

## Peran Genestein Pada Pengikatan Reseptor Estrogen $\alpha$

**Budi Mulyati**

Program Studi Teknik Industri Fakultas Teknik  
Universitas Nurtanio Bandung  
Jl Pajajaran 219 Bandung 40174  
e-mail:- [b.mulyati@yahoo.com](mailto:b.mulyati@yahoo.com)

**Abstrak.** *Reseptor Estrogen (RE)  $\alpha$  akan berinteraksi dengan estrogen dalam tubuh manusia. Bila kadar Estrogen berkurang akan menyebabkan menopause. RE  $\alpha$  digunakan sebagai target untuk mencari hormon pengganti untuk mengurangi gejala menopause dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Genestein adalah salah satu senyawa isoflavon aglikon dalam kacang kedelai yang memiliki berbagai aktivitas biokimia, termasuk antikanker, antitumor, dan antioksidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan urutan ligan yang berinteraksi lebih kuat terhadap RE  $\alpha$  serta menentukan gugus fungsi yang berperan aktif dan jenis interaksi yang terjadi antara ligan dan reseptor. Ligan yang digunakan pada penelitian ini adalah Genestein, Daidzein, Biochanin A dan Kakkatin, Sebagai pembanding digunakan ligan alami Estrogen. Penelitian dilakukan dengan menggunakan komputasi yaitu dengan program ONIOM. Hasil penelitian ini menunjukkan urutan potensi estrogenik, secara berturut-turut dari Genestein, Daidzein, Biochanin A dan Kakkatin adalah 97,51% ; 95,82 % ; 87,14 % dan 84,42 %. Hasil dari ligplus menunjukkan bahwa interaksi antara ER  $\alpha$  dengan Genistein merupakan interaksi dengan lima ikatan hidrogen dari 3 asam amino yaitu Thr 431, Arg 434 dan Gln 506. Kesimpulan Genestein dapat berperan sebagai pengganti hormon estrogen pada pengikatan dengan reseptor estrogen  $\alpha$ .*

**Kata Kunci :** Genestein, Reseptor Estrogen  $\alpha$ , Estrogen

### **Abstrack**

*The Estrogen receptor (RE)  $\alpha$  will interact with estrogen in the human body. If the estrogen level is reduced it will cause menopause. RE  $\alpha$  is used as a target to look for hormone replacement to reduce menopausal symptoms and inhibit cancer cell growth. Genestein is one of the isoflavone aglycone compounds in soybeans which has various biochemical activities, including anticancer, antitumor, and antioxidants. The purpose of this study is to determine the sequence of ligands that interact more strongly with RE  $\alpha$  and determine functional groups that play an active role and the types of interactions that occur between ligands and receptors. The ligands used in this study were Genestein, Daidzein, Biochanin A and Kakkatin, as a comparison used Estrogen natural ligands. The research was conducted using computing, namely the ONIOM program. The results of this study indicate the potential sequence of estrogenic, respectively from Genestein, Daidzein, Biochanin A and Kakkatin, 97.51%; 95.82%; 87.14% and 84.42%. The results of the ligplus show that the interaction between ER  $\alpha$  and Genistein is an interaction with five hydrogen bonds from 3 amino acids, namely Thr 431, Arg 434 and Gln 506. Conclusion Genestein can act as a substitute for estrogen in binding to estrogen receptors  $\alpha$ .*

**Keywords :** Genestein, Estrogen Receptor  $\alpha$ , Estrogen

## PENDAHULUAN

Genistein adalah fitoestrogen yaitu bahan kimia yang mirip estrogen pada tumbuhan yang berfungsi sebagai prekursor pada metabolisme manusia. Fitoestrogen ini secara alami menjadi bahan kimia yang dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen untuk melemahkan estrogen atau dengan kata lain sebagai antiestrogen. Fitoestrogen ini tersusun atas komponen-komponen besar senyawa non steroid yang mirip dengan estrogen (Leclerg et al., 1999). Menurut Hughes et al., (1998) ada tiga kandungan kimia utama tumbuhan kedelai yang memiliki sifat dan fungsi seperti estrogen di dalam tubuh, yaitu lignin (enterolakton dan enterodiol), isoflavon (genistein, daidzein, biochanin A, dan glycitein), dan coumestan. Dua zat utama fitoestrogen yang ditemukan pada makanan manusia adalah lignan (enterodiol dan enterolakton) dan isoflavon (daidzein, genistein, dan glycitein). Isoflavon merupakan bagian dari flavonoid yang banyak ditemukan di dalam kedelai. Kandungan utama isoflavon di kedelai adalah genistein dan daidzein walaupun sebenarnya ada banyak kandungan isoflavon lain seperti glycitein dan biochanin A. Kedelai mengandung lebih banyak Genistein daripada Daidzein walaupun rasio ini bervariasi dalam produk kedelai yang berbeda. Isoflavon yang merupakan bagian dari fitoestrogen ini memiliki fungsi penting dalam mekanisme pertahanan diri tumbuhan (Hughes et al., 1998)

