

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalárska práca**

**Olomouc 2023**

**Tereza Kutejová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Prírodovedecká fakulta**

**Katedra bunkovej biológie a genetiky**



**Štúdium vplyvu vybraných monoterpenoidov na transkripčnú  
aktivitu ľudského pregnanového X receptoru (PXR) v ľudskej  
nádorovej bunkovej línii LS 180**

**Bakalárska práca**

**Tereza Kutejová**

Študijný program: Biológia

Študijný odbor: Molekulárna a bunková biológia

Forma štúdia: Prezenčná

**Olomouc 2023**

**Vedúca práce: Mgr. Zůvalová Iveta, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza KUTEJOVÁ**  
Osobní číslo: **R21749**  
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Studium vlivu vybraných monoterpenoidů na transkripční aktivitu lidského pregnanového X receptoru (PXR) v lidské nádorové buněčné linii LS 180**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce
2. Stanovení vlivu testovaných látek na viabilitu buněk
3. Stanovení transkripční aktivity pregnanového X receptoru po aplikaci testovaných látek pomocí metody reporter gene assay
4. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

1. Dvořák, Z., Sokol, H. & Mani, S. (2020): Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends Pharmacol Sci.* 41(12): 900-908
2. Bartoňková I., Dvořák Z. (2018): Essential oils of culinary herbs and spices display agonist and antagonist activities at human aryl hydrocarbon receptor AhR. *Food and Chemical Toxicology* 111: 374 – 384.
3. Bartoňková I., Dvořák Z. (2018): Essential oils of culinary herbs and spices activate PXR and induce CYP3A4 in human intestinal and hepatic in vitro models. *Toxicology Letters* 296: 1 – 9.
4. Ondrová K., Zůvalová I., Vyhliďalová B., Krasulová K., Miková E., Vrzal R., Nádvorník P., Nepal B., Kortagere S., Kopečná M., Kopečný D., Šebela M., Rastinejad F., Pu H., Sournal M., Rolfes KM., Haarmann-Stemmann T., Li H., Mani S., Dvořák Z. (2023): Aryl hydrocarbon receptor allosteric antagonists: A new paradigm established by monoterpenoids. *Nature Communications* (under review).

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Iveta Zůvalová, Ph.D.**  
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 15. března 2023

Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2023

## **Bibliografické údaje**

**Meno a priezvisko autora:** Tereza Kutejová

**Názov práce:** Štúdium vplyvu vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu ľudského pregnanového X receptora (PXR) v ľudskej nádorovej bunkovej línii LS 180

**Typ práce:** Bakalárska práca

**Pracovisko:** Katedra bunkovej biológie a genetiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

**Vedúci práce:** Mgr. Zůvalová Iveta, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2024

**Kľúčové slová:** PXR, PXR ligandy, biotransformácia, MTT esej, luciferázová reportérová esej, monoterpenoidy

**Počet strán:** 52

**Počet príloh:** 0

**Jazyk:** slovenský

### **Súhrn:**

Pregnanový X receptor je ligandom aktivujúci transkripčný faktor, ktorý je zároveň zaradený medzi jadrové receptory a jeho hlavnou úlohou je regulovať biotransformáciu liečiv a iných xenobiotík. Riadi expresiu viacerých cieľových génov a zúčastňuje sa viacerých fyziologických a patofyziologických procesov v organizme. Cieľom tejto bakalárskej práce bolo sledovať vplyv vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu PXR. Transkripčná aktivita PXR pomocou luciferázovej reportérovej eseje po 24-hodinovom pôsobení geraniolu, nerolu, R-(+)-borneolu, S-(-)-borneolu, izoborneolu, karvakrolu, tymolu, m-krezolu, o-krezolu a 2,3-dimetylfenolu. Bolo zistené, že spomedzi všetkých látok dosiahli najvyššiu indukciu transkripčnej aktivity PXR karvakrol a S-(-)-borneol oba v koncentrácii 100  $\mu$ M. Naopak najnižšou indukciou transkripčnej aktivity PXR sa prejavili m-krezol a o-krezol, ktorých hodnoty sa nedostali ani na 20 % indukcie rifampicínom. Spomedzi všetkých látok nebol zistený antagonizujúci účinok ani v jednej z nich. Táto práca prináša nové poznatky o možných ligandoch PXR a zároveň poznatky o rôznom účinku čistých terpenoidov oproti celým zmesiam obsiahnutých v esenciálnych olejoch na jadrové receptory.

