.

*Key words:* phytoestrogens, genistein, daidzein, signal transduction, estrogen receptors, estrogenic effect, antiestrogenic effect, female.

\*Praca była finansowana przez granty: PBZ-KBN-084/P06/2002 i UWM 528.0206.805 oraz ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach ZPORR (dla AN).

## WPROWADZENIE

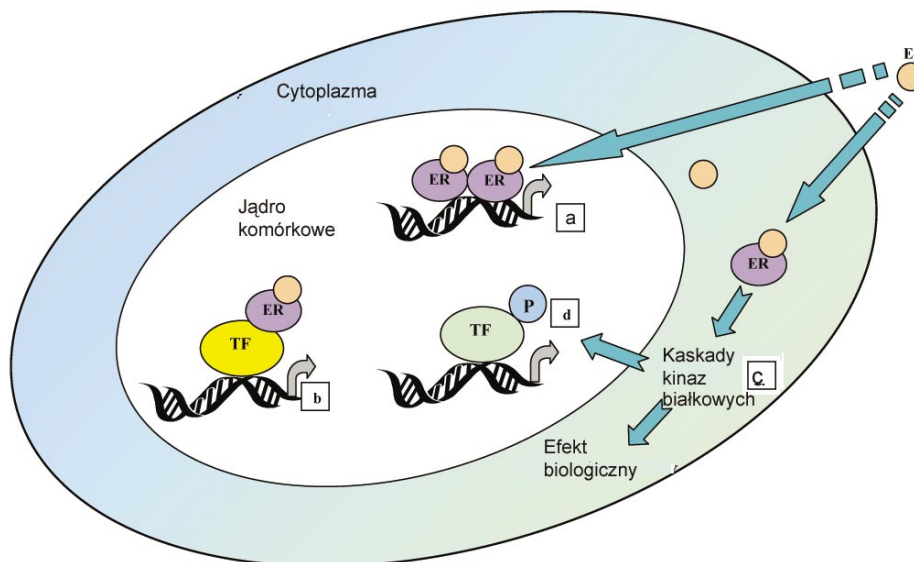
Fitoestrogeny to substancje pochodzenia roślinnego, strukturalnie przypominające estrogeny – hormony wytwarzane przez steroidogenne komórki organizmów zwierzęcych (estrogeny endogenne). Zawarte w diecie ludzi i zwierząt fitoestrogeny oddziałują na różne komórki i narządy, w tym te docelowe (jajnik, macica) dla estrogenów endogennych ( $17\beta$ -estradiol, estron). W komórkach docelowych, fitoestrogeny mogą naśladować działanie estrogenów endogennych (działanie estrogenne), jak również działać w stosunku do nich antagonistycznie (działanie antyestrogenne). Wyniki badań z ostatnich kilku lat wskazują, że fitoestrogeny wpływają na komórkową ekspresję receptorów estrogenowych (ER). Aktywacja ER, z kolei, może prowadzić do ekspresji genów zależnych od estrogenów. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania fitoestrogenów, poza oddziaływaniem z ER, może obejmować wpływ na aktywność enzymów odpowiedzialnych za syntezę i metabolizm samych estrogenów [15]. Fitoestrogeny oddziałują także na funkcje niektórych komórek za pośrednictwem mechanizmów niezwiązanych z estrogenami; mogą na przykład modulować aktywność białek zaangażowanych w wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnału [27] lub wpływać na ekspresję różnych estrogenoniezależnych genów [36].

## WEWNĄTRZKOMÓRKOWY MECHANIZM DZIAŁANIA ESTROGENÓW

Estrogeny wpływają na prawidłowy wzrost, rozwój i funkcje szeregu struktur układu rozrodczego, takich jak: jajniki, macica i pochwa [60]. Swoje efekty biologiczne indukują w komórkach docelowych zarówno za pomocą mechanizmów genomowych, jak i niegenomowych (ryc. 1).

### Genomowe działanie estrogenów i receptory estrogenowe

Najczęściej badanym sposobem działania estrogenów endogennych, a także środowiskowych jest droga genomowa, obejmująca aktywację swoistych ER (ryc. 1a) [18, 25]. Wyróżnia się dwa podstawowe typy receptorów estrogenowych: ER $\alpha$  i ER $\beta$ , które są kodowane przez dwa odrębne geny zlokalizowane na różnych chromosomach [40]. Należą one do rodziny receptorów wewnątrzkomórkowych i pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych. Zbudowane są z sześciu domen oznaczonych literami od A do F (ryc. 2). Domeny A i B, zlokalizowane na końcu aminowym białka, odpowiadają za aktywację transkrypcji niezależną od liganda. Domena C jest zaangażowana w dimeryzację receptora oraz w przyłączanie kompleksu ligand-receptor do specyficznej sekwencji DNA. Domena ta, we wszystkich typach receptorów wewnątrzkomórkowych, ma budowę tzw. palców cynkowych. W zjawisku dimeryzacji receptora bierze także udział domena E, a jej fragment położony na końcu karboksylowym jest odpowiedzialny za aktywację transkrypcji zależną od przyłączenia liganda [74]. Domena E zawiera



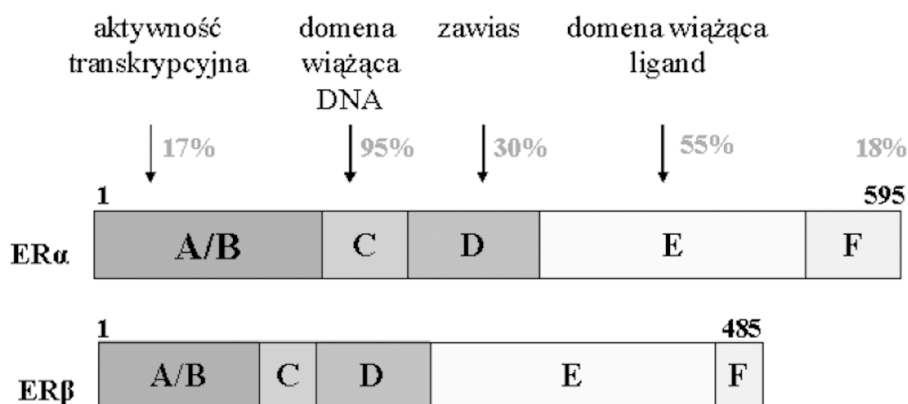
RYCINA 1. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania estrogenów: a – klasyczna droga genomowa ERE-zależna; b – droga genomowa ERE-niezależna, c – droga niegenomowa, d – droga niegenomowo-genomowa, ER – receptor estrogenowy, E – estradiol, TF – czynnik transkrypcyjny, P – reszta fosforanowa (zmodyfikowany wg [3] za zgodą The Endocrine Society)

strukturę hydrofobowej kieszeni przyłączającej specyficzny ligand. Największą homologię receptory wykazują w obrębie domeny C [32].