yaitu, estrogen  $\alpha$  (RE  $\alpha$ ) dan estrogen  $\beta$  (RE $\beta$ ). Kedua reseptor ini dibentuk oleh rantai tunggal polipeptida dengan 565 asam amino untuk RE  $\alpha$  dan 530 asam amino pada RE  $\beta$ .

Menurut Allred (2004) sebuah penelitian menunjukkan bahwa bangsa Asia, khususnya Jepang,

Hormon adalah senyawa-senyawa kimia alami dan dikeluarkan oleh kelenjar endokrin ke dalam sirkulasi darah. Salah satu contoh hormon pada manusia adalah estrogen. Estrogen

mempengaruhi pertumbuhan, merangsang perkembangan ciri kelamin sekunder wanita dan berfungsi pada berbagai macam target di jaringan, termasuk jaringan sistem reproduktif pria dan wanita seperti payudara, uterus, ovarium, testis dan prostat. Estrogen juga berperan penting dalam pemeliharaan tulang dan sistem kardiovaskular dimana estrogen mempunyai efek kardioprotektif tertentu (Clark et al. 1992).

Reseptor estrogen merupakan salah satu anggota reseptor inti yang memperantarai aksi hormon estrogen di dalam tubuh. Estrogen bekerja meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel sistem reproduksi baik pada wanita dan pria, serta dapat meningkatkan kadar kolesterol HDL dan menurunkan LDL sehingga berpotensi mengurangi resiko penyakit kardiovaskuler. Estrogen berperan penting pada perkembangan otak, penyakit autoimun, dan metabolisme tulang dan pada sisi lain, estrogen dapat memicu pertumbuhan, *proliferasi* dan *metastase* kanker payudara (Prawiroharsono, 2001).

Reseptor estrogen terdiri dari 2 subtipe

memiliki resiko yang lebih rendah untuk terserang penyakit kanker payudara dan gejala menopause, dibanding dengan bangsa Eropa dan sekitarnya. Hal Ini disebabkan oleh banyaknya konsumsi kacang kedelai di kalangan Asia. Isoflavones dapat mengurangi kadar kolesterol, yang

dapat mengakibatkan *atherosclerosis* dan penyempitan pembuluh darah sehingga dapat menurunkan resiko serangan jantung dan stroke.

Tanaman yang banyak terdapat di Indonesia dan sudah diketahui mengandung senyawa isoflavon dengan kadar tinggi selain kedelai adalah kunyit, laos, dan temu hitam (Asih 2009).

Menurut penelitian Kuiper (1998) *fitoestrogen* meliputi *genistein*, *coumestrol* dan *zearalenone* menstimulasi aktivitas transkripsi kedua tipe estrogen reseptor pada konsentrasi 1-10 nM. Peringkat potensi estrogenik *fitoestrogen* terhadap reseptor estrogen  $\alpha$  adalah sebagai berikut: Estradiol >> zearalenone = coumestrol > genistein > daidzein > apigenin = phloretin > biochanin A = kaempferol = naringenin > formononetin = ipriflavone = quercetin = chrysin. Sedangkan potensi estrogenik *fitoestrogen*

## BAHAN DAN METODE.

Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini adalah Komputer server ITB *High Performance Computer (HPC)* dan sistem operasi Linux Mandriva 2009 dan perangkat komputer dengan sistem operasi Windows 2010. HPC ITB mempunyai 20 *nodes* dimana setiap *nodes* mempunyai 24 *cores intel prosesor* 16 GB dengan sistem operasi *Rocks Cluster*.

Perangkat Lunak yang digunakan dalam penelitian ini adalah untuk keperluan simulasi yaitu ACD/Chemsketch digunakan untuk membuat struktur dua dimensi dan tiga dimensi seluruh ligan. *Avogadro* digunakan untuk visualisasi struktur tiga dimensi ligan dari hasil ACD/ChemSketch maupun Gaussian-09. Untuk membuat input data dan menentukan “*low layer*” dan “*high*

terhadap reseptor estrogen  $\beta$  adalah Estradiol >> genistein = coumestrol > zearalenone > daidzein > biochanin A = apigenin = kaempferol = naringenin > phloretin = quercetin = ipriflavone = formononetin = chrysin.

