

[https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1\(54\).309040](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1(54).309040)

УДК: 577.322:615.9:632.95.024:547.972.3:615.256.51

Акішева А. С., аспірант; <https://orcid.org/0000-0002-0897-1253>

Сідлецький О. С., аспірант; <https://orcid.org/0000-0001-8834-8914>

Молодан Ю. О., аспірант; <https://orcid.org/0000-0002-2594-8274>

Макаренко О. А., д.б.н, с.н.с.; <https://orcid.org/0000-0001-8029-4392>

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова; кафедра фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти; Одеса, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна, e-mail: abcd35133@gmail.com

## ПРОГНОЗУВАННЯ МЕХАНІЗМІВ ВЗАЄМОДІЇ КВЕРЦЕТИНУ, $\alpha$ -ЦИПЕРМЕТРИНУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ З $\alpha$ -РЕЦЕПТОРОМ ЕСТРОГЕНУ (ДОСЛІДЖЕННЯ *IN SILICO*)

Проведено докінг-аналіз кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів 3-РВА та DCCA з ліганд-зв'язуючими доменами  $\alpha$ -рецептору естрогену. Також досліджена лікоподібність кверцетину. Встановлено, що всі досліджувані сполуки мали афінність до рецептору естрогену. За допомогою програмного забезпечення *AutoDock* та *AutoDockVina* з'ясована здатність  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів проявляти агоністичну дію по відношенню до  $\alpha$ -рецептору естрогену, в той час, як за оцінкою *Schrödinger Maestro Glide* вони є антагоністами даного рецептору. Кверцетин виступає агоністом  $\alpha$ -рецептору естрогену. Застосування кверцетину проти ендокринних порушень, викликаних  $\alpha$ -циперметрином, є доцільним через лікоподібні характеристики флавоноїду.

**Ключові слова:** молекулярний докінг;  $\alpha$ -рецептор естрогену; кверцетин;  $\alpha$ -циперметрин; 3-РВА, DCCA, деструктори ендокринної системи.

В останні роки значна увага приділяється деструкторам ендокринної системи, до яких відносяться діоксини, бісфенол А, пестициди (насамперед інсектициди), фталати. Ендокринні деструктори здатні проявляти гормоноподібну активність, взаємодіючи з рецепторами як агоністи та антагоністи. Втручання зазначених сполук у процеси гормональної регуляції призводить до патологічних змін у ендокринній системі та організмі в цілому [20, 10].

Інсектицидні пестициди діляться на декілька класів: фосфоорганічні, хлорорганічні, карбаматні та піретроїдні. Перші три класи є дуже небезпечними для нецільових видів, що окрім ендокринної токсичності виражається у важких порушеннях з боку нервової системи [30].

Піретроїдні інсектициди (піретроїди) – сімейство інсектицидів, які представляють собою ефіри хризантемової кислоти та є синтетичними аналогами рослинних піретринів. Дані сполуки широко використовуються в сільському господарстві, оскільки мають низьку токсичність для ссавців і відносно низьку стійкість у навколишньому середовищі порівняно з іншими інсектицидами [30].

Хоча піретроїди є безпечними в порівнянні з інсектицидами інших класів, деякі дослідження вказують, що вони можуть спричинити низку проблем зі здоров'ям: розвиток онкологічних хвороб, патології репродуктивної системи у чоловіків та жінок, порушення внутрішньоутробного розвитку, захворювання нервової та серцево-судинної систем [39].

Серед піретроїдних інсектицидів одним з найбільш поширених є циперметрин та його стереоізомери, які широко використовуються для боротьби зі шкідниками в сільському господарстві та охороні здоров'я. Циперметрин може потрапити у повітря, ґрунт та водне середовище та передаватись харчовим ланцюгом, що створює ризики для накопичення в організмі людини [40].

У більшості тварин циперметрин метаболізується до 3-(2,2-дихлоретеніл)-2,2-диметилциклопропанкарбонової кислоти (DCCA) і 3-феноксibenзойної кислоти (3-PBA). Ці метаболіти часто виявляли у людей в зразках сечі та грудному молоці. Їх концентрація сильно корелює з ризиком передчасної недостатності яєчників [9, 18].

Сучасні дослідження демонструють, що циперметрин завдає великої шкоди здоров'ю та ендокринній функції статевих залоз, через зв'язування з рецепторами естрогену. Однак мало що відомо про вплив його стереоізомеру –  $\alpha$ -циперметрину – на стан репродуктивної системи в осіб жіночої статі [34, 40].

Молекулярний докінг є одним із популярних прийомів, який зазвичай використовується для прогнозування положення ліганду та прогнозування афінності зв'язування ліганду [21].

Рецептори естрогенів (ER) належать до суперродини ядерних рецепторів стероїдних гормонів. Стероїдні рецептори діють як ліганд-залежні фактори транскрипції, і їх активність пов'язана з клітинним циклом. Існують два класи ядерних рецепторів естрогену:  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) та  $\beta$  (ER $\beta$ ) [16, 32].

Обидва класи ER відіграють важливу роль у фізіологічних процесах, а ER $\alpha$  особливо важливий у функціонуванні нервової, скелетної, серцево-судинної та репродуктивної тканин. У лабораторних тварин з нокаутованим геном ER $\alpha$  (ESR1), порушується розвиток та функція цих тканин. Процеси остеогенезу та інгібування резорбції кісток естрадіолом здійснюються також ER $\alpha$ -залежним шляхом, що має значення у розвитку остеопорозу при менопаузі, як фізіологічній, так і передчасній. Зв'язування ксеноестрогенів та селективних модуляторів естрогенових рецепторів (SERM) з ER $\alpha$  викликає зміну естрогенної регуляції фізіологічних функцій [3, 17, 21, 28, 37, 23].

Таким чином, існує підвищений ризик розвитку патологічних наслідків інтоксикації піретроїдами з боку фізіологічних систем, функціонування яких залежить від ендокринної функції гонад. Враховуючи це, доцільним є пошук засобів профілактики ускладнень гонадотоксичної дії піретроїдів. Варто відмітити, що токсичність піретроїдів зумовлена не тільки гормоноподібністю даних сполук, але і тим, що в наслідок їх метаболічних перетворень генерується

велика кількість активних форм кисню, що створює умови для інтенсифікації процесів перекисного окиснення ліпідів.

На нашу думку, ефективним засобом захисту функції яєчників при інтоксикації піретроїдами можуть виступити біофлавоноїди – сполуки, які синтезуються виключно у рослинах. Деякі біофлавоноїди мають здатність зв'язуватися з ER і стимулювати естроген-залежну транскрипцію. Так, кристалографічні дослідження показують, що 4-гідроксильна група в кільці В ізофлавонів опосередковує зв'язування з ER [28].

Як потенційний засіб профілактики ендокринних порушень внаслідок інтоксикації піретроїдами нашу увагу привернув біофлавоноїд кверцетин з потужними антиоксидантними властивостями. Кверцетин демонструє різноманітний спектр біологічних ефектів, включаючи естрогеноподібну дію, завдяки чому він здатний регулювати ряд фізіологічних процесів в умовах дефіциту естрогенів різної етіології [36].

**Мета дослідження:** Дослідження *in silico* механізмів зв'язування кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних з  $\alpha$ -рецептором естрогену, особливостей фармакокінетики та профілю токсичності цих сполук.

### Матеріали та методи досліджень

Процедуру молекулярного докінгу проведено з використанням кристалічних структур ліганд-зв'язуючого домену (ЛЗД) ER $\alpha$ : 3ERT (в комплексі з 4-гідрокситамоксифеном (ОНТ), який є активним метаболітом тамоксифену – препарату з антиестрогенною дією), 1GWR, 1ERE (в комплексі з естрадіолом, який є ендogenous агоністом) та 1ERR (в комплексі з ралоксифеном – препаратом, який має виражений агоністичний вплив на ER $\alpha$  та використовується при лікуванні менопаузального остеопорозу) з бази даних біологічних макромолекул PDB (<http://www.rcsb.org/>).

Під час проведення дослідження було проведено докінг кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних (DCCA, 3-феноксibenзойна кислота). Розташування референтного ліганду використовували для визначення автоматичного виявлення сайту зв'язування. Використовувались три різних пакети програмного забезпечення для докінгу: Schrödinger Maestro –2023–2 Glide (trial license), AutoDock 4.2.6 (<https://autodock.scripps.edu/download-autodock4/>) та AutoDock Vina-1.2.5 (<http://vina.scripps.edu>).

*AutoDock 4.2.6 та AutoDockVina-1.2.5.* Структури лігандів (кверцетин,  $\alpha$ -циперметрин, DCCA, 3-РВА, референтні ліганди) подано у форматі \*.pdb та оптимізовано за значенням внутрішньої енергії в програмі Avogadro (v 1.2.0) і полі молекулярних сил Merck – алгоритм (MMFF94), протонування при фізіологічному значенні рН 7,4. Молекулярний докінг за допомогою програми AutoDock 4.2.6 проводився з використанням реалізованої емпіричної функції

вільної енергії та генетичного алгоритму Ламарка (LGA) для зв'язування лігандів білків [22].

*Schrödinger Maestro Glide.* Модуль LigPrep у наборі Schrödinger використовувався для підготовки лігандів перед докінгом, де вони були оптимізовані за допомогою алгоритму силового поля OPLS2005, діапазон рН для генерації таутомерів та протонних станів складав 7,4. Білок був змодельований за допомогою Protein Preparation of Schrödinger Suite; щоб підготувати структуру білка, були додані атоми водню та оптимізовані водневі зв'язки, рН 7,4. Якість геометричних контактів та їх енергію використовували для розрахунку взаємодії між білковими та лігандними комплексами. Така формула була використана для ранжування лігандів на основі їх G-показників:  $G\text{-показник} = (0,05 * vdW) + (0,15 * Coul) + Lipo + Hbond + Metal + Rewards + RotB + Site$  (1); де  $vdW$  – енергія Ван-дер-Ваальса,  $Coul$  представляє кулонівську енергію, термін  $Lipo$  пояснює ліпофільність,  $Rewards$  описує сприятливі гідрофобні взаємодії,  $Hbond$  – це показник, що відображає водневий зв'язок,  $Metal$  надає інформацію про зв'язування металу, інформує про негативний вплив, пов'язаний із заморожуванням обертових зв'язків, а  $Site$  визначає полярні взаємодії в активному центрі.