Do naturalnych ligandów ER zaliczamy endogenne estrogeny (np.  $17\beta$ -estradiol, estron) oraz fitoestrogeny (np. genisteina, daidzeina). Po przyłączeniu się liganda, receptor jest uwalniany z nieaktywnego kompleksu z białkami opiekuńczymi (hsp 90, 70 i 56), a w obrębie domeny E dochodzi do konformacyjnych zmian struktury receptora i powstania specyficznego miejsca wiązania dla koaktywatorów jądrowych [62]. Następnie ER dimeryzuje i wiąże się do specyficznego miejsca na DNA, zwanego miejscem odpowiedzi na estrogeny (ERE, ryc. 1a), stymulując lub hamując ekspresję odpowiednich genów [26, 66]. Z drugiej strony przybywa dowodów na to, że ER indukują ekspresję genów niezawierających ERE. U podstaw tego zjawiska leży modulacja przez kompleks ligand-ER czynników transkrypcyjnych innych niż ER (interakcja białko-białko). Jest to tzw. genomowa, ERE-niezależna droga działania receptorów estrogenowych (ryc. 1b) [3, 19]. U ludzi, około jedna trzecia genów, które są regulowane przez ER nie zawiera w swoim promotorze sekwencji ERE [55].

### Niegenomowe działanie estrogenów

Niektóre efekty wywoływane przez estrogeny zachodzą zbyt szybko, by mogły zależeć od transkrypcji i translacji [3]. Te szybkie odpowiedzi biologiczne są indukowane drogą tzw. mechanizmów niegenomowych (ryc. 1c). Należą tu m.in.: wpływ na



RYCINA 2. Struktura receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  (ER $\alpha$  i  $\beta$ ). ER $\alpha$  zbudowany jest z 595, a ER $\beta$  z 485 aminokwasów. W procentach przedstawiono stopień podobieństwa między homologicznymi domenami obydwu typów ER

syntezę i aktywność cyklicznego AMP [64], aktywacja różnych kinaz białkowych, np. kinaz tyrozynowych i kinaz MAP [44], czy też mobilizacja wewnątrzkomórkowych jonów wapnia [29]. Niektórzy autorzy sugerują, że niegenomowe działanie estrogenów może zachodzić za pomocą aktywacji tej subpopulacji ER, która jest zlokalizowana w błonie komórkowej [59, 64]. Obecny stan wiedzy wskazuje, że każdy z podtypów receptora estrogenowego może pośredniczyć zarówno w niegenomowym, jak i genomowym szlaku odpowiedzi na estrogeny.

## GENOMOWE DZIAŁANIE FITOESTROGENÓW

### Znaczenie receptorów estrogenowych w mechanizmie działania fitoestrogenów

Stwierdzono, że fitoestrogeny mogą wiązać się z ER i indukować sygnał podobny do sygnału estrogenowego. Mechanizm estrogennego działania fitoestrogenów może więc obejmować: a) aktywację ER, b) zwiększanie siły wiązania kompleksu ER-ligand do ERE i/lub c) ekspresję genów indukowanych estrogenami. Ponadto, w obecności estrogenów, fitoestrogeny mogą konkurować z estrogenami o miejsce wiążące w ER. Efekt antyestrogenowy może zostać wywołany przez fitoestrogeny wówczas, gdy: a) blokują w ER miejsce wiążące ligand, b) hamują wiązanie ER do DNA i/lub c) wpływają na ekspresję ER w sposób antagonistyczny do endogennych estrogenów, uniemożliwiając tym ostatnim wywoływanie specyficznej odpowiedzi biologicznej.

### Rozmieszczenie receptorów estrogenowych w organizmie zwierzęcym

Obecny stan wiedzy wskazuje na to, że estrogeny lub antyestrogeny charakter odpowiedzi indukowanej przez fitoestrogeny zależy m.in. od typu receptora i jego występowania w różnych tkankach. Dystrybucja obu typów ER w organizmie

zwierzęcym jest zróżnicowana [33]. ER $\alpha$  wykryto w macicy, jajniku, gruczole sutkowym, najądrzu, jądrze, sercu, aortalnej tętnicy, wątrobie, nerkach, nadnerczu, przysadce i podwzgórzu. Najwyższy poziom ekspresji ER $\beta$  zlokalizowano w jajniku (komórki ziarniste pęcherzyków przedowulacyjnych) i komórkach śródbłonna prostaty, a także w wielu innych tkankach, np. ośrodkowym układzie nerwowym, układzie krwionośnym, odpornościowym, moczowo-płciowym, pokarmowym i oddechowym [32]. Obie formy receptora współwystępują w gruczole sutkowym, macicy, jajniku oraz w naczyniach krwionośnych, przy czym przewaga jednego z nich zależy zwykle od tkanki i jej stanu fizjologicznego.

#### Powinowactwo fitoestrogenów do receptorów estrogenowych

Powinowactwo fitoestrogenów do ER zależy od rodzaju fitoestrogenu, typu receptora oraz gatunku zwierzęcia [52]. Przykładem może być genisteina (4',5,7-trihydroksyizoflawon), która wiąże się do ER $\beta$  z silnym powinowactwem, ale brak jednej (daidzeina, biochanina A) lub dwóch (formononetyna) grup hydroksylowych prowadzi do mniejszej lub większej utraty zdolności wiązania. Wykazano, że fitoestrogeny łatwiej wiążą się do receptorów ER $\beta$  niż do ER $\alpha$ , jak również silniej, w porównaniu z ER $\alpha$ , aktywują wiązanie ER $\beta$  do ERE [37]. Istnieje kilka powszechnie stosowanych metod umożliwiających badanie aktywności estrogennej fitoestrogenów. Oceniana jest w nich zdolność fitoestrogenów do wiązania się z ER (ang. *ligand binding*) oraz siła wiązania kompleksu ligand-ER do miejsca ERE (ang. *ER-binding to ERE*). Ponadto, aby ocenić estrogenną lub antyestrogenną aktywność fitoestrogenów często stosuje się wyposażone w gen reporterowy (zawierający ERE) komórki transfekowane cDNA dla ER $\alpha$  lub ER $\beta$  [67, 70]. Gen reporterowy charakteryzuje się następująco: 1) nie występuje w badanych komórkach w warunkach naturalnych, 2) ekspresję tego genu łatwo jest zmierzyć (np. gen lucyferazy lub zielonego białka fluorescencyjnego), 3) zawiera w swojej sekwencji ERE. Transfekowane komórki traktuje się fitoestrogenami, których aktywność wyraża się, w zależności od rodzaju genu reporterowego, np. intensywnością świecenia komórki. Badania aktywności fitoestrogenów, przeprowadzane na modelach komórkowych, pozwalają na przybliżoną ocenę możliwości oddziaływania tych roślinnych estrogenów na organizmy zwierzęce *in vivo*.

Zdolność wiązania fitoestrogenów i 17 $\beta$ -estradiolu (E $_2$ ) do ER $\alpha$  przedstawia się następująco: E $_2$  >>> kumestrol > genisteina > daidzeina > biochanina A > formononetyna, natomiast w przypadku ER $\beta$ : E $_2$  >> genisteina = kumestrol > daidzeina > biochanina A > formononetyna. Porównanie powinowactwa fitoestrogenów i E $_2$  do ER wskazuje na znacznie mniejszą aktywność biologiczną fitoestrogenów. Z drugiej strony, ilości spożywanych przez ludzi i zwierzęta fitoestrogenów mogą kompensować tę różnicę. Wiadomo również, że fitoestrogeny w koncentracji zaledwie 1–10 nM stymulują aktywność transkrypcyjną obydwu typów ER [40]. Ponadto, wyższe dawki fitoestrogenów (100 nM) mogą wywoływać odpowiedź komórkową porównywalną do odpowiedzi indukowanej przez hormony endogenne [2].