*ONIOM* merupakan singkatan dari *Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanic*. Singkatnya, *ONIOM* adalah suatu teknik perhitungan dengan membagi sistem menjadi beberapa lapisan (*layer*), bisa menjadi dua atau tiga lapisan dengan metode kimia komputasi yang berbeda. Untuk lapisan yang dalam atau ikatan antara ligan dan residu dari reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  disebut sebagai “*high layer*”. Pada *high layer* ini optimasi dan energi dihitung menggunakan metode *QM (Quantum Mechanics)* sedangkan lapisan yang tidak berikatan langsung dengan ligan, disebut lapisan “*low layer*”. Lapisan *low layer* ini optimasi dan energi dihitung menggunakan *MM (Molecular Mechanics)*.

“*layer*” pada Gaussian-09 dengan metode *ONIOM* digunakan Gaussview 5.0, sedangkan untuk keperluan visualisasi adalah *VMD* digunakan untuk visualisasi dan preparasi input yang akan digunakan untuk simulasi pada *NAMD*. *VMD* juga digunakan untuk menganalisa *output* dari hasil perhitungan simulasi *NAMD*. *NAMD* digunakan untuk optimasi struktur protein. *Autodock Vina* digunakan untuk simulasi docking Reseptor Estrogen  $\alpha$  dengan seluruh ligan. *Pymol* digunakan untuk visualisasi hasil proses docking juga hasil perhitungan dengan metode *ONIOM* pada Gaussian-09.

## Optimasi Struktur Ligan dan Reseptor Estrogen

Ligan yang digunakan pada penelitian ini sebanyak delapan buah yaitu Estrogen, Genistein, Daidzein,

Glisitein, Biochanin A, 6,4'-dihidroksi-7-metoksiisoflavan, Kakkatin dan Faktor 2. Struktur ligan digambar menggunakan ACD/Chemsketch kemudian dibuat tampilan tiga dimensi. Input dibuat menggunakan Avogadro untuk selanjutnya dilakukan

### **Simulasi Docking Reseptor Estrogen $\alpha$ - ligan dan Penentuan Residu Aktif**

Program Autodock Vina digunakan untuk menggabungkan setiap ligan ke ligan-binding domain ER $\alpha$ . Autodock dapat menggabungkan posisi pengikatan yang sesuai untuk ligan dimana pada penelitian ini digunakan *genetic algorithm* (GA).

Model estrogen reseptor digunakan sebagai molekul target. Program Autodock Vina 4.0 digunakan untuk mengkalkulasikan muatan parsial atom dalam molekul target. Kisi kubus (grid box) (18 x 18 x 18) dari interaksi karbon, hidrogen dan oksigen. Dilakukan penambahan hidrogen polar pada RE  $\alpha$

#### **ONIOM**

Hasil Docking dari autodock Vina yang berbentuk PDB, divisualisasi dengan Gaussview 5.0 kemudian residu asam amino yang berikatan langsung dengan ligan dipilih menjadi lapisan pertama atau "high layer" dan dihitung menggunakan metode Density Functional Theory (DFT) dan basis set 6-31G. Sedangkan residu lain yang tidak berikatan langsung dengan ligan dipilih sebagai lapisan kedua atau "Low layer" dengan perhitungan Universal Force Field (UFF). Setelah persiapan di Gaussview 5.0 kemudian dihitung muatan mulliken, optimasi, energi

simulasi optimasi geometri menggunakan Gaussian-09. Optimasi geometri diset pada temperatur 310 K dengan basis 6-31 G (d) dan teori B3LYP.

molekul ligan ke molekul protein globular yang rigid berdasarkan algoritma *Lamarckian genetic*. Model ini mengkombinasikan kecepatan evaluasi energi menggunakan prekalkulasi kisi (grid) energi afinitas atomik setiap tipe atom dalam molekul reseptor dengan variasi algoritma pencarian untuk menemukan

menggunakan AutoDock Vina. Proses docking RE $\alpha$ -ligan juga dilakukan menggunakan AutoDock Vina. RE  $\alpha$  yang digunakan adalah RE  $\alpha$  dalam bentuk kristalnya sebelum dioptimasi dan RE  $\alpha$  dalam bentuk solvasi setelah optimasi. Hasil docking dianalisis menggunakan Pymol. Untuk menentukan residu asam amino yang aktif yang berikatan langsung dengan ligan maka digunakan *software* Ligplot dengan memasukkan data PDB hasil dari autodock Vina

pada low layer dan high layer menggunakan Gaussian-09.