Оцінку якості результатів молекулярного докінгу, виявлення наявності стеричних перекриттів атомів лігандів з рецептором виконували за допомогою програмного забезпечення UCSF Chimera 1.17.3 [25]

*In silico* прогнозування фармакокінетичних властивостей та профіль токсичності досліджуваних сполук. Для *in silico* дослідження фармакокінетичних властивостей та токсичності кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину були використані платформи для швидкого аналізу кількох фармакокінетичних властивостей ркCSM, онлайн сервер admetSAR та SwissADME із налаштуваннями за замовчуванням шляхом подання хімічних структур у форматі SMILE [26, 6].

### Результати дослідження та їх обговорення

Першим етапом докінгу було отримання цільової структури естрогенового рецептору з Protein Data Bank (PDB), що містить 3D атомні координати [2].

Розташування сайту зв'язування визначалося за координатами референтного ліганду з використанням grid box MGL Tool (версія 1.5.7) та Schrödinger Suite. Ліганди були отримані з бази даних малих молекул PubChem [14].

Кожна програма докінгу використовує різні протоколи призначення заряду атомів ліганду. AutoDock використовує атомні заряди Гаштайгера-Марсілі, тоді як AutoDock Vina не потребує призначення атомних зарядів [38,8].

Було проведено протонування білкових молекул, а файли PDB рецепторів і лігандів були перетворені у формат PDBQT. Для AutoDock 4.2.6 встановлені параметри генетичного алгоритму: 80 циклів, популяції – 300, інші залишилися за замовчуванням. Розрахунки за допомогою Auto Dock Vina проводилися з 9 режимами зв'язування (number of binding modes), вичерпністю пошуку –

8 (exhaustiveness of search) і максимальною різницею в енергії – 3 (maximum energy difference). Функція оцінки в Auto Dock Vina використовується для оцінки передбачуваної спорідненості зв'язування між лігандом і його рецептором, оцінюючи силу зв'язувальної взаємодії між двома молекулами. На функцію підрахунку балів впливають як конформаційно-залежні фактори (внутрішньо-та міжмолекулярні внески, стерична, гідрофобна взаємодія та взаємодії водневих зв'язків), так і конформаційно-незалежні фактори (поворотні зв'язки, присутні в лігандах) [33, 38].

Згідно з функцією оцінки AutoDock, AutoDockVina та Schrödinger Maestro Glide, найнижчі енергетичні конформери макромолекулярних комплексів були обрані як найбільш стабільні конформації. Далі було проведено перевірку якості результатів молекулярного докінгу шляхом визначення наявності стеричних перекриттів атомів лігандів з рецептором. Були проаналізовані молекулярні механізми зв'язування досліджуваних лігандів та ліганд-зв'язуючого домену (ЛЗД) ER $\alpha$ , визначені молекулярні групи лігандів, які беруть участь у взаємодії з амінокислотними залишками білка.

Результати проведеного дослідження показали, що найнижчі енергії зв'язування з ER $\alpha$  мають референтні сполуки: естрадіол (1GWR, 1ERE), ралоксифен (1ERR), 4-гідрокситамоксифен (3ERT) (табл. 1).

Серед досліджуваних сполук саме  $\alpha$ -циперметрин демонструє найнижчу прогнозовану AutoDock енергію зв'язування з 1ERE (-10,4 ккал/моль), 1GWR (-10,0 ккал/моль) та 1ERR (-9,7 ккал/моль) що відображає стабільний ліганд-рецепторний комплекс та міцне зв'язування. Ці результати дозволяють припустити можливість агоністичної дії даного інсектициду. Водночас, як AutoDock, так і Vina передбачають, що  $\alpha$ -циперметрин має доволі сильну енергію зв'язування з 3ERT (ЛЗД рецептору естрогену в комплексі з антагоністом): -9,6 ккал/моль та -7,9 ккал/моль відповідно.

Кверцетин має найменші прогнозовані енергії зв'язування з 1ERR (-8,7 ккал/моль – AutoDock та -9,4 ккал/моль – Vina), що може свідчити про його агоністичний ефект, оскільки 1ERR – ЛЗД ER $\alpha$  людини в комплексі з ралоксифеном. Окрім того, найвищі прогнозовані AutoDock значення для кверцетину спостерігаються при зв'язуванні з 3ERT, що підтверджує низький антагоністичний вплив кверцетину на ER $\alpha$ . Хоча варто відмітити, що Vina передбачає однакоvu енергію зв'язування для кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину з 3ERT (табл. 1).

Стосовно зв'язування з 1GWR та 1ERE Vina також передбачає, що кверцетин та  $\alpha$ -циперметрин демонструють майже однакоvu енергію зв'язування, приблизно 8 ккал/моль (табл. 1).

ER складаються з N-кінцевого домену, центрального домену зв'язування ДНК, C-кінцевого ліганд зв'язуючого домену (ЛЗД) і двох окремих, конформаційно активних ділянок, позначених як активаційна функція 1 (AF-1) та акти-

Таблиця 1

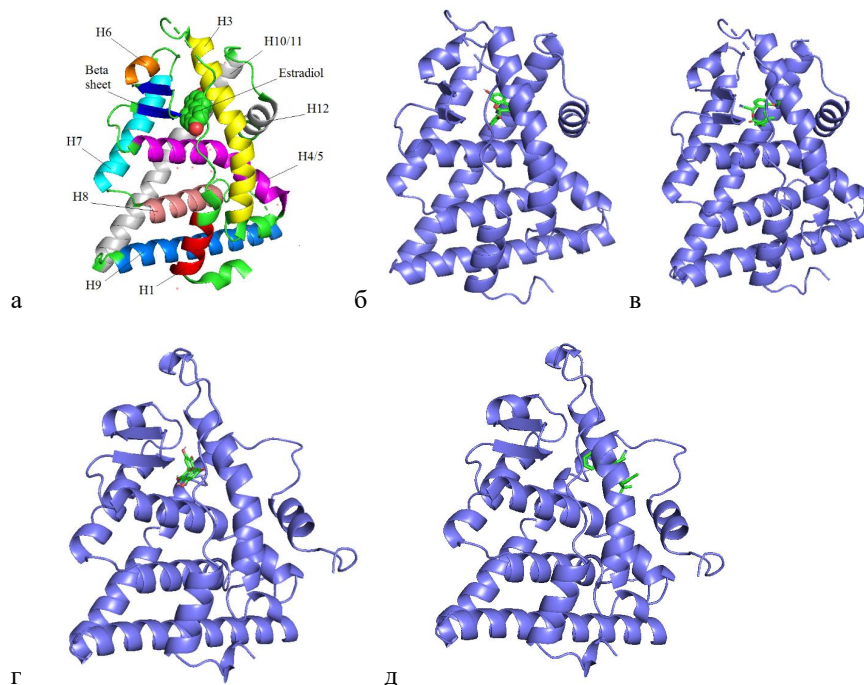
**Результати докінгу кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних (DCCA і 3-PBA) з ліганд-зв'язуючими доменами ER $\alpha$  з використанням програмного забезпечення AutoDock 4 та AutoDockVina**

	Кверцетин	$\alpha$ -циперметрин	DCCA	3-PBA	Референтні ліганди
<b>Прогнозована енергія зв'язування, ккал/моль</b>					
<b>3ERT</b> Auto Dock	-7,6	-9,6	-5,2	-5,8	4-гідрокси- тамоксифен -11,1
<b>3ERT</b> Vina	-7,9	-7,9	-6,1	-7,5	4-гідрокси- тамоксифен -9,8
<b>1GWR</b> Auto Dock	-7,9	-10,0	-5,3	-6,2	Естрадіол -9,6
<b>1GWR</b> Vina	-8,1	-8,0	-6,0	-7,9	Естрадіол -11,2
<b>1ERE</b> Auto Dock	-8,3	-10,4	-4,8	-6,2	Естрадіол -9,7
<b>1ERE</b> Vina	-7,5	-8,0	-6,0	-8,0	Естрадіол -11,0
<b>1ERR</b> Auto Dock	-8,7	-9,7	-4,8	-5,9	Ралоксифен -12,6
<b>1ERR</b> Vina	-9,4	-9	-5,5	-7,5	Ралоксифен -9,6

Примітка: DCCA – 3-(2,2-дихлоретеніл)-2,2-диметилциклопропанкарбонова кислота, 3-PBA – 3-феноксibenзойна кислота, 3ERT – кристалічна структура ліганд-зв'язуючого домену (ЛЗД) ER $\alpha$  людини в комплексі з 4-гідрокситамоксифеном, 1GWR та 1ERE – кристалічні структури ЛЗД ER $\alpha$  людини в комплексі з естрадіолом, 1ERR – ЛЗД ER $\alpha$  людини в комплексі з ралоксифеном.

ваційна функція 2 (AF-2). Передача сигналів ER залежить від ліганду/гормону та починається зі зв'язування ліганду з ЛЗД.

Ліганд зв'язуючий домен (ЛЗД) складається з дванадцяти  $\alpha$ -спіралей (H1-H12) і  $\beta$ -шпильки. H12 ЛЗД відіграє ключову роль молекулярного перемикача через прийняття різних ліганд-залежних конформацій, вирішальних для активації рецептора (рис. 1). На рисунку 1 представлені конформації білків 1GWR (ліганд зв'язуючий домен ER $\alpha$  з агоністом) та 3ERT (ліганд зв'язуючий домен ER $\alpha$  з антагоністом) з кверцетином та  $\alpha$ -циперметрином, отримані за допомогою AutoDock Vina. Можна відмітити структурні відмінності положення H12 у конформаціях білків 1GWR та 3ERT [16].



**Рис. 1** а) Ліганд зв'язуючий домен рецептора естрогену (PDB id 1GRW), візуалізовано PyMol; б) комплекс 1GWR-кверцетин; в) комплекс 1GWR- $\alpha$ -циперметрин; г) комплекс 3ERT-кверцетин; д) комплекс 3ERT- $\alpha$ -циперметрин

Найнижчі енергії зв'язування для DCCA програмне забезпечення AutoDock та Vina прогнозують з таким ЛЗД ER $\alpha$ , як 3ERT та 1GWR, для 3-PBA – з 1GWR та 1ERR. Метаболіти  $\alpha$ -циперметрину демонструють слабші взаємодії з ER $\alpha$  ніж пестицид та кверцетин (табл. 1).