### Wpływ fitoestrogenów na receptory estrogenowe

**Estrogenne działanie fitoestrogenów.** Znaczenie ER w transdukcji sygnału indukowanego przez fitoestrogeny podkreślają liczne badania przeprowadzone na komórkach układu rozrodczego różnych gatunków zwierząt oraz liniach komórkowych raka gruczołu mlekowego. Wydaje się, że aktywacja ER jest dominującym mechanizmem wywoływanym przez fitoestrogeny (podobnie jak estrogeny) w komórkach docelowych. Badania na izolowanych bydłych komórkach endometrium i ciałka żółtego wykazały, że fitoestrogeny stymulują syntezę prostaglandyn przez te komórki oraz że wpływ ten zachodzi tylko poprzez aktywację ER [81, 82]. Fitoestrogeny mogą naśladować działanie estrogenów poprzez wpływ na ekspresję zarówno mRNA, jak i białka receptorowego ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Podawanie estrogenów lub fitoestrogenów (genisteina, daidzeina) szczurzycom obniżało poziom mRNA receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  w macicy tych zwierząt [9, 12, 14]. Przeciwnie, w komórkach ziarnistych jajnika myszy, genisteina stymulowała ekspresję ER $\alpha$  oraz ER $\beta$  [30], działając jednak także w sposób podobny do estrogenów [84]. Zatem, estrogeny charakter fitoestrogenów przejawiać się może zarówno poprzez obniżanie (macica), jak i stymulację (jajnik) ekspresji mRNA dla ER $\alpha$  i ER $\beta$ , a efekt tego oddziaływania zależy od rodzaju tkanki.

W doświadczeniach *in vivo* istotną rolę wydaje się odgrywać sposób podawania fitoestrogenów. Genisteina podawana podskórnie wywoływała spadek ilości białka ER $\alpha$  w tkankach macicy szczurów [8, 9]. Przeciwnie, genisteina dostarczana zwierzętom w paszy nie miała wpływu na ekspresję białek ER $\alpha$  i ER $\beta$  [8, 9, 12, 28]. Wyniki te sugerują, że efekty biologiczne wywoływane przez fitoestrogeny spożywane przez zwierzęta wraz z pokarmem są mniej wyraźne od efektów powodowanych przez fitoestrogeny podawane w formie iniekcji.

Estrogeny efekt działania fitoestrogenów obserwowano także w licznych badaniach *in vitro* przeprowadzanych na liniach komórkowych ludzkich komórek nowotworowych. Genisteina dodana do hodowli komórek raka gruczołu mlekowego powodowała spadek poziomu mRNA i białka dla ER $\alpha$  [13, 47, 68, 75], naśladując działanie estradiolu. Podobne do estradiolu działanie genisteiny zaobserwowano także w odniesieniu do ekspresji ER $\beta$ , gdzie poziom mRNA dla ER $\beta$  wzrastał po dodaniu do hodowli zarówno E $_2$ , jak i genisteiny [5]. Analiza wpływu genisteiny i biochaniny A oraz E $_2$  na ekspresję białka ER $\beta$  w izolowanych komórkach ziarnistych jajnika świni także wykazała wzrost poziomu tego białka zarówno po dodaniu do hodowli E $_2$ , jak i badanych fitoestrogenów [53]. Ponadto, w doświadczeniu wykonanym na osteoblastach świni zarówno E $_2$ , jak i daidzeina działały w ten sam sposób, podnosząc poziom ekspresji białka ER $\beta$  [11]. Analogiczne do estradiolu działanie fitoestrogenów w licznych tkankach układu rozrodczego oraz w komórkach nowotworowych uzasadnia celowość badań, jakie podejmują naukowcy, aby poznać mechanizm działania tych związków, szczególnie jeśli chodzi o potencjalne anty- lub pronowotworowe właściwości fitoestrogenów.

**Antyestrogenne działanie fitoestrogenów.** Estrogeny środowiskowe mogą działać przeciwnie do estrogenów endogennych. Istnieją doniesienia, że fitoestrogeny



(genisteina, kumestrol, ekwol, daidzeina) hamują specyficzne wiązanie  $E_2$  do ER w macicy i gruczole mlekowym ludzi oraz w macicy szczurów [2]. Antyestrogenne działanie estrogenów środowiskowych polegać może na modulowaniu ekspresji receptorów estrogenowych w komórkach docelowych. Działanie to widać szczególnie wyraźnie w strukturach mózgowych związanych z osią podwzgórze – przysadka – gonady. Podawanie szczurzycom pożywienia bogatego w fitoestrogeny powodowało podwyższenie poziomu mRNA dla ER $\beta$  w podwzgórzach, bez względu na to, czy w diecie była mieszanka fitoestrogenów [56, 80] czy dominowała genisteina [57] lub kumestrol [58, 80]. W tych samych układach doświadczalnych  $E_2$  powodował efekt przeciwny – obniżał poziom mRNA dla ER $\beta$ . Wzrost ilości białka ER $\alpha$  zaobserwowano również w komórkach przysadki owiec, którym genisteinę podano do trzeciej komory mózgu [63]. Jednak w tym doświadczeniu, podobnie jak w niżej cytowanym eksperymencie, nie badano wpływu estradiolu. Przeciwnie do szczurów i owiec, w podwzgórzach u świni daidzeina hamowała ekspresję mRNA dla ER $\beta$  [65]. Fitoestrogeny mogą zaburzać funkcjonowanie organizmu ludzi i zwierząt działając przeciwstawnie do estrogenów endogennych i zmieniając odpowiedzi wywoływane przez te hormony.

**Od czego zależy wpływ fitoestrogenów na ekspresję receptorów estrogenowych?** Opisane powyżej działania fitoestrogenów wydają się zależeć przede wszystkim od gatunku zwierzęcia, badanej tkanki, typu ER oraz sposobu podania fitoestrogenów. Poza tym, czynnikiem wpływającym na ekspresję ER jest również stężenie stosowanych fitoestrogenów [30, 54], które może także decydować o estrogenym lub antyestrogenym działaniu badanego związku. Genisteina podawana podskórnie kilkudniowym myszom, w dawce 1  $\mu$ g na dobę podwyższała, a w dawce 100  $\mu$ g obniżała poziom mRNA i białka receptorowego ER $\alpha$  i ER $\beta$  w jajnikach [30]. Podobnie, niskie stężenia genisteiny stymulowały ekspresję mRNA dla ER $\alpha$  w ludzkich komórkach endometrium *in vitro*, a wysokie ekspresję tę obniżały [83]. Genisteina nie wykazywała jednak dwufazowej aktywności w badaniach na komórkach ludzkiej linii komórek raka piersi (MCF-7), gdyż podawana do medium hodowlanego zarówno w niższej (10  $\mu$ M), jak i wyższej (100  $\mu$ M) koncentracji zmniejszała poziom białka ER $\alpha$  [47]. Być może, w tym przypadku, nie badano dawki genisteiny dostatecznie niskiej dla tego układu doświadczalnego. Dyskutowane związki między fitoestrogenami obecnymi w diecie a chorobami nowotworowymi czy naczyniowymi [39] uzasadniają potrzebę podejmowania badań dotyczących zależnego od dawki wpływu fitoestrogenów na komórki docelowe.