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Tereza Kutejová

**Title:** Effects of selected monoterpenoids on the transcriptional activity of human pregnane X receptor (PXR) in human cancer cell line LS 180

**Type of thesis:** bachelor

**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc

**Supervisor:** Mgr. Zůvalová Iveta, Ph.D.

**The year of presentation:** 2024

**Keywords:** PXR, PXR ligands, biotransformation, MTT Assay, Luciferase Reporter Assay, Monoterpenoids

**Number of pages:** 52

**Number of appendices:** 0

**Language:** Slovak

### **Summary:**

The pregnane X receptor is ligand-activated transcription factor, which is also classified as a nuclear receptor and its main role is to regulate the biotransformation of drugs and other xenobiotics. It controls the expression of several target genes and is involved in multiple physiological and pathophysiological processes in the body. The aim of this bachelor thesis was to investigate the effect of selected monoterpenoids on the transcriptional activity of PXR. Transcriptional activity was determined by luciferase reporter assay after 24 hours of treatment with geraniol, nerol, R-(+)-borneol, S-(-)-borneol, isoborneol, carvacrol, thymol, m-cresol, o-cresol and 2,3-dimethylphenol. It was found that among all the substances, S-(-)-borneol and carvacrol both at a concentration of 100  $\mu$ M achieved highest PXR activation. In contrast, the lowest induction of PXR transcriptional activity was exhibited by m-cresol and o-cresol, whose values did not even reach 20% of the induction by rifampicin. Among all the substances, no antagonizing effect was detected. This work provides new insights into the possible ligands of PXR as well as insights into the differential effect of pure terpenoids versus whole mixtures contained in essential oils on nuclear receptors.

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu spracovala samostatne pod vedením Mgr. Ivety Zůvalovej, Ph.D. za použitia literárnych zdrojov uvedených v zozname literatúry.

V Olomouci dňa .....

Tereza Kutejová

## **Pod'akovanie**

Moje pod'akovanie patrí v prvom rade vedúcej mojej bakalárskej práce Mgr. Ivete Zúvalovej, Ph.D. za cenné rady a postrehy pri práci v laboratóriu a samozrejme aj za pomoc, trpezlivosť a ochotu pri spracovaní tejto bakalárskej práce. V neposlednom rade by som rada pod'akovala mojej rodine, priateľovi a všetkým priateľom za porozumenie, psychickú oporu a trpezlivosť v priebehu celého štúdia.



# OBSAH

<b>ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK.....</b>	<b>vii</b>
<b>ZOZNAM OBRÁZKOV.....</b>	<b>x</b>
<b>ZOZNAM TABULIEK.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 CIELE PRÁCE.....</b>	<b>2</b>
<b>3 LITERÁRNY PREHĽAD .....</b>	<b>3</b>
3.1 Biotransformácia .....	3
3.1.1 Prvá fáza biotransformácie a účastniace sa enzýmy .....	3
3.1.2 Druhá fáza biotransformácie a účastniace sa enzýmy .....	4
3.1.3 Tretia fáza biotransformácie .....	5
3.2 Pregnanový X receptor .....	5
3.2.1 Štruktúra.....	6
3.2.2 Signalizácia.....	7
3.2.3 Fyziologické a patologické procesy.....	8
3.2.4 Ligandy PXR .....	10
3.3 Receptorová teória.....	13
3.3.1 Agonizmus .....	13
3.3.2 Antagonizmus .....	14
3.4 Študované monoterpenoidy .....	15
3.5 Vplyv terpenoidov na jadrové receptory .....	18
<b>4 MATERIÁL A METÓDY .....</b>	<b>19</b>
4.1 Biologický materiál .....	19
4.2 Použité plazmidy .....	19
4.3 Použité chemikálie, sady a roztoky .....	19
4.4 Laboratórne pomôcky .....	21
4.5 Prístroje.....	22
4.6 Použité metódy .....	22
4.6.1 Kultivácia a pasážovanie buniek.....	22
4.6.2 Počítanie a vysievanie buniek na experiment .....	23
4.6.3 Príprava a aplikácia látok a jednotlivých kontrol.....	23
4.6.4 MTT test.....	24
4.6.5 Izolácia plazmidovej DNA.....	25