В таблиці 2 продемонстровано результати докінг-аналізу з використанням програмного забезпечення Schrödinger Maestro Glide. Кверцетин, як і у випадку з AutoDock та Vina, демонструє найнижче значення Gscore з 1ERR та 1ERE (–9,38 ккал/моль та –9,27 ккал/моль відповідно), що характеризує стійкий комплекс, а найвище з 3ERT (–7,10 ккал/моль). Це може бути інтерпретовано як підтвердження слабких антагоністичних властивостей кверцетину до рецептору естрогену, оскільки 3ERT це комплекс ER $\alpha$  з 4-гідрокситамоксифеном.

Прогнозовані значення Gscore для  $\alpha$ -циперметрину відображають міцну взаємодію з 3ERT (–9,29 ккал/моль) та слабку взаємодію з 1GWR. Ці результати дозволяють висунути припущення про сильніші антагоністичні властивості  $\alpha$ -циперметрину по відношенню до ER $\alpha$ , ніж агоністичні (табл. 2).

Метаболіт  $\alpha$ -циперметрину DCCA має найвищі прогнозовані значення GScore, що відповідає слабкій взаємодії цієї сполуки з ER $\alpha$ . Інший метабо-

літ  $\alpha$ -циперметрину 3-РВА має схожі між собою значення для всіх варіантів ЛЗД ER $\alpha$  (табл. 2).

Таблиця 2

**Результати докінгу кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних з ліганд-зв'язуючими доменами ER $\alpha$  за допомогою програмного забезпечення Schrödinger Maestro Glide**

	ZERT	IGWR	IERE	IERR
	Gscore, ккал/моль			
Кверцетин	-7.10	-8.69	-9.27	-9.38
$\alpha$ -циперметрин	-9.29	-6.26	-8.09	-8.50
DCCA	-6.39	-6.34	-6.56	-6.28
3-РВА	-8.12	-8.25	-8.45	-7.89
Референтні ліганди	4-гідрокситамоксифен -12.11	Естрадіол -11.11	Естрадіол -11.31	Ралоксифен -12.75

Примітка: як до табл. 1

В таблиці 3 представлені спільні амінокислотні залишки, що вносять найбільший внесок у взаємодію досліджуваних сполук та ЛЗД ER $\alpha$ . Можна побачити, що спільними амінокислотними залишками для референтних лігандів, кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його метаболітів є LEU346, LEU387, LEU391, LEU525 та MET 388. Це може вказувати на те, що докінг даних речовин з ER $\alpha$  опосередкований взаємодією через практично ідентичні сайти зв'язування білка (табл. 3).

Таблиця 3

**Спільні амінокислотні залишки, що мають найбільший внесок у взаємодії  $\alpha$ -рецептору естрогену з кверцетином,  $\alpha$ -циперметрином, його похідними та референтними лігандами (Schrödinger Maestro Glide)**

Рецептор	ZERT	IGWR	IERE	IERR
Амінокислотні залишки	ALA 350	ARG 394	GLU353	ALA 350
	ARG 394	GLU353	HIE524	ILE424
	GLU353	HIE524	LEU346	LEU346
	LEU346	LEU346	LEU384	LEU349
	LEU384	LEU387	LEU387	LEU384
	LEU387	LEU391	LEU391	LEU387
	LEU391	LEU525	LEU525	LEU391
	LEU525	MET 388	MET 388	LEU525
	MET 343	PHE404	PHE404	MET 388
	MET 388			MET 421
	MET 421			
	PHE404			
	THR347			

Примітки: ALA – аланін, ARG – аргінін, GLU – глютамат, LEU – лейцин, MET – метіонін, PHE – фенілаланін, THR – треонін, HIE – гістидин, ILE – ізoleyцин.



З прогнозування Schrödinger Maestro Glide  $\alpha$ -циперметрин утворює гідрофобний зв'язок з ARG 394 залишком 3ERT, тоді як референтна сполука 4-гідрокситамоксифен утворює водневу взаємодію. Амінокислотні залишки LEU525, LEU387 мають високі внески у енергію взаємодії 4-гідрокситамоксифену. Кверцетин натомість утворює водневий зв'язок за участю гідроксильної групи з ASP 351 (рис. 2).

Особливості зв'язування  $\alpha$ -циперметрину та його метаболіту 3-феноксibenзойної кислоти з 3ERT подібні на референтну сполуку 4-гідрокситамоксифен, може вказувати на їх антагоністичний ефект. DCCA та 3-PBA утворюють водневі зв'язки за допомогою OH груп з GLU353 (3ERT), як 4-гідрокситамоксифен. 3-PBA утворює водневий зв'язок за участю карбоксильної групи з ARG 394, в той час як референтна сполука – за рахунок гідроксильної групи (рис. 2).

Кверцетин утворює водневі зв'язки за участі гідроксильних груп з GLU353, HIE524 та  $\pi$ - $\pi$  взаємодію з PHE404 ЛЗД 1GWR як референтний ліганд естрадіол.  $\alpha$ -циперметрин не демонструє здатності до формування водневих зв'язків з амінокислотними залишками даного ЛЗД. Але 3-PBA формує водневі зв'язки з ARG 394 та HIE524, а DCCA з HIE524 як естрадіол (рис. 3).

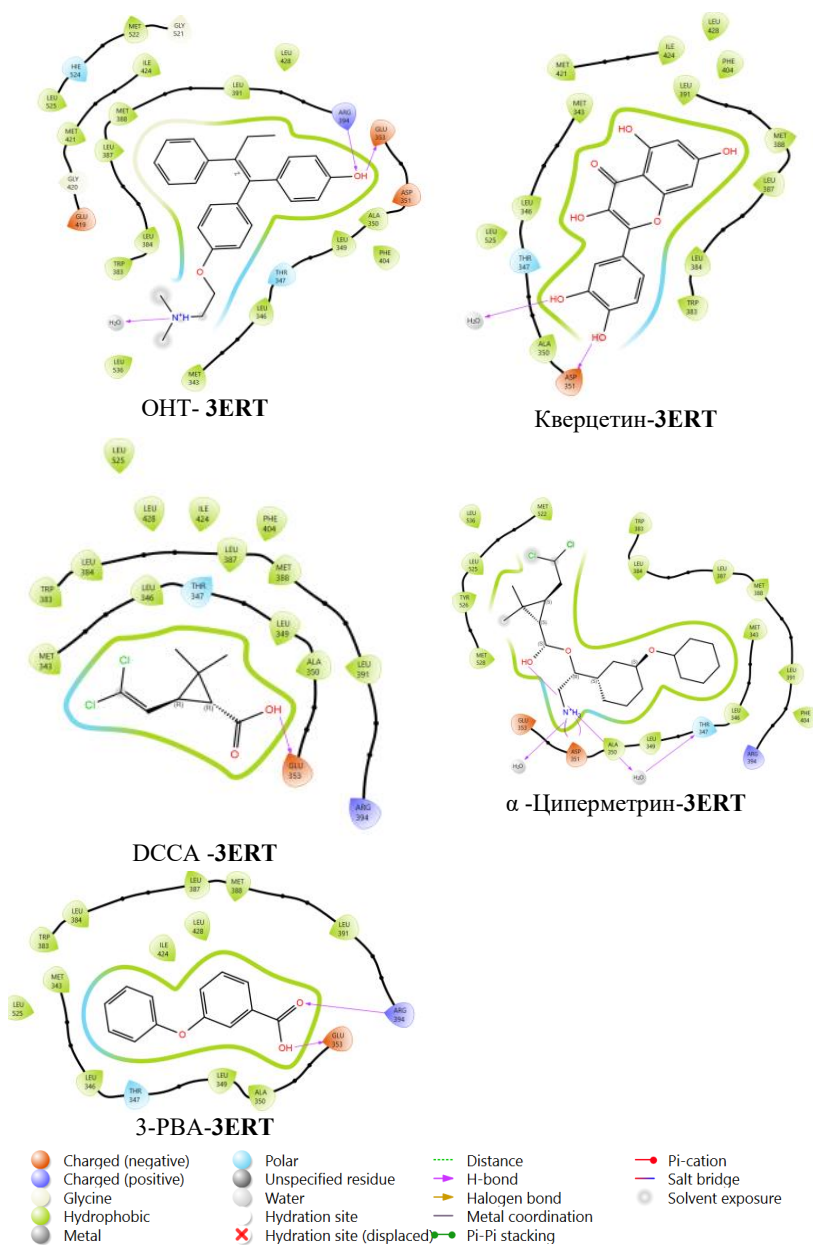
Стосовно взаємодії досліджуваних сполук з 1ERR та 1ERE, можна відмітити, що за участі гідроксильних груп кверцетин утворює водневі зв'язки з амінокислотними залишками GLU353, HIE524, та  $\pi$ - $\pi$  взаємодію з PHE404 ЛЗД 1ERE. В той час як метаболіти  $\alpha$ -циперметрину утворюють водневі зв'язки за рахунок карбоксильної групи з ARG 394, гідроксильної групи – з GLU353 (3-PBA) та HIE524 (DCCA).

Також спостерігалась подібність у механізмі зв'язування кверцетину, 3-PBA та референтної сполуки ралоксифену з ЛЗД рецептору естрогену 1ERR.

Maestro Schrödinger Suite прогнозує, що кверцетин та 3-PBA, подібно до ралоксифену формує водневі взаємодії за участю гідроксильних груп з ARG 394, GLU353 (1ERR) та також  $\pi$ - $\pi$  взаємодію з PHE404 (1ERR). Зазначені вище особливості взаємодії з ER $\alpha$ , можуть підкреслити агоністичні властивості досліджуваних сполук.