Wrażliwość komórek układu rozrodczego na działanie fitoestrogenów wydaje się także zależeć od czasu ekspozycji na te związki oraz od środowiska hormonalnego, w jakim badane komórki się znajdują. W komórkach macicy szczurów iniekcje genisteiny wywoływały zróżnicowane efekty w zależności od czasu ekspozycji oraz od tego, który typ ER badano i czy czynnikiem badanym był poziom mRNA czy białka ER. Zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu mRNA dla ER $\beta$  po 7 godzinach od iniekcji, natomiast po jednej lub trzech dobach efekt ten nie był już tak widoczny [12]. W tym samym doświadczeniu, genisteina hamowała także ekspresję mRNA dla ER $\alpha$ , jednak efekt ten nie zmieniał się w czasie. Natomiast badania Lee i wsp. [42], w których analizowano ekspresję białka receptorowego

ER $\alpha$  i ER $\beta$  w macicy szczurzym, wykazały wzrost poziomu ER $\alpha$  po 3 i 6 godzinach po iniekcji genisteiny, podczas gdy po 12 i 24 godzinach ilość ER $\alpha$  nie różniła się od grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano natomiast zmian w poziomie białka ER $\beta$  bez względu na czas, jaki upłynął od iniekcji genisteiny [42]. Ciekawe jest, że większość badań dotyczących wpływu genisteiny na ekspresję ER $\alpha$  w komórkach MCF-7 wykazuje brak wpływu czasu ekspozycji na fitoestrogen. Zarówno krótsze (24 godz.), jak i długotrwałe (6 dni) traktowanie komórek genisteiną hamowało ekspresję mRNA ER $\alpha$  [47, 68, 75]. Czas ekspozycji komórek na fitoestrogeny może być czynnikiem, od którego zależy wpływ tych związków m.in. na ekspresję ER. Wydaje się jednak, że zarówno typ receptora, jak i rodzaj tkanki odgrywa ważniejszą niż czas rolę w tych oddziaływaniach.

### Wpływ fitoestrogenów na siłę wiązania aktywnych ER do ERE/transaktywację ER

Fitoestrogeny, oprócz wpływu na ekspresję ER, mogą zaburzać funkcjonowanie ER-pozytywnych komórek poprzez modulowanie siły wiązania ER $\alpha$  i/lub ER $\beta$  do specyficznego miejsca na DNA. Najczęściej związki te działają jak agoniści ER, współzawodnicząc z endogennymi estrogenami w stymulowaniu wiązania ER do ERE. Kumestrol, ekwol, genisteina i daidzeina indukowały wiązanie ER $\alpha$  i ER $\beta$  do ERE [37]. Podobnie, Harris i wsp. [23] wykazali, że zarówno w obecności, jak i przy braku E<sub>2</sub> genisteina i daidzeina zwiększały siłę wiązania ER $\beta$  do ERE w komórkach MCF-7. Badania na transfekowanych komórkach (sztucznie zaopatrzonych w ER i ERE) również wykazały, że fitoestrogeny (genisteina, daidzeina, kumestrol, biochanina A, apigenina), działając analogicznie do E<sub>2</sub>, stymulowały transaktywację ER [1, 67]. Siła transaktywacji ER zależała od rodzaju stosowanego fitoestrogenu i jego dawki. Przykładowo, koncentracja fitoestrogenu niezbędna do wywołania 50% maksymalnej indukcji transaktywacji wynosiła w przypadku genisteiny – 55 nM, daidzeiny – 1,2  $\mu$ M, a biochaniny A – 50  $\mu$ M [1]. Natomiast wyższe stężenia (> 50  $\mu$ M) niektórych fitoestrogenów (kumestrol, kempferol, kwercetyna) hamowały proces wiązania receptorów estrogenowych do DNA blokując efekty biologiczne wywoływane przez endogenne estrogeny [23, 37].

Większość badań dotyczących mechanizmu działania fitoestrogenów wskazuje na bardzo ważną rolę, jaką pełnią receptory estrogenowe. Wpływ fitoestrogenów na ekspresję ER, siłę wiązania aktywnych ER do ERE oraz na transaktywację ER wydaje się być kluczowym mechanizmem oddziaływania tych związków w komórkach układu rozrodczego samicy.

### Znaczenie innych receptorów w mechanizmie działania fitoestrogenów

Mechanizm działania fitoestrogenów może również obejmować aktywację receptorów wewnątrzkomórkowych innych niż ER. Niestety niewiele jest publikacji poświęconych temu problemowi u samic. Dlatego też w tym rozdziale uwzględnimy również informacje uzyskane w doświadczeniach przeprowadzonych na samcach i liniach komórkowych. Podanie szczurom genisteiny w pożywieniu powodowało indukcję ekspresji mRNA dla receptora progesteronowego (PR) oraz spadek poziomu



białka PR w macicy [12]. Natomiast, iniekcje genisteiny nie wpływały na poziom mRNA dla PR, ale powodowały wzrost białka PR w macicy szczurzym [9]. U samców szczura, spożywanie genisteiny wywoływało spadek ekspresji zarówno mRNA, jak i białka dla receptora androgenowego (AR) w prostaty [17, 45]. Podobnie w jądrach u myszy zaobserwowano spadek poziomu mRNA dla AR po podaniu genisteiny [73]. W badaniach na transfekowanych komórkach Hepa-1 (mysia linia komórkowa komórek raka wątroby) wykazano, że fitoestrogeny mogą również aktywować receptor węglowodorów aromatycznych (AhR), który uważany jest powszechnie za receptor dioksyn [72, 85]. Inni autorzy wykazali, że biochanina A indukowała zdolność wiązania się AhR do odpowiedniego miejsca na DNA w komórkach MCF-7 [22]. Ponadto, zaobserwowano aktywację receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów (PPAR) przez daidzeinę, biochaninę A i formononetynę w ludzkich komórkach nowotworu macicy HeLa [71]. Możliwość oddziaływania fitoestrogenów poprzez kilka różnych receptorów czyni mechanizm ich działania bardziej złożonym. Mogą one zaburzać funkcjonowanie komórek, które mają receptory inne niż estrogenowe i uruchamiać szlaki wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału niezwiązane z ER.

## NIEGENOMOWE DZIAŁANIE FITOESTROGENÓW

Wiele efektów, które fitoestrogeny wywołują w komórkach układu rozrodczego samicy, zachodzi zbyt szybko, by mogły one być związane z ekspresją specyficznych genów i biosyntezą białek. To niegenomowe działanie fitoestrogenów może obejmować wiele różnych procesów wewnątrzkomórkowych dotyczących m.in. cyklu komórkowego i proliferacji komórek, biosyntezy i metabolizmu hormonów steroidowych i kwasów tłuszczowych czy wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału.