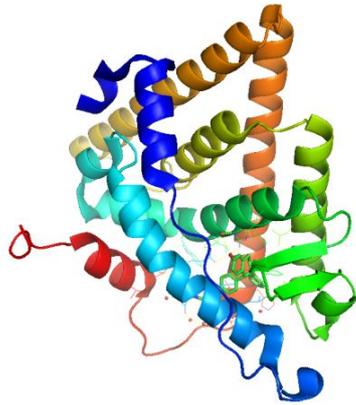
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Optimasi Struktur Ligan**

Struktur protein RE  $\alpha$  diambil dari Bank Data Protein dengan kode 2 OUZ.

RE  $\alpha$  ini merupakan struktur kristal berupa monomer dengan satu rantai. RE  $\alpha$  yang terikat kompleks dengan lasofixene. Namun selanjutnya dalam penelitian lasofixene dihilangkan keberadaannya.

Struktur RE  $\alpha$  sesudah dioptimasi dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Reseptor Estrogen  $\alpha$  (2OUZ) dari Protein Data Bank (PDB)

Komputasi kimia dapat menjelaskan dengan teliti sifat dan parameter yang ada dalam sistem kimia. Beberapa diantaranya yaitu penentuan struktur/geometri, frekuensi vibrasi dan spektra berbagai molekul. Tahap awal dari studi komputasi adalah menentukan optimasi geometri. Optimasi geometri bertujuan untuk mendapatkan struktur molekul tiga dimensi dengan energi minimum (keadaan paling stabil). Penentuan optimasi geometri molekul diawali dengan perkiraan awal struktur yang dinyatakan dalam Z-matrik.

Ligan adalah senyawa organik atau anorganik yang berperan dalam interaksi pada domain pengikatan ligan protein dan dapat mempengaruhi aktivitas pada protein tersebut. Ligan dapat berupa substrat, regulator, inhibitor, kofaktor maupun efektor lain. Dalam penelitian ini ligan yang berupa senyawa organik yang berinteraksi dengan sisi aktif protein sebagai molekul pembawa pesan untuk mengaktifkan reseptor untuk melakukan tahap transkripsi. Ligan ini dioptimasi agar didapat energi elektronik seminimal mungkin. Perhitungan ini dilakukan dengan pendekatan DFT (*Density Functional Theory*), yaitu pendekatan untuk menghitung atau menentukan

geometri struktur optimal pada molekul dengan banyak atom secara Quantum Mechanics (QM). Perhitungan ini juga dilakukan dengan pendekatan Born-Oppenheimer yaitu inti atom dianggap diam pada saat meninjau gerak elektron. Sehingga energi elektronik yang dihitung merupakan penjumlahan dari energi potensial elektron dan energi kinetik elektron. Ketika didapat geometri molekul berada pada posisi jarak dan sudut yang paling stabil. Molekul ini merupakan bentuk yang paling optimal. Proses Docking dilakukan pada RE  $\alpha$  yang sudah dioptimasi dengan ligan yang sudah dioptimasi pula. Pada proses docking, protein reseptor diasumsikan sebagai molekul yang kaku sedangkan ligan diasumsikan sebagai molekul yang memiliki beberapa derajat kebebasan, terutama dalam sudut torsional, karena beberapa parameter lainnya seperti panjang ikatan dan sudut ikatan memiliki nilai konstan untuk konformasi molekul yang berbeda. Oleh karena itu, hasil yang didapat setelah tahap *docking* adalah berbagai energi afinitas interaksi ligan yang dapat terikat pada domain pengikatan ligan RE  $\alpha$ .