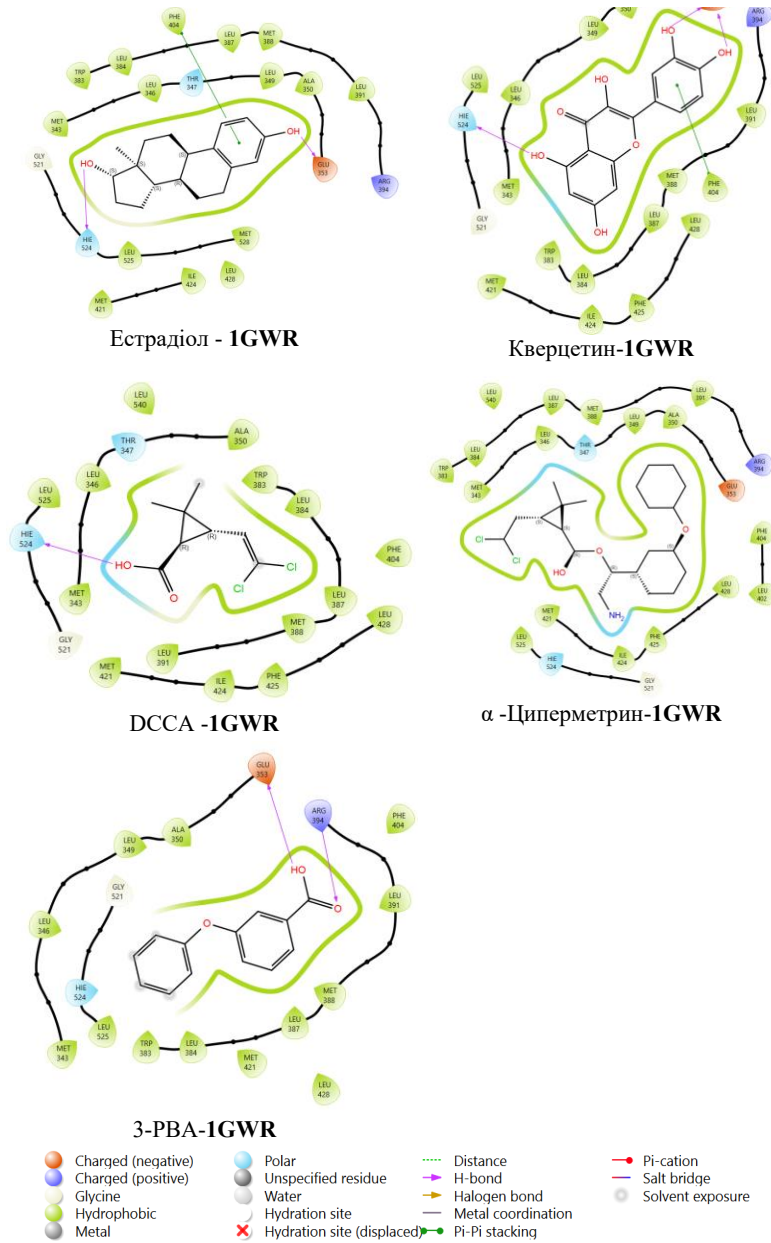
На основі прогнозованих результатів докінгу у всіх запропонованих конформаціях ER $\alpha$  (1GWR, 1ERE, 1ERR)  $\alpha$ -циперметрин не утворює водневі зв'язки з цими білками, за виключенням 1ERE, де утворені водневі зв'язки подібні до зв'язків, які утворює кверцетин, що може свідчити про їх конкурентну взаємодію з сайтом зв'язування білка.

При проведенні оцінки якості результатів молекулярного докінгу за допомогою AutoDock Vina, була відмічена наявність стеричних перекриттів атомів лігандів з рецептором у конформаціях 1GWR з  $\alpha$ -циперметрином (O-LEU391, 2.566 Å; C1 – ARG 394, 2.901 Å; C1 -GLU353, 2.779 Å; C1 – PHE404, 3.060 Å). В утворених комплексах (1GWR –  $\alpha$ -циперметрин) за допомогою Maestro Schrödinger Suite також відмічаються перекривання (C1 -TRP 383, 2.828 Å; C1-LEU384, 2.854; CL -TRP 383, 2.261; CL – TRP 383, 3.040; CL – LEU387, 2.378;



**Рис. 2.** Візуалізація розташування кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних в специфічному сайті зв'язування рецептору естрогенів (ZERT) Maestro Schrödinger Suite.

Примітка: ОНТ – 4-гідрокситамоксифен, DCCA – 3-(2,2-дихлоретеніл)-2,2-диметилциклопропанкарбонова кислота, 3-PBA – 3-феноксибензойна кислота, ZERT – кристалічна структура ліганд-зв'язуючого домену ER $\alpha$  людини в комплексі з 4-гідрокситамоксифеном.



**Рис. 3.** Візуалізація розташування кверцетину, α-циперметрину та його похідних в специфічному сайті зв'язування рецептору естрогенів (1GWR) Maestro Schrödinger Suite.

Примітки: 1GWR – кристалічна структура ліганд-зв'язуючого домену ERα людини в комплексі з естрадіолом, DCCA – 3-(2,2-дихлоретеніл)-2,2-диметилциклопропанкарбонова кислота, 3-PBA – 3-феноксibenзойна кислота.

CL – LEU384, 2.378). Перекривання спостерігаються в комплексі IERE – кверцетин (H- MET 421, 1,739 Å), при використанні Maestro Schrödinger Suite. В результаті молекулярного докінгу з використанням AutoDock Vina та Maestro Schrödinger Suite спостерігаються перекривання атомів  $\alpha$ -циперметрину з IERE (AutoDock Vina: C-ALA 350, 2.847 Å; C-MET 388, 2.990 Å), (Maestro Schrödinger Suite: CI-LEU346, 3.008 Å).

Результати отримані в рамках докінг аналізу дозволяють припустити, що  $\alpha$ -циперметрин та його метаболіти здатні діяти як агоністи, так і антагоністи ER $\alpha$ . Значною мірою характер взаємодії досліджуваних сполук з рецептором естрогену залежав від програмного забезпечення, що застосовувалось. Варто відмітити, що протилежні оцінки взаємодії з рецепторами стероїдних гормонів є характерними для раніше досліджених піретроїдів та їх метаболітів.

Так, наприклад, в дослідженні Chen та співавторів було встановлено, що перметрин, циперметрин, фенвалерат мають частковий агоністичний вплив на ER клітини карциноми молочної залози людини MCF-7 [5]. Jin разом із співавторами виявили агоністичну дію  $\beta$ -циперметрину та його метаболіту 3-PBA по відношенню до ER у клітинах MCF – 7 [11]. З іншого боку, відомо, що 3-PBA, DCCA, перметрин можуть мати антагоністичну дію до рецепторів естрогену в клітинах нирок африканської зеленої мартишки (*Chlorocebus sabaeus*) CV-1, в той час як циперметрин не проявляє активності [7]. В дослідженні Zhang та його колег  $\alpha$ -циперметрин проявляє себе як антиестрогенна сполука у клітинах рибок даніо [40].

Зазначені протилежні ефекти можуть пояснюватися тим, що автори використовували різні клітинні лінії для досліджень *in vitro*. Важливою також є концентрація піретроїду, високі та низькі дози яких можуть спричинювати різний ефект з боку ендокринної системи – так звана «немонотонна» відповідь. Енантіоселективність піретроїдів також робить значний внесок у характер взаємодії з рецептором естрогенів.

Ефекти, які піретроїди проявляють в умовах *in vivo* та *in vitro*, також можуть бути протилежними. Так, наприклад, перметрин та біфетрин проявляють естрогенну активність *in vivo* та антиестрогенні ефекти в умовах *in vitro* [4].

Таким чином, при оцінці ендокринно-руйнівного потенціалу піретроїдів в умовах *in vitro* або, як у нашому випадку, *in silico*, виникає проблема появи певних пробілів у даних, через використання різних систем аналізу. Отже, використання скринінгових тестів *in silico* недостатньо для точного прогнозування естрогенного або антиестрогенного ефекту піретроїдів, що означає важливість проведення досліджень *in vivo* [24].

Також існують певні відмінності стосовно докінгу кверцетину з ER $\alpha$  між нашим дослідженням та даними з наукової літератури. Так, Liu разом із колегами [19], використовуючи програмне забезпечення Schrodinger Suite 2015, відмітили здатність кверцетину зв'язуватися з кристалічною структурою 3ERT з утворенням водневих зв'язків з амінокислотними залишками ASP351,

GLU353, ARG394. В нашому дослідженні встановлено, що водневий зв'язок кверцетин утворює тільки з ASP351, в той час як з GLU353 та ARG394 3ERT водневий зв'язок утворюють метаболіти  $\alpha$ -циперметрину [18].

У статті Powers та співавторів, присвяченій докінг-аналізу флавоноїдів з рецепторами естрогенів, демонструється, що кверцетин має нижчу енергію зв'язування з ER $\alpha$ , ніж естрадіол. Але варто відмітити, що автор використовував іншу кристалічну структуру ЛЗД ER $\alpha$  – 1X7E та пакет Molegro Virtual Docker v. 6.0. [27].

У дослідженні Puranik та співавторів [28], за допомогою GLIDE було встановлено, що сила зв'язування кверцетину з 3ERT становить  $-9,347$  ккал/моль, та  $-10,136$  ккал/моль з 1GWR. В нашому дослідженні було встановлено, що сила зв'язування кверцетину із зазначеними ЛЗД була меншою, незалежно від програмного забезпечення, що було використано. В той самий час, дані, які були представлені Puranik разом із співавторами, стосовно енергії зв'язування референтних лігандів – естрадіолу та 4-гідрокситамоксифену – збігаються з результатами нашого дослідження. Автори описали внесок окремих амінокислотних залишків у взаємодії кверцетину з 3ERT та 1GWR, в тому числі відмітили наявність  $\pi$ - $\pi$  взаємодії з PHE404 1GWR та дійшли висновку про виражену агоністичну дію кверцетину по відношенню до ER $\alpha$  [28].

Таким чином в нашому дослідженні нам вдалося уточнити деякі особливості зв'язування кверцетину з ER $\alpha$ , зокрема встановити, що енергія зв'язування кверцетину не може бути нижчою ніж у естрадіолу, що підтверджується аналізом AutoDock, AutoDockVina та Schrödinger Maestro Glide.

Аналізуючи докінг-оцінку зв'язування кверцетину з ER $\alpha$ , спираючись при цьому на власне дослідження та дані, отримані іншими дослідниками, можна стверджувати, що цей флавоноїд виступає як агоніст ER $\alpha$  та практично не проявляє антагоністичних властивостей. Ми не можемо стверджувати, що кверцетин зв'язується з ER $\alpha$  сильніше, ніж  $\alpha$ -циперметрин, але нами встановлено, що кверцетин сильніше зв'язується з ER $\alpha$ , ніж метаболіти  $\alpha$ -циперметрину – 3-PVA та DCCA.