### Wpływ fitoestrogenów na aktywność enzymów steroidogenezy oraz enzymów metabolizujących estrogeny

Fitoestrogeny mogą wpływać na dostępność estrogenów endogennych poprzez wpływ na enzymy biorące udział w syntezy, a także metabolizmie estrogenów. Badania na ludzkich luteinizujących komórkach ziarnistych wykazały, że genisteina, daidzeina i biochanina A hamują aktywność dehydrogenazy  $3\beta$ -hydroksysteroidowej ( $3\beta$ -HSD) oraz dehydrogenazy  $17\beta$ -hydroksysteroidowej ( $17\beta$ -HSD) – enzymów odpowiedzialnych za przekształcanie odpowiednio pregnenolonu w progesteron ( $P_4$ ) i estronu w  $E_2$  [41, 79]. Fitoestrogeny wiązały się do tych enzymów, redukując ich dostępność i skuteczność w przekształcaniu prekursorów steroidowych [10, 41, 78]. Ponadto, stwierdzono, że mikromolowe dawki genisteiny, biochaniny A, daidzeiny i apigeniny obniżały aktywność aromatazy (enzym konwertujący testosteron do  $E_2$ ) w ludzkich luteinizujących komórkach ziarnistych [41]. Z drugiej strony, dodanie genisteiny do hodowli ludzkich komórek endometrium powodowało wzrost poziomu białka aromatazy, a także aktywności tego enzymu [16].

Wykazano, że genisteina zmniejsza produkcję  $E_2$  i estronu poprzez inhibicję aktywności  $17\beta$ -HSD i aromatazy w komórkach nowotworowych MCF-7, przyczyniając się w ten sposób do hamowania proliferacji tych komórek [4]. W komórkach raka prostaty genisteina hamowała aktywność  $5\alpha$ -reduktazy, co może być jednym z czynników obniżających ryzyko wystąpienia tej choroby [20]. W przeciwieństwie do efektów powodowanych przez fitoestrogeny w badaniach *in vitro*, fitoestrogeny obecne w diecie nie wpływały na aktywność enzymów szlaku steroidogenezy [43, 76].

Ponadto, fitoestrogeny mogą hamować aktywność enzymów odpowiedzialnych za przekształcanie aktywnych biologicznie estrogenów w nieaktywne formy, np. siarczany. Genisteina i metabolit daidzeiny – ekwol hamowały estrogenową sulfotransferazę w preparatach cytozolowych pochodzących z ludzkiej wątroby [24]. Podobnie Kirk i wsp. [35] wykazali w płytkach krwi u ludzi hamujący wpływ flawonoidów (m.in. genisteiny, daidzeiny, apigeniny) na aktywność sulfotransferazy. Interesujące, że dawki flawonoidów zdolne do obniżania aktywności sulfotransferaz są porównywalne ze stężeniami obecnymi we krwi osobników spożywających dietę bogatą w fitoestrogeny. Wydaje się, że wpływ fitoestrogenów na dostępność estrogenów w komórce poprzez modulowanie steroidogenezy oraz metabolizmu estrogenów może być istotnym czynnikiem regulującym różne procesy komórkowe.

#### Wpływ fitoestrogenów na białka wiążące hormony płciowe

Większość estrogenów krążących we krwi związanych jest z białkami wiążącymi SBP (ang. *sex steroid binding protein*). Wykazano, że genisteina stymuluje syntezę SBP w hodowlach ludzkich hepatocytów [2]. Takie działanie fitoestrogenów może redukować poziom wolnych (niezwiązanych) estrogenów we krwi, co zmniejsza ich dostępność dla komórek [66]. Z drugiej strony, fitoestrogeny mogą hamować wiązanie hormonów steroidowych do SBP [50]. Jury i wsp. [31] wykazali, że estrogeny środowiskowe konkurują z endogennymi steroidami o miejsca wiążące w SBP i w przypadku dużej ilości fitoestrogenów we krwi mogą one wypierać z tego wiązania estrogeny endogenne. Fitoestrogeny poprzez wpływ na syntezę SBP i siłę wiązania estrogenów do SBP mogą regulować poziom wolnych estrogenów, czyniąc je z jednej strony dostępnymi dla komórek docelowych, a z drugiej bardziej podatnymi na przemiany metaboliczne.

#### Wpływ fitoestrogenów na wewnątrzkomórkowe enzymy i przekaźniki transdukcji sygnałów

Genisteina jest uważana za inhibitor kinaz tyrozynowych (PTK), enzymów pełniących ważną rolę w transdukcji sygnałów komórkowych i regulacji cyklu komórkowego [6]. Jako inhibitor PTK, może regulować uwalnianie przez komórki jajnika substancji biologicznie czynnych, wywierających stymulujący efekt na procesy rozrodcze, np. insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1),  $P_4$ ,  $E_2$  i cAMP [48, 77]. Stwierdzono, że genisteina, poprzez hamowanie aktywności PTK, zwiększała syntezę cAMP przez komórki ziarniste jajnika ludzi [79], bydła i królika [48]. Genisteina

wykazywała też hamujący wpływ na produkcję  $P_4$  przez luteinizujące komórki ziarniste szczura [77] oraz  $P_4$  i  $E_2$  przez luteinizujące komórki ziarniste ludzi [79].

Obniżanie aktywności PTK przez genisteinę może stanowić jeden z mechanizmów hamujących rozwój nowotworów. Genisteina, obniżając aktywność tych kinaz, przyczynia się do spadku ilości ufosforylowanej tyrozyny w komórce. Sugeruje się, że procesy fosforylacji tyrozyny są skorelowane z rozwojem raka, gdyż około 50% onkogenów koduje receptory mające aktywność kinazy tyrozynowej lub inne wewnątrzkomórkowe białka katalizujące fosforylację tyrozyny [46]. Fitoestrogeny hamują także aktywność kinazy białkowej C [27] oraz kinaz MAP [10]. Niestety, w doświadczeniach, w których przedmiotem badań były właściwości fitoestrogenów odpowiedzialne za hamowanie aktywności enzymów komórkowych, stosowano tylko wysokie (30–100  $\mu\text{M}$ ), niespotykane w warunkach *in vivo* stężenia fitoestrogenów [61].

#### Wpływ fitoestrogenów na stymulatory i inhibitory angiogenezy oraz topoizomerazy

Liczne doświadczenia z udziałem fitoestrogenów dotyczą zjawiska angiogenezy, towarzyszącej np. nowotworzeniu. Tworzenie się nowych naczyń krwionośnych jest uwarunkowane działaniem substancji stymulujących angiogenezę, tj. naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) i metaloproteinaz (MMP). VEGF jest czynnikiem mitogennym dla komórek śródbłonka naczyń. Metaloproteinazy natomiast degradują macierz zewnątrzkomórkową, ułatwiając rozwój nowotworu. Za inhibitory angiogenezy uważa się cytokiny (np. interleukina 12 i 18), angiopoetynę oraz tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP). Proces tworzenia się naczyń krwionośnych hamują także fitoestrogeny. Dodanie genisteiny do hodowli różnych typów nowotworowych linii komórkowych spowodowało obniżenie poziomu mRNA dla MMP [38]. Podobnie, genisteina hamowała MMP i stymulowała ekspresję TIMP w ludzkich komórkach raka piersi [69]. W tym samym doświadczeniu wykazano także hamujący wpływ genisteiny na angiogenezę *in vivo*. U myszy z wszczepionymi ludzkimi komórkami nowotworowymi po podaniu genisteiny zauważono zmniejszenie poziomu VEGF oraz zahamowanie rozwoju nowych naczyń krwionośnych i wzrostu nowotworu. Zjawisko hamowania angiogenezy przez fitoestrogeny może w przyszłości zostać wykorzystane do walki z chorobami nowotworowymi.