4.6.6 Transfekcia buniek.....	26
4.5.7 Luciferázová reportérová esej.....	27
4.5.8 Vyhodnotenie.....	27
<b>5 VÝSLEDKY.....</b>	<b>29</b>
5.1 Stanovenie cytotoxických účinkov vybraných monoterpenoidov na bunkovú líniu LS 180.....	29
5.3 Vplyv vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu PXR v bunkovej línii LS 180.....	31
5.3.1 Agonistický mód.....	31
5.3.2 Antagonistický mód.....	34
<b>6 DISKUSIA.....</b>	<b>38</b>
<b>7 ZÁVER.....</b>	<b>41</b>
<b>8 LITERATÚRA.....</b>	<b>42</b>

## ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

ABC	kazetové transportéry viažúce ATP
AF	aktivačná funkcia
ATP	adenozíntrifofát
cAMP	cyklický adenosínmonofosfát
CAR	konštitutívny androstanový receptor
CDK	cyklín-depedentná kináza
CoA	koenzým A
COX-2	cyklooxygenáza 2
CREB	element pre odpoveď na cAMP
CYP450	cytochróm P450 enzýmy
DBD	DNA viažuca doména
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM-CS	Dulbecco's Modified Eagle's Medium s hormonálne inaktivovaným FBS
DMSO	dimetylsulfoxid
DR	priame opakovania
DR3	priame opakovania oddelené 3 pámi báz
DR4	priame opakovania oddelené 4 pámi báz
DTT	ditiotritol
EC <sub>50</sub>	polovičná maximálna efektívna koncentrácia
EDTA	etyléndiamíntetraoctová kyselina
EOs	esenciálne oleje
ER	evertované opakovania
ER6	evertované opakovania oddelené 6 pámi báz

FBS	fetálne bovinné sérum
FBS-CS	hormonálne inaktivované fetálne bovinné sérum
FOXO 1	proteín „forkhead box“ 1
G6Páza	glukóza-6-fosfatáza
GST	glutathion S-transferázy
HNF4	jadrový faktor hepatocytov 4
hPXR	ľudský pregnanový X receptor
IAA	indol-3-octová kyselina
IBD	zápalové ochorenia čriev
IC <sub>50</sub>	koncentrácia spôsobujúca redukciu životaschopnosti na 50 %
IPA	indol-3-propionová kyselina
LBD	ligand viažuca doména
LCA	kyselina litocholová
MDR1	proteín multiliekovej rezistencie 1
MTT	Metyltetrazóliová soľ
NADH	nikotínamidadeníninukleotid
NADPH	nikotínamidadeníninukleotidfosfát
NAT	N-acetyltransferázy
NCoR2	jadrový receptorový korepresor
NF-κB	jadrový faktor κB
NR1I2	jadrový receptor podrodiny 1, skupiny I, člen 2
NRs	jadrový receptor
OAT2	organický aniónový transportér 2
p3A4	cytochrom p3A4

PAR	pregnanom aktivovaný receptor
PBS	fosfátový pufor
PCN	pregnenolón 16 $\alpha$ -karbonitril
PEPCK	fosfoenolpyruvátkarboxykináza
Pgp	P-glykoproteín
PPARs	jadrové receptory aktivované peroxizómovými proliferátormi
PXR	pregnanový X receptor
RIF	rifampicín
RXR	receptor kyseliny 9-cis retinovej
SLC	transportéry prenášajúce rozpustené látky
SMRT	mediátor utlmenia retinoidov a hormónov
SRC	steroidný receptorový koregulátor
SULT	sulfotransferázy
SXR	steroidný X receptor
TCDD	2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxín
UDPGA	uridíndifosfát glukurónovej kyseliny
UGT	UDP-glukuronyltransferázy
VDR	receptor pre vitamín D

## ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obrázok 1:</b> Štruktúra jadrového receptora.....	7
<b>Obrázok 2:</b> Pôsobenie a funkcie pregnanového X receptora. Upravené podľa (Skandalaki <i>et al.</i> , 2021).....	10
<b>Obrázok 3:</b> Schéma vzťahu pôsobenia plného a čiastočného agonistu. Upravené podľa (Pleuvry, 2004).....	14
<b>Obrázok 4:</b> Vplyv pôsobenia vybraných monoterpenoidov na viabilitu bunkovej línie LS 180 po 24 hodinovej inkubácii.....	30
<b>Obrázok 5:</b> Vplyv pôsobenia vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu PXR v agonistickom móde v bunkovej línie LS 180 po 24 hodinovej inkubácii.....	33
<b>Obrázok 6:</b> Vplyv pôsobenia vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu PXR v antagonistickom móde v bunkovej línie LS 180 po 24 hodinovej inkubácii.....	37