Відомо, що кверцетин здатний здійснювати естрогеноподібну дію на яєчники та розвиток фолікулів, нормалізувати секрецію статевих гормонів [29, 35]. Застосування екстракту листя шавлії, який містить великий набір флавоноїдів, в тому числі кверцетин, сприяє нормалізації естрального циклу, ваги матки та яєчників, рівню естрогенів, показників окиснювального стресу у оваріоектомованих щурів [15]. Застосування екстракту прополісу, який серед великого набору флавоноїдів містить також кверцетин, ефективно попереджувало розвиток ускладнень репродуктивно-токсичної дії циперметрину у самок кролів та сприяло нормалізації ферментативної та неферментативної ланки антиоксидантного захисту [13].

Тому встановлені нами агоністичні властивості до ER $\alpha$  та відомості з наукових джерел про естрогеноподібну та антиоксидантну дію кверцетину спонука-

ли нас на наступному етапі розрахувати параметри лікоподібності кверцетину та його потенційної токсичності в порівнянні з  $\alpha$ -циперметрином.

При прогнозуванні фармакокінетичних властивостей враховували такі параметри: інгібування цитохрому P450, всмоктування у тонкому кишечнику, проникність (за допомогою лінії клітин Caco-2 колоректальної карциноми людини), інгібування P-глікопротеїну, об'єм розподілу (VDss), здатність долати гематоенцефалічний бар'єр (logBB).

Згідно з результатами, продемонстрованими в таблиці 4, не передбачається, що кверцетин буде субстратом для CYP2D6 або CYP3A4, що свідчить про те, що він може не метаболізуватися цими ферментами. Результати проведеного *in silico* прогнозування демонструють, що кверцетин пригнічує CYP1A2, що вказує на потенційний вплив кверцетину на метаболізм ліків під дією CYP1A2.

Таблиця 4

**Прогнозовані фармакокінетичні властивості кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину (частина А) pkCSM**

	pkCSM	
	Кверцетин	$\alpha$ -циперметрин
	Метаболізм	
CYP2D6 субстрат	Ні	Ні
CYP3A4 субстрат	Ні	Так
CYP1A2 інгібітор	Так	Так
CYP2C19 інгібітор	Ні	Так
CYP2C9 інгібітор	Ні	Так
CYP2D6 інгібітор	Ні	Ні
CYP3A4 інгібітор	Ні (pkCSM) Так (admetSAR)	Так

Результати вказують, що  $\alpha$ -циперметрин є субстратом для CYP3A4, тобто він може метаболізуватися цим ферментом. Він також діє як інгібітор CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 і CYP3A4, що свідчить про те, що він може перешкоджати метаболізму ліків під дією цих ферментів (табл. 4).

Згідно з моделлю pkCSM (табл. 5), кверцетин має негативну оцінку проникності Caco-2 (лінія клітин епітеліальної колоректальної аденокарциноми людини) (-0,229), що може означати нижчу проникність через моношар клітин лінії Caco-2. З іншого боку, admetSAR передбачає позитивне значення (0,2245), що може означати вищу проникність кверцетину в клітинах товстої кишки. У випадку  $\alpha$ -циперметрину як pkCSM (1,016), так і admetSAR (1,4408) передбачають позитивні значення, що вказує на те, що обидві моделі пропонують високу проникність через клітини лінії Caco-2.

Таблиця 5

**Прогнозовані фармакокінетичні властивості кверцетину  
та  $\alpha$ -циперметрину (частина В) pkCSM**

	Абсорбція	
	Кверцетин	$\alpha$ -циперметрин
Сасо2 проникність, log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s	-0,229 (pkCSM) 0,2245 (admetSAR)	1,016 (pkCSM) 1,4408 (admetSAR)
Всмоктування в тонкому кишечнику людини, % всмоктування	77,207	91,299
P-глікопротеїновий субстрат	Так	Ні
Інгібітор P-глікопротеїну 1	Ні	Так
VDss (human), log L/kg	1,559	0,469
BBB проникність, log BB	-1,098	-0,232

Примітки: Сасо2 – лінія клітин епітеліальної колоректальної аденокарциноми людини, VDss – об'єм розподілу, BBB – гематоенцефалічний бар'єр.

Обидві досліджувані сполуки мають високий прогнозований відсоток всмоктування в тонкому кишечнику людини, але це прогнозоване значення вище для  $\alpha$ -циперметрину (91,299%).

На основі отриманих прогнозованих даних, кверцетин є субстратом P-глікопротеїну (АТФ-залежний білок-транспорттер, який виводить з клітини чужорідні речовини), а  $\alpha$ -циперметрин є його інгібітором. Оскільки кверцетин є субстратом P-глікопротеїну (P-gp), це може означати, що кверцетин може бути виведений з клітини цим білком та посилювати здатність P-gp виводити ксенобіотики. Таким чином, кверцетин може зменшувати абсорбцію  $\alpha$ -циперметрину шляхом виведення його з клітини через механізм транспорту, який залежить від P-gp (табл. 5).

Об'єм розподілу (VDss – the volume of distribution at steady state) – це теоретичний об'єм, в якому загальна доза лікарського засобу повинна бути рівномірно розподілена для отримання такої ж концентрації, як у плазмі крові. Чим вищий VDss, тим більше препарату розподіляється в тканинах, а не в плазмі. Прогнозовані значення об'єму розподілу для кверцетину вищі (1,559) ніж для  $\alpha$ -циперметрину (0,469), це вказує на те, що кверцетин розподіляється ширше в тканинах, ніж у плазмі, а  $\alpha$ -циперметрин скоріше зосереджується в плазмі (табл. 5).

Прогнозовані значення  $\log BB < -1$  справедливі для кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину, це означає, що ці сполуки погано долають гематоенцефалічний бар'єр (табл. 5).

Прогнозування токсичності ґрунтувалось на визначенні мутагенності (AMES), максимально безпечної допустимої дози (MRTD), інгібування калі-

євих каналів (кодованих генами hERG I та hERG II), пероральної токсичності для щурів (LOAEL), гепатотоксичності, сенсibiliзації шкіри, токсичності для клітин інфузорії *Tetrahytmena pyriformis* та клітин плоскоголового гол'яна *Pimephales promelas* (Minnow) (табл. 6).

Таблиця 6

Прогнозована токсичність кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину рkCSM

	Кверцетин	$\alpha$ -циперметрин
AMES токсичність	Ні	Ні
MRTD, log (мг/кг/день)	0,499	0,318
hERG I інгібітор	Ні	Ні
hERG II інгібітор	Ні	Ні
LOAEL, log мг/кг_мг/день	2,612	1,126
Гепатотоксичність	Ні	Ні
Сенсibiliзація шкіри	Ні	Ні
<i>T. Pyriformis</i> токсичність, log мкг/л	0,288	0,424
<i>P. promelas</i> токсичність, log mM	3,721	-2,829

Примітки: AMES – оцінка мутагенного впливу, MRTD – максимально безпечна допустима доза, hERG I та II – гени, що кодують  $\alpha$ -субодиниці калієвого каналу, LOAEL – хронічна токсичність для щурів (*per os*), *T. Pyriformis* токсичність – токсичність для клітин інфузорії *Tetrahytmena pyriformis*, *P. promelas* токсичність для клітин плоскоголового гол'яна *Pimephales promelas*, мг – маса тіла.

Прогнозовані результати, зазначені в таблиці 6 демонструють, що обидві речовини не виявили позитивної реакції на тест AMES, що вказує на відсутність мутагенних властивостей.

Згідно з умовами, прогнозоване значення MRTD для кверцетину вважається високим, оскільки воно перевищує поріг 0,477 log (мг/кг/день), а для  $\alpha$ -циперметрину низьким, оскільки воно менше порогу 0,477 log (мг/кг/день). За цими критеріями, можна сказати, що  $\alpha$ -циперметрин може бути більш токсичним, оскільки його MRTD менше, ніж у кверцетину.

Згідно з прогнозованими даними, рkCSM кверцетин та  $\alpha$ -циперметрин не є інгібіторами hERG I та hERG II, означає, що ці сполуки, ймовірно, не блокують калієві канали та не викликають розвиток синдрому подовженого інтервалу QT, що призводить до фатальної шлуночкової аритмії.

Вище значення LOAEL для кверцетину (2,612 log мг/кг\_мг/день) порівняно з  $\alpha$ -циперметрином (1,126 log мг/кг\_мг/день) свідчить про те, що з погляду хронічної пероральної токсичності кверцетин має вищий поріг перед появою



побічних ефектів у шурів. Отже, кверцетин має меншу токсичність або менше шкідливих ефектів порівняно з  $\alpha$ -циперметрином за тих же рівнів експозиції.

На основі pkCSM прогнозування ні кверцетин, ні  $\alpha$ -циперметрин не є гепатотоксичними сполуками та не мають сенсibiliзуючого впливу на шкіру.

Як кверцетин (0,288 log мкг/л), так і  $\alpha$ -циперметрин (0,424 log мкг/л) класифікуються як токсичні для клітин *T. Pyriformis* на основі відповідних критеріїв. Але згідно прогнозованих даних Minnow токсичності, кверцетин можна розглядати як нетоксичну речовину, в той час як  $\alpha$ -циперметрин має високу гостру токсичність (табл. 6).

Властивості ADME (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion) зображують доступність сполуки в організмі, визначену правилом п'яти Ліпінського. Стандартний параметр для цього правила наведено нижче:

- 1) Молекулярна маса (допустимий діапазон:  $\leq 500$ ), Mr (кверцетин) = 302,24 г/моль.
- 2) Донор водневого зв'язку (допустимий діапазон:  $\leq 5$ ), для кверцетину = 5
- 3) Акцептор водневих зв'язків (допустимий діапазон:  $\leq 10$ ), для кверцетину = 7.
- 4) Висока ліпофільність (виражена як LogP, прийнятний діапазон:  $\leq 5$ ), для кверцетину = 1,23.
- 5) Молярний коефіцієнт заломлення (допустимий діапазон: 40–130), молярна рефракція для кверцетину = 78,03

Враховуючи викладене вище, можна стверджувати, що кверцетин відповідає більшості параметрів лікоподібності, що надає можливість його застосування в якості компонента профілактики при інтоксикації піретроїдними інсектицидами, зокрема  $\alpha$ -циперметрином.