Obniżanie aktywności topoizomeraz typu I i II jest kolejnym przykładem potencjalnych, antynowotworowych właściwości genisteiny. Topoizomerazy to enzymy odpowiedzialne za katalizowanie reakcji przecinania i łączenia łańcuchów DNA, biorące czynny udział w licznych procesach komórkowych: replikacji DNA, rekombinacji, transkrypcji. Genisteina, hamując aktywność topoizomerazy II, może doprowadzić do zahamowania wzrostu komórkowego, a nawet do apoptozy komórek [7, 49]. Istnieją przypuszczenia, że niskie dawki genisteiny mogą indukować niewykrywalne uszkodzenia DNA w miejscach kodujących specyficzne geny odpowiedzialne za wzrost komórkowy [61]. Takie działanie fitoestrogenu w tkance rakowej przyczyniałoby się do obniżenia zdolności zmienionej tkanki do niekontrolowanego rozrostu.

### Wpływ fitoestrogenów na procesy antyoksydacyjne

Wolne rodniki uważa się za jeden z kancerogennych czynników, przyczyniających się do powstawania nowotworów u ludzi i zwierząt. Już w latach siedemdziesiątych znana była rola genisteiny jako przeciwutleniacza wykorzystywanego w przemyśle spożywczym [21]. Antyoksydacyjne właściwości fitoestrogenów (genisteina, daidzeina, kempferol, kumestrol) stwierdzono zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* [51]. Sugeruje to, że fitoestrogeny mogą przyczyniać się do obniżania zachorowalności na raka, ochraniając komórki przed peroksydacją lipidów oraz modulując syntezę, uczestniczących w procesie kancerogenezy, prostaglandyn i leukotrienów [34]. Genisteina może także obniżać produkcję reaktywnych form tlenu przez komórki nowotworowe i komórki układu immunologicznego [61]. W badaniach *in vivo* u myszy, genisteina podwyższała aktywność enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej [51]. Antyoksydacyjne właściwości fitoestrogenów, podobnie jak ich rola w hamowaniu aktywności topoizomeraz i angiogenezy, wydają się stanowić ważne mechanizmy, dzięki którym związki te mogą zostać wykorzystane do walki z chorobami nowotworowymi.

### PODSUMOWANIE

Analizując mechanizm działania fitoestrogenów nie można automatycznie przekładać wyników eksperymentów prowadzonych w określonych warunkach doświadczalnych (gatunek, płeć, tkanka, czas i sposób ekspozycji, stężenie i rodzaj fitoestrogenu, typ receptora) na inne warunki. Szczególną ostrożność należy zachować przy porównywaniu wyników uzyskanych w warunkach *in vitro* z zachodzącymi *in vivo*. Ze względu na ilość i różnorodność procesów, w regulację których zaangażowane są fitoestrogeny oraz ze względu na istniejące różnice gatunkowe, osobnicze i tkankowe wiele pytań dotyczących funkcji i mechanizmu działania fitoestrogenów pozostaje na razie bez odpowiedzi. Spośród poznanych dotąd sposobów wewnątrzkomórkowego działania fitoestrogenów największym zainteresowaniem cieszy się aktywacja receptorów estrogenowych. Mimo wysiłku licznych grup badawczych, nawet ten, tak intensywnie badany problem zawiera jeszcze wiele niewiadomych.

### PODZIĘKOWANIA

Autorki pragną podziękować Pani Prof. Luizie Duszy za cenne uwagi dotyczące przygotowywanego do druku manuskryptu.

### PIŚMIENNICTWO

- [1] AN J, TZAGARAKIS-FOSTER C, SCHARSCHMIDT TC, LOMRI N, LEITMAN DC. Estrogen receptor  $\beta$ -selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem* 2001; **276**(21): 17808–17814.

- [2] BENASSAYAG C, PERROT-APPLANAT M, FERRE F. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; **777**(1–2): 233–248.
- [3] BJÖRNSTRÖM L, SJÖBERG M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005; **19**(4): 833–842.
- [4] BROOKS JD, THOMPSON LU. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **94**: 461–467.
- [5] CAPPELLETTI V, MIODINI P, DI FRONZO G, DAIDONE MG. Modulation of estrogen receptor-beta isoforms by phytoestrogens in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2006; **28**(5): 1185–1191.
- [6] CHU L, ZHANG J-X, NOROTA I, ENDOH M. Differential action of a protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, on the positive inotropic effect of endothelin-1 and norepinephrine in canine ventricular myocardium. *Br J Pharmacol* 2005; **144**(3): 430–442.
- [7] CONSTANTINOU A, KIGUCHI K, HUBERMAN E. Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* 1990; **50**(9): 2618–2624.
- [8] COTRONEO MS, FRITZ A, LAMARTINIERE CA. Dynamic profiling of estrogen receptor and epidermal growth factor signaling in the uteri of genistein- and estrogen-treated rats. *Food Chem Toxicol* 2005; **43**: 637–645.
- [9] COTRONEO MS, LAMARTINIERE CA. Pharmacologic, but not dietary, genistein supports endometriosis in a rat model. *Toxicol Sci* 2001; **61**: 68–75.
- [10] DELUCA D, KRAZEINSEN A, BREITLING R, PREHN C, MÖLLER G, ADAMSKI J. Inhibition of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by phytoestrogens: comparison with other steroid metabolizing enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **93**: 285–292.
- [11] DE WILDE A, LIEBERHERR M, COLIN C, POINTILLART A. A low dose of daidzein acts as an ERbeta-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. *J Cell Physiol* 2004; **200**(2): 253–262.
- [12] DIEL P, GEIS RB, CALDARELLI A, SCHMIDT S, LESCHOWSKY UL, VOSS A, VOLLMER G. The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 2004; **221**: 21–32.
- [13] DIEL P, OLFF S, SCHMIDT S, MICHNA H. Molecular identification of potential selective estrogen receptor modulator (SERM) like properties of Phytoestrogens in the human breast cancer cell line MCF-7. *Planta Med* 2001; **67**(6): 510–514.
- [14] DIEL P, SCHULZ T, SMOLNIKAR K, STRUNCK E, VOLLMER G, MICHNA H. Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; **73**: 1–10.
- [15] DUSZA L, CIERESZKO R, SKARŻYŃSKI DJ, NOGOWSKI L, OPÁŁKA M, KAMIŃSKA B, NYNCA A, KRASZEWSKA O, SŁOMCZYŃSKA M, WOŁAWEK-POTOCKA I, KORZEKWA A, PRUSZYŃSKA-OSZMAŁEK E, SZKUDELSKA K. Mechanism of phytoestrogen action in reproductive processes of mammals and birds. *Reprod Biol* 2006; **6**(Suppl 1): 151–174.
- [16] EDMUNDS KM, HOLLOWAY AC, CRANKSHAW DJ, AGARWAL SK, FOSTER WG. The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells. *Reprod Nutr Dev* 2005; **45**: 709–720.
- [17] FRITZ WA, WANG J, ELTOUM I-E, LAMARTINIERE CA. Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Mol Cell Endocrinol* 2002; **186**: 89–99.
- [18] GALABOVA-KOVACS G, WALTER I, AURICH C, AURICH J. Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under *in vitro* conditions. *Theriogenology* 2004; **61**: 963–976.
- [19] GOTTLICHER M, HECK S, HERRLICH P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 1998; **76**: 480–489.
- [20] HADDAD NG, FUGUA JS. Phytoestrogens: Effects on the Reproductive System. *The Endocrinologist* 2001; **11**: 498–505.
- [21] HAMMERSCHMIDT PA, PRAT DE. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J Food Sci* 1978; **43**: 556–559.
- [22] HAN EH, KIM JY, JEONG HG. Effect of biochanin A on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Arch Pharm Res* 2006; **29**(7): 570–576.
- [23] HARRIS DM, BESSELINK E, HENNING SM, GO VL, HEBER D. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; **230**(8): 558–568.