**Tabel 1.** Energi Afinitas Ligan terhadap RE  $\alpha$  Hasil docking *Autodock Vina*

Nama Ligan	Energi Afinitas (Kkal/mol)
Estrogen	-6,8
Daidzein	-6,2
Genistein	-6,1
Kakkatin	-6,1
Biochanin A	-5,4

Pada

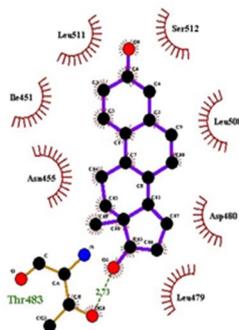
uji transaktivasi secara eksperimen oleh Kuiper *et al.*, (1998) estrogen dan berbagai fitoestrogen dicampurkan ke dalam larutan protein ER  $\alpha$ , kemudian dilihat inhibisi fitoestrogen tersebut dalam interaksinya terhadap ER  $\alpha$ . Urutan potensi estrogenik fitoestrogen adalah sebagai berikut: Estradiol >> zearalenone = coumestrol > genistein > daidzein > apigenin = phloretin > biochanin A = kaempferol = naringenin > formononetin = ipriflavone = quercetin = chrysin. Sedangkan berdasarkan komputasi urutan potensi estrogenik adalah sebagai berikut : estrogen > faktor 2 > daidzein > genestein > glisitein > biochanin A.

Dari urutan potensi estrogenik yang tidak sama menunjukkan bahwa hasil pemodelan struktur reseptor-ligan secara komputasi tidak sejalan dengan hasil eksperimen yang dilakukan oleh Kuiper *et al.*, namun perbedaannya hanya terletak pada urutan daidzein dan genestein, hal ini dikarenakan adanya gugus OH yang lebih

elektronegatif pada gugus aromatik pada ligan daidzein menyebabkan adanya ikatan hidrogen antara ligan dengan reseptor estrogen  $\alpha$  lebih stabil, dan menyebabkan energi afinitas antara daidzein dan reseptor estrogen  $\alpha$  menjadi rendah. Walaupun terdapat perbedaan urutan potensi estrogenik antara daidzein dan genestein, namun perbedaannya hanya 1,49%, sehingga perbedaannya tidak terlalu signifikan.

#### **Gugus fungsi yang berperan pada Reseptor Estrogen $\alpha$**

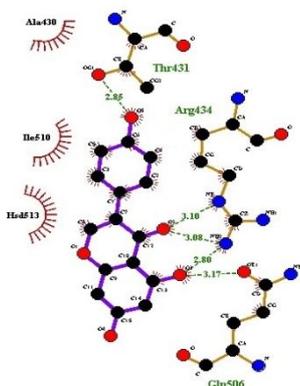
Dari tabel dapat diketahui bahwa energi afinitas estrogen yang paling rendah dibandingkan ligan lain. Hal ini disebabkan karena estrogen mempunyai gugus fenol pada posisi C-3 dalam cincin aromatik A, inti hidrokarbon yang relatif kaku dan gugus fungsi alkohol pada posisi C-17. Hidroksil dari C-3 berfungsi sebagai donor ikatan hidrogen dan C-17 hidroksi berfungsi sebagai akseptor ikatan hidrogen.



Gambar 2. Hasil ligplot Interaksi RE  $\alpha$  dengan Estrogen

Estrogen adalah ligan alami RE  $\alpha$ . Estrogen yang terikat dengan RE  $\alpha$  memiliki energi afinitas paling negatif yaitu sebesar -6,7 kkal/mol. Interaksi kuat yang terbentuk antara ligan dengan asam amino pada protein berjarak antara 3,0 sampai 5,0 Å. Jika interaksi antara ligan dan asam amino pada domain pengikatan ligan RE  $\alpha$  berjarak lebih dari 5,0 Å, maka interaksi tersebut lemah pada sistem RE  $\alpha$  – ligan. Gugus yang bersifat

nonpolar pada estrogen juga berperan interaksinya dengan asam amino pada domain pengikatan ligan RE  $\alpha$ . Gugus hidroksi fenolik pada C-15 membentuk ikatan hidrogen dengan Thr 483 dengan panjang ikatan 2,73 Å. Estrogen mengikat dengan energi afinitas yang paling negatif karena mempunyai konformasi ligan stabil yang berinteraksi kuat dengan tiga asam amino bersifat nonpolar.



Gambar 4.7 Hasil ligplot Interaksi RE  $\alpha$  dengan Genistein

Dari hasil pengamatan interaksi antara ER  $\alpha$  dengan genistein merupakan interaksi dengan lima ikatan hidrogen yaitu interaksi antara gugus hidroksi fenolik pada atom C6 dengan Thr 431 dengan panjang ikatan 2,85 Å, gugus hidroksi fenolik pada atom C12 membentuk ikatan hidrogen dengan

Arg 434 pada dua atom nitrogen yang berbeda dengan panjang ikatan 3,10 Å dan 3,08 Å dan gugus fenolik pada atom C13 yang membentuk ikatan hidrogen dengan Arg 434 dan Gln 506. Adanya lima ikatan hidrogen ini membuat stabil sehingga energi afinitasnya sangat rendah.