Отримані нами дані подібні до тих, що можна знайти в роботах дослідників, присвячених вивченню властивостей флавоноїдів в умовах *in silico*. Так, в статті Al-Nour та співавторів [1], дослідники роблять висновок про задовільність кверцетину вимогам лікоподібності, ґрунтуючись на його фармакодинамічних властивостях, фармакокінетиці та профілю токсичності, оцінених за допомогою pkCSM та SwissADME. В роботі Puranik та співавторів [28] відмічається, що параметри лікоподібності кверцетину знаходяться у допустимих діапазонах ADME за оцінкою QuikProp Schrodinger 2017. Islam разом із колегами оцінювали лікоподібність кверцетину за допомогою Molinspiration WebME Editor 3.81 та зробили висновок про його відповідність вимогам лікарського засобу [12]. В статті Rouane та співавторів [31] вказується, що кверцетин відповідає правилам Ліпінського та має високу пероральну доступність [1, 28, 12, 31].

Варто відмітити, що в нашому дослідженні було встановлено, що кверцетин окрім задовільних параметрів лікоподібності, може мати потенційний токсичний вплив, хоча не такий виражений як у  $\alpha$ -циперметрині. Це створює необхідність більш детального вивчення даної сполуки як в умовах *in silico*, так і в умовах *in vitro* та *in vivo*.

**Висновки:**

1. За результатами *in silico* прогнозування кверцетин володіє агоністичними властивостями до ER $\alpha$ , оскільки виявлені низькі значення енергії зв'язування (AutoDock – 8,7 ккал/моль, Vina – 9,4 ккал/моль, Gscore – 9,38 ккал/моль) цього ліганду з 1ERR та спостерігається утворення водневих зв'язків з амінокислотними залишками GLU353, HIE524 (1GWR, 1ERE), подібно до механізму зв'язування референтних лігандів.

2. За результатами докінгу з використанням програмного забезпечення Schrödinger Maestro Glide  $\alpha$ -циперметрину володіє вираженими антагоністичними властивостями до ER $\alpha$ , в той час як AutoDock передбачає сильне зв'язування з 1ERE, що свідчить і про агоністичний ефект  $\alpha$ -циперметрину по відношенню до ER $\alpha$ . Наш аналіз виявив численні стеричні перекривання між атомами  $\alpha$ -циперметрину та структурами ER $\alpha$ , які були зв'язані з агоністами та мають відповідну конформацію (1GWR, 1ERE) в межах сайту зв'язування. Ці перекривання характеризувалися несприятливими стеричними взаємодіями, що свідчить про потенційні бар'єри для ефективного зв'язування ліганду.

3. Метаболіти  $\alpha$ -циперметрину DCCA та 3-PBA мають досить високі значення енергії зв'язування з використанням різних моделей докінгу, особливо AutoDock та AutoDock Vina, що може означати низьку афінність до ER $\alpha$ . У більшості випадків кверцетин проявляв міцніші прогнозовані взаємодії з естрогеновим рецептором, ніж DCCA та 3-PBA, тому можна припустити, що кверцетин може витіснити метаболіти  $\alpha$ -циперметрину з рецепторів і таким чином проявляти естрогеноподібну дію.

4. На основі прогнозованих результатів фармакокінетичних властивостей можна зробити висновок, що кверцетин може впливати на виведення  $\alpha$ -циперметрину через активність, пов'язану з роботою Р-глікопротеїну.  $\alpha$ -циперметрин також проявляє активність як субстрат та інгібітор декількох ферментів цитохрому P450, зокрема CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, що може впливати на метаболізм інших ліків.

5. Результати дослідження *in silico* свідчать про відсутність мутагенної дії досліджуваних речовин, а також показують меншу токсичність та більш безпечний профіль властивостей кверцетину порівняно з  $\alpha$ -циперметрином.

6. За допомогою правила п'яти Ліпінського для оцінки властивостей ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) можна зробити висновок, що кверцетин відповідає більшості критеріїв лікоподібності. Це надає можливість розглядати його як компонент для профілактики інтоксикації піретроїдними інсектицидами, такими як  $\alpha$ -циперметрин.

Стаття надійшла до редакції 19.04.2024

## Список використаної літератури

- Al-Nour M. Y., Ibrahim M.M., Elsaman T. Ellagic acid, kaempferol, and quercetin from *Acacia nilotica*: promising combined drug with multiple mechanisms of action. *Current Pharmacology Reports*. 2019. V. 5. P. 255–280. <https://doi.org/10.1007/s40495-019-00181-w>
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*. 2000. V. 28(1). P. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bertotto L. B., Dasgupta S., Vliet S., Dudley S., Gan J., Volz D.C., Schlenk D. Evaluation of the estrogen receptor alpha as a possible target of bifenthrin effects in the estrogenic and dopaminergic signaling pathways in zebrafish embryos. *Science of The Total Environment*. 2019. V. 651(2). P. 2424–2431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.079>
- Brander S. M., He G., Smalling K.L., Denison M.S., Cherr G.N. The in vivo estrogenic and in vitro anti-estrogenic activity of permethrin and bifenthrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2012. V. 31 (2). P. 2818–2855. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02253>
- Chen H., Xiao J., Hu G., Zhou J., Xiao H., Wang X. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2002. V. 65(19). P. 1419–1435. <https://doi.org/10.1080/00984100290071243>
- Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*. 2017. V. 7. 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Du G., Shen O., Sun H., Fei J., Lu C., Song L. et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicological Sciences*. V. 116 (1). P. 58–66. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq120>
- Forli S., Huey R., Pique M.E., Sanner M.F., Goodsell D.S., Olson A.J. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature protocols*. 2016. V. 11(5). P. 905–919 <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
- Ghazouani L., Feriani A., Mufti A., Tir M., Baaziz I., Mansour H.B., Mnafigui K. Toxic effect of alpha cypermethrin, an environmental pollutant, on myocardial tissue in male wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020. V. 27. P. 5709–5717. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05336-2>
- Hu C., Wang L., Ma Y., Xu Z., Lu, H. Investigation on the interaction of pyrethroid pesticides to estrogen receptor alpha through computational and experimental methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022. V. 2016. 112565. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112565>
- Jin M., Li L., Xu C., Wen Y., Zhao M. Estrogenic activities of two synthetic pyrethroids and their metabolites. *Journal of Environmental Sciences*. 2010. 22(2). P. 290–296. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60107-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60107-8)
- Islam M. R., Zaman A., Jahan I., Chakravorty R., Chakravorty S. In silico QSAR analysis of quercetin reveals its potential as therapeutic drug for Alzheimer's disease. *Journal of Young Pharmacists*. 2013. V. 5(4). P. 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.11.005>
- Khatab A. E., Hashem N.M., El-Kodary L. M., Lotfy F.M., Hassan, G.A. Evaluation of the effects of cypermethrin on female reproductive function by using rabbit model and of the protective role of Chinese propolis. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2016. V. 29 (10). P. 762–766.
- Kim S., Thiessen P.A., Bolton E.E., Chen J., Fu G., Gindulyte A., Han L., He J., He S., Shoemaker B.A., Wang J., Yu B., Zhang J., Bryant S.H. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic acids research*. 2016. V. 44(D1). P. D1202–D1213 <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Koubaa-Ghorbel F., Chaâbane M., Jdidi H., Turki M., Makni-Ayadi F., El Feki A. *Salvia officinalis* mitigates uterus and liver damages induced by an estrogen deficiency in ovariectomized rats. *Journal of Food Biochemistry*. 2021. V. 45(5). e13542. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13542>
- Lakshmanan M.D., Hassan M.S.A. Ligand binding domain of estrogen receptor alpha preserve a conserved structural architecture similar to bacterial taxis receptors. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2021. V. 9. 681913. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.681913>
- Lee H.R., Kim T.H., Choi, K. C. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Laboratory Animal Research*. 2012. V. 28(2). P. 71–76. DOI: <https://doi.org/10.5625/lar.2012.28.2.71>
- Li C., Cao M., Ma L. et al. Pyrethroid pesticide exposure and risk of primary ovarian insufficiency in Chinese women. *Environmental Science & Technology*. 2018. V. 52(5). P. 3240–3248. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06689>
- Liu H., He S., Wang T. et al. Selected Phytoestrogens Distinguish Roles of ER $\alpha$  Transactivation and Ligand Binding for Anti-Inflammatory Activity. *Endocrinology*. 2018. V. 159(9). P. 3351–3364. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00275>