## ZOZNAM TABULIEK

<b>Tabuľka 1:</b> Príklady endogénnych a exogénnych ligandov PXR.....	12
<b>Tabuľka 2:</b> Vybrané monoterpenoidy spolu s ich identifikačnými údajmi a štruktúrnym vzorcom.....	17
<b>Tabuľka 3:</b> Koncentrácie zásobných a zriedených roztokov vybraných monoterpenoidov.....	24
<b>Tabuľka 4:</b> Odhad hodnôt $EC_{50}$ pre každú látku určený priemernou hodnotou troch nezávislých experimentov so smerodajnou odchylkou.....	34

# 1 ÚVOD

Biotransformácia je chemický obranný systém organizmu, schopný vylúčiť látky exogénneho alebo endogénneho pôvodu a nežiadúce metabolity z tela. Ide o proces zložený z množstva po sebe nasledujúcich reakcií rozdelených do troch hlavných fáz. Účastní sa ich mnoho enzýmov, schopných tieto látky spracovať a vytvoriť z nich hydrofilnejšie zlúčeniny, ktoré sú jednoduchšie vylúčiteľné.

Jedným z najznámejších transkripčných faktorov hrajúci hlavnú rolu v regulácii biotransformácie xenobiotík, ktorý bol zároveň na základe podobnosti s inými jadrovými receptormi zaradený do podrodiny jadrových receptorov, je pregnanový X receptor. Nachádza sa takmer v celom organizme a plní mnoho funkcií, z nich najpodstatnejšími sú regulácia metabolizmu xenobiotík, čím získal prívlastok najznámejšieho xenobiotického senzoru. Jeho ďalšími funkciami sú odbúravanie žlčových kyselín, regulácia zápalových ochorení čriev či úloha pri regulovaní rakovinových ochorení.

PXR je aktivovaný mnohými látkami endogénneho či exogénneho pôvodu. K endogénnym patria viaceré steroidné látky, hormóny, produkty degradácie tukov a v neposlednom rade indoly a ich deriváty, vznikajúce katabolizmom tryptofánu. Exogénne ligandy aktivujúce PXR sú najmä spomedzi liečiv, vitamínov alebo enviromentálnych polutantov. V posledných štúdiách bola dokázaná aj aktivácia PXR niektorými esenciálnymi olejmi (EOs) rastlín. Zložkou EOs sú tiež sekundárne metabolity, nazývané terpény, a ich deriváty terpenoidy a niektoré z nich sú predmetom testovania v tejto práci. Konkrétne ich vplyv na transkripčnú aktivitu PXR.



## **2 CIELE PRÁCE**

1. Vypracovanie literárnej rešerše na tému bakalárskej práce
2. Stanovenie vplyvu testovaných látok na viabilitu buniek
3. Stanovenie transkripčnej aktivity pregnanového X receptoru po aplikácii testovaných látok pomocou metódy reporter gene assay
4. Vypracovanie bakalárskej práce a multimedialnej prezentácie k obhajobe bakalárskej práce

## 3 LITERÁRNY PREHĽAD

### 3.1 Biotransformácia

Organizmy sú po celý čas svojej existencie vystavované potenciálne toxickým substanciam rozličného pôvodu. Jedná sa o látky endogénneho pôvodu ako napríklad steroidné hormóny, cholesterol, žľčové soli, mastné kyseliny, bilirubín či oxysteroly. Na druhej strane stoja xenobiotiká čiže látky exogénneho pôvodu, kam patria mimo iné toxíny, karcinogény, liečivá, zložky potravy alebo enviromentálne polutanty. K zabráneniu toxického pôsobenia látok na tkanivá a k udržaniu homeostázy v metabolických dráhach sa vyvinul obranný systém. Jeho úlohou je schopnosť eliminovať cudzie látky a metabolity z tela pomocou biotransformačných reakcií, ktoré sprostredkávajú biotransformačné enzýmy a transportné proteíny (Matic *et al.*, 2007). Pomocou biotransformácie dochádza k metabolizmu nežiadúcich látok a tým sa zníži ich efekt na daný organizmus.