### Energi Binding dengan metode ONIOM

ONIOM merupakan perhitungan optimasi energi antara ligan dan RE $\alpha$  dimana letak ligan telah ditentukan dari hasil docking autodock vina pada energi afinitas yang paling rendah, kemudian dioptimasi untuk menentukan energi yang paling

rendah, dan diketahui muatan mulliken untuk menentukan sisi aktif dari reseptor estrogen  $\alpha$ .

Untuk menentukan energi binding antara ligan dan reseptor dilakukan perhitungan energi reseptor  $\alpha$  dengan ligan kemudian dikurangi hasil penjumlahan energi reseptor  $\alpha$  tanpa ligan dengan energi ligan.

**Tabel 2.** Hasil Energi binding RE  $\alpha$  dari metode ONIOM

Nama Ligan	$\Delta$ Energi
Estrogen	-32.36
Genestein	-31.23
Daidzein	-30.50
Biochanin A	-28.20
Kakkatin	-27.20

**Tabel 3.** Perbandingan persentase estrogenik dari isoflavon terhadap estrogen berdasarkan binding energi pada Reseptor Estrogen  $\alpha$

Nama Ligan	Persentase Interaksi
Estrogen	100 %
Genistein	97.21%
Daidzein	94.25%
Biochanin A	87.14%
Kakkatin	84.05%

### Kesimpulan dan Saran

Genestein mempunyai potensi yang paling baik sebagai hormon pengganti estrogen karena mempunyai energi afinitas yang paling tinggi diantara

isoflavon lain terhadap RE  $\alpha$  dengan potensi estrogenik 97,21 % .

Perlu dilakukan penelitian pada skala laboratorium, peran Genestein sebagai pengganti hormon estrogen pada reseptor estrogen  $\alpha$ .

## DAFTAR RUJUKAN

- Achadiat, C.M. 2003, *Klinik Net*, (<http://situs.keseproInfo/aging/jul/2003/ag01>).
- Allred, D Craig., Powel Brown, Daniel Medina. 2004, The Origin of Estrogen Receptor alpha-positive and estrogen alpha-negative human breast cancer. Texas, USA. *Breast Cancer Research*, vol. 6, hh. 240-245.
- Anonim. 2010, *ACD/Chemsketch 12.0 for Microsoft Windows. Reference Manual*. Comprehensif Interface Description. Advance Chemistry Development, Inc. United States. Hh. 131-171.
- Asih, I. A.R. Astiti. 2009, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon dari Kacang Kedelai (*Glycine max*). Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran., *Jurnal Kimia*, vol. 3, no. 1, hh. 33-40.
- Barz, W., Heskamp, Klus, K., Rehms, H. dan Steinkamp, R. 1993, Recent Aspect of Protein, Phytate and Isoflavone Metabolism by Microorganisms Isolated from Tempe-Fermentation, *Tempo Workshop*, Jakarta, 15 Februari 1993.
- Bennion, B.J. 2005, *Computational Characterization and Prediction of Estrogen Receptor Coactivator Binding Site Inhibitors*, Lawrence Livermore National Laboratory.
- Gyorgy, P., K. Murata, and H. Ikehata 1964, Antioksidants isolated from fermented soybeans tempeh. *Nature*. 203, hh. 872-875.
- Handayani, Ira. 2006, *Studi Komputasi Interaksi 6,7,4'-trihidroksiisoflavon (faktor2) dengan Estrogen Reseptor  $\beta$* , Tesis tidak diterbitkan, Institut Teknologi Bandung.
- Hanwell, Marcus D., Geoff Hutchison, Tim Vandermeersch 2010, *Avogadro: Molecule Editor and Visualizer*.
- Hughes CL. 1998. Phytochemical Mimicry of Reproductive Hormones and Modulation of Herbivore Frertility by Phytoestrogens. *Environ Health Perspect*. 78: 171-174.
- Humphrey, W., Dalke, A. and Schultenn, K 2011, VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics* 1996. vol. 14, no. 1, hh. 33-38.
- Kuiper, George G.J.M. 1998, ENDOCRINOLOGY: Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ , *The Endocrine Society*. 139, hh. 4252- 4263.
- Leclercq G., Heuson JC., 1999. *Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer*. *Biochim Biophys Acta*. 560: 427–55.
-