20. Marty M. S., Carney E. W., Rowlands J. C. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicological Sciences*. 2011. V. 120(1). P. 93–108. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq329>
21. Millán M. M. The role of estrogen receptor in bone cells. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. 2015. V. 13. P. 105–112. <https://doi.org/10.1007/s12018-015-9188-7>
22. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009. V. 30(16). P. 2785–2791 <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
23. Ng W. H., Zhang W., Shu M., Luo H., Ge W., Perkins R., Tong W., Hong H. Competitive molecular docking approach for predicting estrogen receptor subtype  $\alpha$  agonists and antagonists. *BMC Bioinformatics*. 2014. V. 15. P. 1–5. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S11-S4>
24. Ortiz D. M. D., Park J., Lee H., Park K. Integrated Assessment for the Estrogenic Effects of Pyrethroid Compounds: Defining the Molecular Initiating Events and Key Events for the Adverse Outcome Pathway. *Toxics*. 2024. V. 12(3); 218. <https://doi.org/10.3390/toxics12030218>
25. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004. V. 25(13). P. 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.200844>
26. Pires D. E., Blundell T. L., Ascher D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.* 2015. V. 58. P. 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
27. Powers C. N., Setzer W. N. A molecular docking study of phytochemical estrogen mimics from dietary herbal supplements. *In Silico Pharmacology*. 2015. V. 3(4). P. 1–63. <https://doi.org/10.1186/s40203-015-0008-z>
28. Puranik N. V., Srivastava P., Bhatt G., Mary D. J. S. J., Limaye A. M., Sivaraman J. Determination and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen receptor (ER $\alpha$ ) by various parameters and molecular modelling approach. *Scientific Reports*. 2019. V. 9, № 7450. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43768-5>
29. Rashidi Z., Khosravizadeh Z., Talebi A., Khodamoradi K., Ebrahimi R., Amidi F. Overview of biological effects of Quercetin on ovary. *Phytotherapy Research*. 2021. V. 35(1). P. 33–49. <https://doi.org/10.1002/ptr.6750>
30. Ravula A. R., Yenugu S. Pyrethroid based pesticides—chemical and biological aspects. *Critical Reviews in Toxicology*. 2021. 51(2). P. 117–140. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1879007>
31. Rouane A., Tchouar N., Belaidi S., Kerassa A., Lanez T. Chemical structure, substitution effect, and drug-likeness applied to quercetin and its derivatives. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 2023. V. 15(1). P. 10–33. <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.1278>
32. Sayed F. A., Fraser D. G., Spelsberg T. C., Rosen C. J., Krust A., Chambon P., Jameson J. L., Khosla S. Effects of Loss of Classical Estrogen Response Element Signaling on Bone in Male Mice. *Endocrinology*. 2007. V. 148(4). P. 1902–1910. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1165>
33. Seeliger D., de Groot B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design*. 2010. V. 24(5). P. 417–422 <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>
34. Shepelska N. R., Prodanchuk M. G., Kolianchuk Y. V. Comparative analysis of two methodological approaches to the study of endocrine disruptor alpha-cypermethrin reproductive toxicity. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. V. 12(4). P. 724–732. <https://doi.org/10.15421/0221100>
35. Shu X., Hu X. J., Zhou S. Y., Xu C. L., Qiu Q. Q., Nie S. P., Xie, M. Y. Effect of quercetin exposure during the prepubertal period on ovarian development and reproductive endocrinology of mice. *Yao Xue Xue Bao*. 2011. V. 46(9). P. 1051–1057.
36. Slighoua M., Amrati F. E. Z., Chebaibi M., Mahdi I., Al Kamaly O., El Ouahdani K., Drioiche A., Saleh A., Bousta D. Quercetin and Ferulic Acid Elicit Estrogenic Activities In Vivo and In Silico. *Molecules*. 2023. 28(13). 5112. <https://doi.org/10.3390/molecules28135112>.
37. Suthon S., Lin J., Perkins R. S., Crockarell J. R., Miranda-Carboni G. A., Krum S. A. Estrogen receptor alpha and NFATc1 bind to a bone mineral density-associated SNP to repress WNT5B in osteoblasts. *American Journal of Human Genetics*. 2022. V. 109(1). P. 97–115. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.11.018>.
38. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*. 2010. V. 31(2). P. 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
39. Yadav I. C., Devi N. L. Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environmental Science and Engineering*. 2017. V. 6. P. 140–158.
40. Zhang Q., Yu S., Chen X., Fu L., Dai W., Gu S. Stereoisomeric selectivity in the endocrine-disrupting potential of cypermethrin using in vitro, in vivo, and in silico assays. *Journal of Hazardous Materials*. 2021. V. 414. 125389. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125389>.

**А. С. Акішева, О. С. Сідлецький, Ю. О. Молодан, О. А. Макаренко**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова; кафедра фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти; Одеса, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна, e-mail: abcd35133@gmail.com

## **ПРОГНОЗУВАННЯ МЕХАНІЗМІВ ВЗАЄМОДІЇ КВЕРЦЕТИНУ, А-ЦИПЕРМЕТРИНУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ ЗА $\alpha$ -РЕЦЕПТОРОМ ЕСТРОГЕНУ (ДОСЛІДЖЕННЯ IN SILICO)**

### **Резюме**

**Вступ.** Надмірне застосування пестицидів призводить до забруднення навколишнього середовища та створює небезпеку для здоров'я людини та тварин. З поміж усіх пестицидів дуже часто застосовують піретроїдні інсектициди (піретроїди), оскільки вони мають меншу токсичність для нецільових видів. Але тривалий вплив піретроїдів здатний викликати порушення ендокринної функції статевих залоз. Циперметрин є дуже поширеним піретроїдом, токсичність якого вивчається, проте мало що відомо про дію на статеву систему його стереоізомеру –  $\alpha$ -циперметрину. На нашу думку, ефективним засобом захисту від порушень внаслідок інтоксикації піретроїдами може виступити кверцетин – флавоноїд, який має естрогеноподібні та антиоксидантні властивості.

**Мета:** дослідження *in silico* механізмів зв'язування кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину та його похідних з  $\alpha$ -рецептором естрогену, особливостей фармакокінетики та профілю токсичності цих сполук.

**Методи.** Процедура молекулярного докінгу кверцетину,  $\alpha$ -циперметрину, 3-РВА та DCCA проведено з використанням кристалічних структур ліганд-зв'язуючого домену ER $\alpha$ : 3ERT (референтний ліганд – 4-гідрокситамоксифен), 1ERR (референтний ліганд – ралоксифен), 1GWR та 1ERE (референтний ліганд – естрадіол) з бази даних біологічних макромолекул PDB. Використовувались три різних пакети програмного забезпечення для докінгу: Glide, AutoDock та AutoDock Vina. Розташування референтного ліганду використовували для визначення автоматичного виявлення сайту зв'язування. Для *in silico* дослідження фармакокінетичних властивостей та токсичності кверцетину та  $\alpha$ -циперметрину була використана платформа pkCSM, онлайн сервер admetSAR та SwissADME.

**Результати.** AutoDock прогнозує, що  $\alpha$ -циперметрин має найнижчу енергію зв'язування з 1ERE (–10,4 ккал/моль), 1GWR (–10,0 ккал/моль), та 1ERR. Це може свідчити про агоністичний вплив даного інсектициду на ER $\alpha$ . Прогнозовані значення Gscore для  $\alpha$ -циперметрину відображають більш міцну взаємодію з 3ERT: –9,29 ккал/моль. Особливості зв'язування  $\alpha$ -циперметрину, його метаболітів (3-РВА, DCCA) та 4-гідрокситамоксифену з 3ERT мають певну подібність, що може означати антагоністичну для ER $\alpha$  дію піретроїду. Протилежність характеру взаємодії  $\alpha$ -циперметрину з ER $\alpha$  може бути пояснена відмінністю оцінювальних функцій та методів оптимізації білкових структур та лігандів в залежності від програмного забезпечення, що застосовувалось.

Результати прогнозовані як AutoDock, Vina так і Schrödinger Maestro Glide демонструють для кверцетину найнижчі значення енергії зв'язування з 1ERR, 1GWR та 1ERE, що виступає ознакою агоністичної дії. Кверцетин зв'язується з ліганд-зв'язуючими доменами ER $\alpha$  сильніше за 3-РВА та DCCA. Кверцетин має відповідні норми параметри токсичності та фармакокінетики, а також

задовольняє всім вимогам лікоподібності. Спираючись на дані, отримані *in silico*, можна стверджувати про доцільність застосування кверцетину як компонента профілактики ускладнень ендокринотоксичної дії  $\alpha$ -циперметрину.

**Висновки.** Токсична дія  $\alpha$ -циперметрину, яка направлена на порушення ендокринної функції статевих залоз, може бути пов'язана із високою афінністю даної сполуки та її метаболітів до ER $\alpha$ , супроводжуючись при цьому, за різними критеріями оцінки, як агоністичною так і антагоністичною дією. Кверцетин – флавоноїд з вираженими агоністичними властивостями до ER може бути застосований з метою профілактики ускладнень інтоксикації  $\alpha$ -циперметрином на основі його фармакокінетичних та лікоподібних параметрів.

**Ключові слова:** молекулярний докінг;  $\alpha$ -естрогеновий рецептор; кверцетин;  $\alpha$ -циперметрин; 3-PBA, DCCA, деструктори ендокринної системи.

**A. S. Akisheva, O. S. Sidletskyi, Yu. O. Molodan, O. A. Makarenko**

Odesa I. I. Mechnikov National University, Department of Physiology, Human Health and Safety and Natural Science Education, 2 Dvorianska St, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: abcd35133@gmail.com

## **PREDICTION OF THE INTERACTION MECHANISMS OF QUERCETIN, $\alpha$ -CYPERMETHRIN AND ITS DERIVATIVES WITH THE $\alpha$ -ESTROGEN RECEPTOR (*IN SILICO* STUDY)**

### **Summary**

**Introduction.** Excessive use of pesticides leads to environmental pollution and poses a danger to human and animal health. Pyrethroid insecticides (pyrethroids) are the most commonly used pesticides because they are less toxic to non-target species. It is well-known that prolonged exposure to pyrethroids can result in the endocrine function of the gonads being disrupted. Cypermethrin is a very common pyrethroid, the toxicity of which is widely studied, but little is known about the endocrine-disrupting effect of its stereoisomer,  $\alpha$ -cypermethrin. In our opinion, quercetin, a flavonoid that has estrogen-like and antioxidant properties, can be an effective means of protection against the complications of pyrethroid intoxication.

**Aim.** *In silico* studies of the binding mechanisms of quercetin,  $\alpha$ -cypermethrin and its derivatives with the estrogen receptor  $\alpha$ , features of pharmacokinetics and toxicity profile of these compounds.

**Methods.** The molecular docking procedure of quercetin,  $\alpha$ -cypermethrin, 3-PBA and DCCA was carried out using the crystal structures of the ligand-binding domain of ER $\alpha$ : 3ERT (reference ligand – 4-hydroxytamoxifen), 1ERR (reference ligand – raloxifene), 1GWR and 1ERE (reference ligand – estradiol) from the PDB database of biological macromolecules. Three different docking software packages were used: Glide, AutoDock, and AutoDock Vina. The location of the reference ligand was used to determine the automatic detection of the binding site. The pkCSM platform, admetSAR online server and SwissADME were used for *in silico* investigation of pharmacokinetic properties and toxicity of quercetin and  $\alpha$ -cypermethrin.