Niekedy však môžeme pozorovať aj aktiváciu niektorých zlúčenín na toxické. Príkladom môže byť benzo( $\alpha$ )pyrén, u ktorého po priebehu biotransformačných reakcií dochádza k vytvoreniu pre telo toxických zlúčenín. Táto aromatická zlúčenina je metabolicky aktivovaná pomocou CYP1A4 a CYP1B1, na epoxidové intermediáty, ktoré sú následne premenené až na silný karcinogén 7,8-diol-9,10-epoxid (Shimada *et Fujii-Kuriyama*, 2004).

V mnohých prípadoch behom procesu metabolizmu zlúčenín sú ich lipofilné centrá pokryté hydrofilnými, čím sa látky stavajú rozpustnejšie vo vode, čo umožňuje ich elimináciu močom alebo žľuchou. Pokiaľ by tento proces v živých organizmoch chýbal, mnohé látky by vplyvom lipofilnej povahy ostávali v organizme dlhšie a ich pôsobenie by mohlo viesť k toxicite (Zhao *et al.*, 2021). Metabolizmus látok sa člení na tri fázy.

#### 3.1.1 Prvá fáza biotransformácie a účastniace sa enzýmy

V prvej fáze biotransformácie dochádza k vneseniu alebo odkrytiu polárnej skupiny v molekule metabolizovanej látky. Najdôležitejšie enzýmy prvej fázy biotransformácie jak endogénnych tak exogénnych zlúčenín patria do rodiny cytochróm P450 (CYPs) enzýmov. Nájdeme ich vo všetkých žijúcich organizmoch, nakoľko katalyzujú premenu nepolárnych zlúčenín na polárnejšie, ktoré sú tak jednoduchšie vylúčitelné (Foroozesh *et al.*, 2019).

Enzýmy CYP450 katalyzujú množstvo reakcií vrátane oxidácie, sulfoxidácie, aromatickej a alifatickej hydroxylácie, rôznych druhov dealkylácie a deaminácie.

Primárnou z nich je práve oxidácia, v ktorej dochádza k adícii jedného alebo viacerých atómov kyslíka k pôvodnému liečivu. Na oxidáciu je využitý molekulárny kyslík, z ktorého

jeden atóm enzým vloží do substrátu a druhý atóm kyslíka sa redukuje na molekulu vody. Zároveň CYP450 využíva dva elektróny, ktoré poskytne NADPH prostredníctvom reduktázového proteínu (Meunier *et al.*, 2004).

Viac ako 50 % liečiv na trhu je metabolizovaných enzýmom CYP3A4, ktorý hrá základnú rolu aj pri liekových interakciách. Liekové interakcie môžu mať priaznivé aj nepriaznivé následky pre pacienta. Priaznivé vtedy, keď jedna látka obsiahnutá v liečive môže urýchliť metabolizmus iného liečiva, a tým skrátiť dobu pôsobenia látky na daný organizmus (Ioannides, 1996). Naopak nepriaznivé vtedy, keď jedna látka môže spomaliť metabolizmus liečiva, a tým spôsobiť jeho akumuláciu v tele a toxicitu pre daný organizmus.

CYP3A4 má substrátovú špecifitu a inducibilitu podobnú transportéru liečiv P-glykoproteínu (Pgp). V podstate sa ich gény nachádzajú v rovnakej pozícii na rovnakom chromozóme (7q21.1) a taktiež využívajú rovnaké DR-4 regulačné elementy viažuce PXR (Ingelman-Sundberg, 2004).

Sekundárny enzymatický systém prvej fázy metabolizmu liečiv zastávajú NADH cytochróm-b5 reduktázy alebo NADPH cytochróm-c reduktázy. Ich hlavnou úlohou je redukovať pôvodné zlúčeniny, najmä aromatické nitro, nitrózo, azo a N-oxidové zlúčeniny. Prítomnosť a aktivita týchto enzýmov v rôznych stavoch je nevyhnutná na uskutočnenie biotransformačných reakcií, nakoľko regulujú funkciu práve vyššie spomínaných CYP450 (Almazroo *et al.*, 2017).