- [24] HARRIS RM, WOOD DM, BOTTOMLEY L, BLAGG S, OWEN K, HUGHES PJ, WARING RH, KIRK CJ. Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: implications for breast cancer risk and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 1779–1787.
- [25] HATSUMI T, YAMAMURO Y. Downregulation of estrogen receptor gene expression by exogenous 17 beta-estradiol in the mammary glands of lactating mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; **231**(3): 311–316.
- [26] HEWITT SC, KORACH KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in reproductive tissues. *Reproduction* 2003; **125**: 143–149.
- [27] HUANG RQ, FANG MJ, DILLON GH. The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABA<sub>A</sub> receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; **67**: 177–183.
- [28] HUGHES CL, LIU G, BEALL S, FOSTER WG, DAVIS V. Effects of genistein or soy milk during late gestation and lactation on adult uterine organization in the rat. *Exp Biol Med* 2004; **229**: 108–117.
- [29] IMPROTA-BREARS T, WHORTON AR, CODAZZI F, YORK JD, MEYER T, MCDONNELL DP. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4686–4691.
- [30] JEFFERSON WN, COUSE JF, PADILLA-BANKS E, KORACH KS, NEWBOLD RR. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)  $\alpha$  expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ER  $\beta$ -mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod* 2002; **67**: 1285–1296.
- [31] JURY HH, ZACHAREWSKI TR, HAMMOND GL. Interactions between human plasma sex hormone-binding globulin and xenobiotic ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; **75**: 167–176.
- [32] KALITA K, LEWANDOWSKI S, SKRZYPCZAK M, SZYMCZAK S, TKACZYK M, KACZMAREK L. Receptory estrogenowe. W: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. pod red. J. Nowaka i J.B. Zawilskiej, PWN, Warszawa 2004.
- [33] KIM H, PETERSON TG, BARNES S. Mechanism of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor  $\beta$  signaling pathways. *Am J Clin Nutr* 1998; **68**: 1418–1425.
- [34] KING MM, MCCAY PB. Modulation of tumor incidence and possible mechanisms of inhibition of mammary carcinogenesis by dietary antioxidants. *Cancer Res* 1983; **43**(5 Suppl): 2485s–2490s.
- [35] KIRK CJ, HARRIS RM, WOOD DM, WARING RH, HUGHES PJ. Do dietary phytoestrogens influence susceptibility to hormone-dependent cancer by disrupting the metabolism of endogenous oestrogens? *Biochem Soc Trans* 2001; **29**: 209–216.
- [36] KONSTANTAKOPOULOS N, MONTGOMERY KG, CHAMBERLAIN N, QUINN MA, BAKER MS, RICE GE, GEORGIU HM, CAMPBELL IG. Changes in gene expressions elicited by physiological concentrations of genistein on human endometrial cancer cells. *Mol Carcinog* 2006; **45**(10): 752–763.
- [37] KOSTELAC D, RECHKEMMER G, BRIVIBA K. Phytoestrogens modulate binding estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  to the estrogen response element. *J Agric Food Chem* 2003; **51**: 7632–7635.
- [38] KOUSIDOU OC, MITROPOULOU TN, ROUSSIDIS AE, KLETSAS D, THEOCHARIS AD, KARAMANOS NK. Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int J Oncol* 2005; **26**(4): 1101–1109.
- [39] KRASZEWSKA O, NYNCA A, KAMIŃSKA B, CIERESZKO R. Fitoestrogeny. I. Występowanie, metabolizm i znaczenie biologiczne u samic. *Post Biol Kom* 2007; **34**(1): 189–205.
- [40] KUIPER GGJM, LEMMEN JG, CARLSSON B, CORTON JC, SAFE SH, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B, GUSTAFSSON J-A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology* 1998; **139**: 4252–4263.
- [41] LACEY M, BOHDAY J, FONSEKA SMR, ULLAH AI, WHITHEAD SA. Dose-response effects of phytoestrogens on the activity and expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase in human granulosa-lutein cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **96**: 279–286.
- [42] LEE G-S, CHOI K-CH, KIM H-J, JEUNG E-B. Effect of genistein as a selective estrogen receptor beta agonist on the expression of *calbindin-D<sub>9k</sub>* in uterus of immature rats. *Toxicol Sci* 2004; **82**: 451–457.
- [43] LEPHART ED, THOMPSON JM, SETCHELL KD, ADLERCREUTZ H, WEBER KS. Phytoestrogens decrease brain calcium-binding proteins but do not alter hypothalamic androgen metabolizing enzymes in adult male rats. *Brain Res* 2000; **859**: 123–131.
- [44] LOSEL R, WEHLING M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 46–56.
- [45] LUND TD, MUNSON DJ, ADLERCREUTZ H, HANDA RJ, LEPHART ED. Androgen receptor expression in the rat prostate is down-regulated by dietary phytoestrogens. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; **16**: 2–5.
- [46] MAGEE PJ, ROWLAND IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 2004; **91**(4): 513–531.