**The results.** AutoDock predicts that  $\alpha$ -cypermethrin has the lowest binding energy with 1ERE (–10.4 kcal/mol), 1GWR (–10.0 kcal/mol), and 1ERR. This may

indicate an agonistic effect of this insecticide on ER $\alpha$ . The predicted Gscore values for  $\alpha$ -cypermethrin reflect a stronger interaction with 3ERT:  $-9.29$  kcal/mol. The binding characteristics of  $\alpha$ -cypermethrin, its metabolites (3-PBA and DCCA) and 4-hydroxytamoxifen with 3ERT are similar, which may indicate an antagonistic effect of the pyrethroid for ER $\alpha$ . The opposite nature of the interaction of  $\alpha$ -cypermethrin with ER $\alpha$  can be explained by the difference in evaluation functions and methods of optimization of protein structures and ligands depending on the software used.

The results predicted by both AutoDock, Vina and Schrödinger Maestro Glide show for quercetin the lowest binding energy values with 1ERR, 1GWR and 1ERE, which is a sign of agonistic action. Quercetin binds to the ligand-binding domains of ER $\alpha$  more strongly than 3-PBA and DCCA. Quercetin has toxicity and pharmacokinetic parameters corresponding to the norm and meets all the requirements for drug-like properties. Based on the data obtained *in silico*, it is possible to assert the expediency of using quercetin as a component of the prevention of complications of the endocrinotoxic action of  $\alpha$ -cypermethrin.

**Conclusions.** The toxic effect of  $\alpha$ -cypermethrin, which is aimed at disrupting the endocrine function of the gonads, may be associated with the high affinity of this compound and its metabolites for ER $\alpha$ , accompanied by both agonistic and antagonistic effects according to various evaluation criteria. Quercetin, a flavonoid with pronounced ER agonistic properties, can be used to prevent complications of  $\alpha$ -cypermethrin intoxication based on its pharmacokinetic and drug-like parameters.

**Keywords:** molecular docking;  $\alpha$ -estrogen receptor; quercetin;  $\alpha$ -cypermethrin; 3-PBA, DCCA, disruptors of the endocrine system.

## References

1. Al-Nour, M. Y., Ibrahim, M. M., & Elsaman, T. (2019). Ellagic acid, Kaempferol, and Quercetin from *Acacia nilotica*: Promising combined drug with multiple mechanisms of action. *Current pharmacology reports*, 5(4), 255–280. <https://doi.org/10.1007/s40495-019-00181-w>
2. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
3. Bertotto, L. B., Dasgupta, S., Vliet, S., Dudley, S., Gan, J., Volz, D. C., & Schlenk, D. (2019). Evaluation of the estrogen receptor alpha as a possible target of bifenthrin effects in the estrogenic and dopaminergic signaling pathways in zebrafish embryos. *Science of the Total Environment*, 651, 2424–2431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.079>
4. Brander, S. M., He, G., Smalling, K. L., Denison, M. S., & Cherr, G. N. (2012). The *in vivo* estrogenic and *in vitro* anti-estrogenic activity of permethrin and bifenthrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(12), 2848–2855. <https://doi.org/10.1002/etc.2019>
5. Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao, H., & Wang, X. (2002). Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 65(19), 1419–1435. <https://doi.org/10.1080/00984100290071243>
6. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7 (1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
7. Du, G., Shen, O., Sun, H., Fei, J., Lu, C., Song, L., Xia, Y., Wang, S., & Wang, X. (2010). Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicological Sciences*, 116(1), 58–66. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq120>
8. Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature protocols*, 11(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>

9. Ghazouani, L., Feriani, A., Mufti, A., Tir, M., Baaziz, I., Mansour, H. B., & Mnafigui, K. (2020). Toxic effect of alpha cypermethrin, an environmental pollutant, on myocardial tissue in male wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 5709–5717. . <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05336-2>
10. Hu, C., Wang, L., Ma, Y., Xu, Z., & Lu, H. (2022). Investigation on the interaction of pyrethroid pesticides to estrogen receptor alpha through computational and experimental methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 216, 112565. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112565>
11. Jin, M., Li, L., Xu, C., Wen, Y., & Zhao, M. (2010). Estrogenic activities of two synthetic pyrethroids and their metabolites. *Journal of Environmental Sciences*, 22(2), 290–296. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60107-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60107-8)
12. Islam, M. R., Zaman, A., Jahan, I., Chakravorty, R., & Chakraborty, S. (2013). In silico QSAR analysis of quercetin reveals its potential as therapeutic drug for Alzheimer's disease. *Journal of Young Pharmacists*, 5(4), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.11.005>
13. Khatib, A. E., Hashem, N. M., El-Kodary, L. M., Lotfy, F. M., & Hassan, G. A. (2016). Evaluation of the effects of cypermethrin on female reproductive function by using rabbit model and of the protective role of Chinese propolis. *Biomedical and Environmental Sciences*, 29(10), 762–766.
14. Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
15. Koubaa-Ghorbel, F., Chaâbane, M., Jdidi, H., Turki, M., Makni-Ayadi, F., & El Feki, A. (2021). *Salvia officinalis* mitigates uterus and liver damages induced by an estrogen deficiency in ovariectomized rats. *Journal of Food Biochemistry*, 45 (5), e13542. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13542>
16. Lakshmanan, M. D., & Hassan, M. S. A., (2021). Ligand binding domain of estrogen receptor alpha preserve a conserved structural architecture similar to bacterial taxis receptors. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 681913. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.681913>
17. Lee, H. R., Kim, T. H., & Choi, K. C. (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Laboratory Animal Research*, 28(2), 71–76. <https://doi.org/10.5625/lar.2012.28.2.71>
18. Li, C., Cao, M., Ma, L., Ye, X., Song, Y., Pan, W., ... & Zhou, J. (2018). Pyrethroid pesticide exposure and risk of primary ovarian insufficiency in Chinese women. *Environmental Science & Technology*, 52 (5), 3240–3248. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06689>
19. Liu, H., He, S., Wang, T., Orang-Ojong, B., Lu, Q., Zhang, Z., ... & Zhu, Y. (2018). Selected phytoestrogens distinguish roles of ER  $\alpha$  transactivation and ligand binding for anti-inflammatory activity. *Endocrinology*, 159(9), 3351–3364. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00275>
20. Marty, M. S., Carney, E. W., & Rowlands, J. C. (2011). Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicological Sciences*, 120 (1), 93–108. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq329>
21. Millán, M. M. (2015). The role of estrogen receptor in bone cells. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 13, 105–112. <https://doi.org/10.1007/s12018-015-9188-7>
22. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
23. Ng, H. W., Zhang, W., Shu, M., Luo, H., Ge, W., Perkins, R., ... & Hong, H. (2014). Competitive molecular docking approach for predicting estrogen receptor subtype  $\alpha$  agonists and antagonists. *BMC Bioinformatics*, 15, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S11-S4>
24. Ortiz, D. M. D., Park, J., Lee, H., & Park, K. (2024). Integrated Assessment for the Estrogenic Effects of Pyrethroid Compounds: Defining the Molecular Initiating Events and Key Events for the Adverse Outcome Pathway. *Toxics*, 12(3), 218. <https://doi.org/10.3390/toxics12030218>
25. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.200844>
26. Pires, D. E., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (9), 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
27. Powers, C. N., & Setzer, W. N. (2015). A molecular docking study of phytochemical estrogen mimics from dietary herbal supplements. *In Silico Pharmacology*, 3, 1–63. <https://doi.org/10.1186/s40203-015-0008-z>
28. Puranik, N. V., Srivastava, P., Bhatt, G., John Mary, D. J. S., Limaye, A. M., & Sivaraman, J. (2019). Determination and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen



- receptor (ER $\alpha$ ) by various parameters and molecular modelling approach. *Scientific Reports*, 9(1), 7450. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43768-5>
29. Rashidi, Z., Khosravizadeh, Z., Talebi, A., Khodamoradi, K., Ebrahimi, R., & Amidi, F. (2021). Overview of biological effects of Quercetin on ovary. *Phytotherapy research*, 35 (1), 33–49. <https://doi.org/10.1002/ptr.6750>
  30. Ravula, A. R., & Yenugu, S. (2021). Pyrethroid based pesticides—chemical and biological aspects. *Critical Reviews in Toxicology*, 51(2), 117–140. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1879007>
  31. Rouane, A., Tchouar, N., Belaidi, S., Kerassa, A., & Lanez, T. (2023). Chemical structure, substitution effect, and drug-likeness applied to quercetin and its derivatives. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15(1), 10–33. <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.1278>
  32. Sayed, F. A., Fraser, D. G., Spelsberg, T. C., Rosen, C. J., Krust, A., Chambon, P., ... & Khosla, S. (2007). Effects of loss of classical estrogen response element signaling on bone in male mice. *Endocrinology*, 148(4), 1902–1910. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1165>
  33. Seeliger, D., & de Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design*, 24(5), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>
  34. Shepelska, N. R., Prodanchuk, M. G., & Kolianchuk, Y. V. (2021). Comparative analysis of two methodological approaches to the study of endocrine disruptor alpha-cypermethrin reproductive toxicity. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12 (4), 724–732. <https://doi.org/10.15421/0221100>
  35. Shu, X., Hu, X. J., Zhou, S. Y., Xu, C. L., Qiu, Q. Q., Nie, S. P., & Xie, M. Y. (2011). Effect of quercetin exposure during the prepubertal period on ovarian development and reproductive endocrinology of mice. *Yao Xue Xue Bao*, 46 (9), 1051–1057.
  36. Slighoua, M., Amrati, F. E. Z., Chebaibi, M., Mahdi, I., Al Kamaly, O., El Ouahdani, K., ... & Bousta, D. (2023). Quercetin and ferulic acid elicit estrogenic activities in vivo and in silico. *Molecules*, 28 (13), 5112. <https://doi.org/10.3390/molecules28135112>
  37. Suthon, S., Lin, J., Perkins, R. S., Crockarell, J. R., Miranda-Carboni, G. A., & Krum, S. A. (2022). Estrogen receptor alpha and NFATc1 bind to a bone mineral density-associated SNP to repress WNT5B in osteoblasts. *The American Journal of Human Genetics*, 109(1), 97–115. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.11.018>
  38. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
  39. Yadav, I. C., & Devi, N. L. (2017). Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environmental science and engineering*, 6, 140–158.
  40. Zhang, Q., Yu, S., Chen, X., Fu, L., Dai, W., & Gu, S. (2021). Stereoisomeric selectivity in the endocrine-disrupting potential of cypermethrin using in vitro, in vivo, and in silico assays. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125389. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125389>