Okrem vyššie spomínaných enzýmov, poznáme aj ďalšie príklady enzýmov schopných metabolizovať endogénne aj exogénne molekuly. Spadajú sem flavín obsahujúce monooxygenázy, monoaminoxidázy, molybdénové hydroxylázy, alkoholdehydrogenázy, aldehyddehydrogenázy a mnoho iných (Khojasteh *et al.*, 2011).

### **3.1.2 Druhá fáza biotransformácie a účastniace sa enzýmy**

Enzýmy druhej fázy biotransformácie liečiv katalyzujú konjugačné reakcie, v ktorých dochádza k adícii ešte polárnejších funkčných skupín ako je glukuronát, sulfát, glutation alebo aminoskupina. Konjugačné reakcie vedú k vytvoreniu kovalentnej väzby medzi pridanou funkčnou skupinou a pôvodnou zlúčeninou alebo medzi pridanou funkčnou skupinou a prvou fázou upravenou zlúčeninou (Iyanagi, 2007). Medzi konjugačné enzýmy druhej fázy zaradíme uridín-5'-difosfoglukuronyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULT), glutation-S-transferázy (GST), N-acetyltransferázy (NAT) a mnoho ďalších (Almazroo *et al.*, 2017). Výsledkom konjugačných reakcií je tvorba vo vode rozpustných a farmakologicky neaktívnych metabolitov, ktoré je telo schopné vylúčiť (Iyanagi, 2007).

Najpodstatnejšou reakciou druhej fázy biotransformácie je glukuronidácia a približne 40-70 % zlúčenín je konjugovaných práve s glukurónidovými koncovými produktami (Wang *et al.*, 2005). UGTs sú členmi nadrodiny proteínov o molekulovej hmotnosti 50-60 kDa obsahujúce katalytickú a C-koncovú kotviacu doménu. Doteraz boli v ľudskom organizme identifikované 4 rodiny: UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8 (Almazroo *et al.*, 2017). Poznáme približne 22 izoforiem ľudských UGTs, no väčšina reakcii je katalyzovaná UGT1A, UGT2A a UGT2B. Princípom reakcie je reakcia glukózy-1-fosfátu s uridíntrifosfátom na tvorbu kofaktoru uridíndifosfátu glukurónovej kyseliny (UDPGA) preneseného do endoplazmatického retikula. V ňom pripája UGT tento kofaktor k vhodnému substrátu, a nukleofilnou reakciou vznikajú hydrofilnejšie glukuronidované zlúčeniny (Liu *et al.*, 2023).

### 3.1.3 Tretia fáza biotransformácie

Transportéry liečiv, čiže transmembránové proteíny umožňujú transport veľkých a ionizovaných molekúl medzi bunkami a von z nich. Transportéry tretej fázy sú klasifikované do dvoch hlavných skupín: kazetové transportéry viažuce ATP (ABC) a transportéry prenášajúce rozpustené látky (SLC).

ABC transportéry aktívne vychytávajú alebo odvádzajú liečivo z jednej strany bunkovej membrány na druhú až po spotrebe energie vo forme ATP. Naopak SLC transportéry uľahčujú prechod rozpustených látok ako napríklad cukrov cez membránu v spojení s inými rozpustenými látkami proti ich elektrochemickému gradientu. Vo všeobecnosti však vychytávacie transportéry prenášajú molekuly do buniek a efluxné transportéry sprostredkujú ich vylúčenie z buniek von (Almazroo *et al.*, 2017).

Najznámejším spomedzi transportérov tretej fázy biotransformácie je P-glykoproteín (Pgp). P-glykoproteín patrí medzi ATP-depedentné efluxné transportéry a kóduje ho gén MDR1 (ABCB1). Hlavnou úlohou P-glykoproteínu je prenos hydrofóbných zlúčenín zvnútra bunky na jej povrch a tým umožniť elimináciu týchto látok. Najčastejšie je exprimovaný práve v epitelových bunkách čriev, kde dochádza k stretu viacerých zlúčenín ako aj liečiv (Burk *et al.*, 2005). Indukcia alebo inhibícia práve črevného MDR1/Pgp je významným mechanizmom zodpovedným za interakcie liečiv (Fromm, 2004).