- [47] MAGGIOLINI M, BONOFILIO D, MARSICO S, PANNO ML, CENNI B, PICARD D, ANDO S. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2001; **60**: 595–602.
- [48] MAKAREVICH A, SIROTKIN A, TARADAJNIK T, CHRENEK P. Effects of genistein and lavendustin on reproductive processes in domestic animals *in vitro*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; **63**: 329–337.
- [49] MARKOVITS J, LINASSIER C, FOSSE P, COUPRIE J, PIERRE J, JACQUEMIN-SABLON A, SAUCIER JM, LE PECQ JB, LARSEN AK. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 1989; **49**: 5111–5117.
- [50] MARTIN ME, HAOURIGUI M, PELISSERO C, BENASSAYAG C, NUNEZ EA. Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein. *Life Sci* 1996; **58**: 429–436.
- [51] MITCHELL JH, GARDNER PT, MCPHAIL DB, MORRICE PC, COLLINS AR, DUTHIE GG. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys* 1998; **360**(1): 142–148.
- [52] MORITO K, HIROSE T, KINJO J, HIRAKAWA T, OKAWA M, NOHARA T, OGAWA S, INOUE S, MURAMATSU M, MASAMUNE Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Biol Pharm Bull* 2001; **24**: 351–356.
- [53] NYNCA A, SŁOMCZYŃSKA M, CIERESZKO R. The effect of genistein and biochanin A on porcine granulosa cell function. 7<sup>th</sup> International Conference on Pig Reproduction, 12–15 June 2005, Rolduc, The Netherlands, abstr., p. 102.
- [54] OH SM, KIM YP, CHUNG KH. Biphasic effects of kaempferol on the estrogenicity in human breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 2006; **29**(5): 354–362.
- [55] O'LONE R, FRITH MC, KARLSSON EK, HANSEN U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2004; **18**: 1859–1875.
- [56] PATISAUL HB, DINDO M, WHITTEN PL, YOUNG LJ. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha- and beta dependent gene expression in the brain. *Endocrinology* 2001; **142**: 2946–2952.
- [57] PATISAUL HB, MELBY M, WHITTEN PL, YOUNG LJ. Genistein affects ER $\beta$ - but not ER $\alpha$ -dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology* 2002; **143**(6): 2189–2197.
- [58] PATISAUL HB, WHITTEN PL, YOUNG LJ. Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17 $\beta$ -estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. *Brain Res* 1999; **67**: 165–171.
- [59] PEDRAM A, RAZANDI M, LEVIN ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 2006; **20**(9): 1996–2009.
- [60] PELLETIER G, EL-ALFY M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 4835–4840.
- [61] PETERSON TG. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr* 1995; **125**(3): 784–789.
- [62] PIKE ACW, BRZOZOWSKI AM, HUBBARD RE. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; **74**: 261–268.
- [63] POLKOWSKA J, RIDDERSTRALE Y, WAŃKOWSKA M, ROMANOWICZ K, MISZTAL T, MADEJ A. Effects of intracerebroventricular infusion of genistein on gonadotrophin subunit mRNA and immunoreactivity of gonadotrophins and oestrogen receptor- $\alpha$  in the pituitary cells of the anoestrous ewe. *J Chem Neuroanat* 2004; **28**(4): 217–224.
- [64] RAZANDI M, PEDRAM A, GREENE GL, LEVIN ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originated from a single transcript: studies of ER $\alpha$  and ER $\beta$  expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999; **13**: 307–319.
- [65] REN MQ, KUHN G, WEGNER J, NÜRNBERG G, CHEN J, ENDER K. Feeding daidzein to late pregnant sows influences the estrogen receptor beta and type 1 insulin-like growth factor receptor mRNA expression in newborn piglets. *J Endocrinol* 2001; **170**: 129–135.
- [66] ROSSELLI M, REINHART K, IMTHURN B, KELLER PJ, DUBEY RK. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Hum Reprod Update* 2000; **6**(5): 332–350.
- [67] SCHREIHOFFER DA. Transcriptional regulation by phytoestrogens in neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2005; **231**: 13–22.
- [68] SEO H-S, DENARDO D, JACQUOT Y, LAÑOS I, VIDAL DS, ZAMBRANA CR, LECLERCQ G, BROWN PH. Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha. *Breast Cancer Res Treat* 2006; **99**(2): 121–134.

- [69] SHAO ZM, WU J, SHEN ZZ, BARSKY SH. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; **58**(21): 4851–4857.
- [70] SHARMA SC, CLEMENS JW, PISARSKA MD, RICHARDS JS. Expression and function of estrogen receptor subtypes in granulosa cells: regulation by estradiol and forskolin. *Endocrinology* 1999; **140**: 4320–4334.
- [71] SHEN P, LINT MH, NG TY, CHAN YH, YONG EL. Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPARalpha, PPARgamma, and adipocyte differentiation *in vitro*. *J Nutr* 2006; **136**: 899–905.
- [72] SHERTZER HG, PUGA A, CHANG C, SMITH P, NEBERT DW, SETCHELL KD, DALTON TP. Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones. *Chem Biol Interact* 1999; **123**: 31–49.
- [73] SHIBAYAMA T, FUKATA H, SAKURAI K, ADACHI T, KOMIYAMA M, IGUCHI T, MORI C. Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mouse. *Endocr J* 2001; **48**(6): 655–663.
- [74] TKACZYK M, KALITA K. Receptor estrogenowy  $\beta$  – budowa, regulacja i funkcja. *Post Biochem* 2001; **47**(1): 72–79.
- [75] WANG TTY, SATHYAMOORTHY N, PHANG JM. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 271–275.
- [76] WEBER KS, SETCHELL KDR, STOCCHO DM, LEPHART ED. Dietary soy phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 $\alpha$ -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol* 2001; **170**: 591–599.
- [77] WHITEHEAD SA, LACEY M. Protein tyrosine kinase activity of lavendustin A and the phytoestrogen genistein on progesterone synthesis in cultured rat ovarian cells. *Fertil Steril* 2000; **73**(3): 613–619.
- [78] WHITEHEAD SA, LACEY M. Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: evidence for FSH induction of 17 $\beta$ -HSD. *Hum Reprod* 2003; **18**: 487–494.
- [79] WHITEHEAD SA, CROSS JE, BURDEN C, LACEY M. Acute and chronic effects of genistein, tyrphostin and lavendustin A on steroid synthesis in luteinized human granulosa cells. *Hum Reprod* 2002; **17**: 589–594.
- [80] WHITTEN PL, PATISAUL HB, YOUNG LJ. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol Teratol* 2002; **24**(1): 47–54.
- [81] WOCLAWEK-POTOCKA I, ACOSTA TJ, KORZEKWA A, MAMADOU MB, SHIBAYA M, OKUDA K, SKARZYŃSKI DJ. Phytoestrogens modulate prostaglandin production in bovine endometrium: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Exp Biol Med* 2005; **230**(5): 326–333.
- [82] WOCLAWEK-POTOCKA I, BOBER A, KORZEKWA A, OKUDA K, SKARZYŃSKI D. Equol and para-ethyl-phenol stimulate prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  secretion in bovine corpus luteum: intracellular mechanisms of action. *Prostag Oth Lipid M* 2006; **79**(3–4): 287–297.
- [83] XUE XO, WEI LH. Regulation of genistein on the levels of ERalpha, ERbeta mRNA in uterine endometrial cancer cells. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2005; **37**(3): 278–280.
- [84] YANG P, KRIATCHKO A, ROY SK. Expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and ovarian steroid hormones. *Endocrinology* 2002; **143**: 2385–2398.
- [85] ZHANG S, QIN C, SAFE SH. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect* 2003; **111**: 1877–1882.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 16.11. 2006 r.

Przyjęto: 17.01. 2007 r.

10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 1A;  
reniac@uwm.edu.pl