## 3.2 Pregnanový X receptor

Pregnanový X receptor, tiež známy ako steroidný X receptor (SXR) alebo aj pregnanom aktivovaný receptor (PAR), patrí k ligandom aktivovaným transkripčným faktorom (Zhang *et*

*al.*, 2008). Bol objavený v roku 1988 a na základe podobnosti s inými jadrovými receptormi bol zaradený do podrodiny jadrových receptorov (Kliewer *et al.*, 1998). Konkrétne zastáva miesto v podrodine NR1I receptorov, kam patria aj receptor pre vitamín D (VDR) alebo konštitutívny androstanový receptor (CAR). PXR receptor je exprimovaný vo vyššej miere v tenkom a hrubom čreve, pečeni, dvanástniku, žlčníku a v konečníku. V ostatných tkanivách a orgánoch je jeho obsah nízky alebo až nedetekovateľný (Xing *et al.*, 2020). PXR priamo reguluje expresiu enzýmov prvej fázy biotransformácie ako napríklad CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, enzýmov druhej fázy kam patria UGT1A1, UGT1A2 a SULT2A. Taktiež sa podieľa na regulácii expresie transportérov tretej fázy a to proteínu multiliekovej rezistencie 1 (MDR1) a proteínu 3 (MRP3), ktorý sa vyznačuje rezistenciou voči viacerým liekom (Zollner *et al.*, 2010).

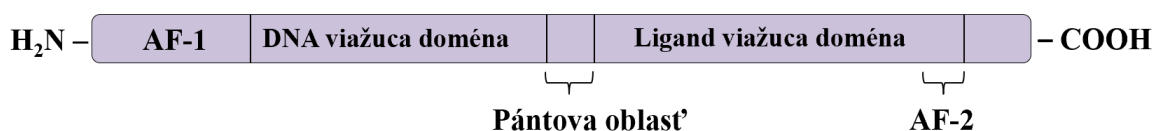
Je známych viacero variant transkriptu ľudského PXR. Medzi jednotlivými variantami sú rozdiely v transaktivačnej aktivite rôznych cieľových génov, no okrem toho varianty PXR1 a PXR2 majú dokonca odlišné miesta začiatku transkripcie. Pre m-RNA PXR1 je typické, že obsahuje nekódujúci exón 1a génu hPXR a do m-RNA je transkribovaných asi 4400 nukleotidov, ktoré sú preložené do proteínu s 434 aminokyselinami vďaka štartovaciemu kodónu CTG. Varianta PXR2 obsahuje exón 1b génu hPXR a do mRNA je transkribovaných 2800 nukleotidov, ktoré sú následne preložené do 473 aminokyselinového proteínu a to pomocou štartovacieho kodónu ATG (Brewer *et al.*, 2016).

### 3.2.1 Štruktúra

Ľudský PXR (hPXR) pozostáva z približne 434 aminokyselín a proteín ako taký je veľký 49,7 kDa. PXR je asi 40kb dlhý produkt NR1I2 génu lokalizovaného na dlhom ramienku tretieho chromozómu konkrétnejšie v oblasti 3q12-q13.3 (Skandalaki *et al.*, 2021).

Jadrové receptory, kam patrí aj študovaný PXR receptor zdieľajú spoločnú doménovú štruktúru (Kliewer *et al.*, 2002a). Obsahuje N-terminálnu doménu s aktivačnou funkciou od ligandu nezávislú (AF-1), DNA viažucu doménu (DBD), celkom krátku pántovú oblasť a ligand viažucu doménu (LBD), ktorá pozostáva z C-terminálnej domény s aktivačnou funkciou 2, ktorá je na ligande závislá (AF-2) (Obrázok 1) (Watkins *et al.*, 2001). DBD je silno konzervovaná oblasť o 70 aminokyselinách zložená z dvoch zinkových prstov. Jednotlivé zinkové prsty obsahujú štyri cysteínové zvyšky chelatujúce zinok (Kliewer *et al.*, 2002a). Cez LBD interaguje PXR s ligandom s cieľom stabilizovať proteín a taktiež umožňuje rekrutovať koregulátory do AF-2 oblasti, opäť k stabilizácii proteínu v komplexe s DNA (Brewer *et al.*, 2016). PXR obsahuje vysoko mobilné oblasti, vďaka ktorým môže meniť svoju konformáciu.

Rozšírením týchto oblastí sa na receptor dokážu naviazať aj väčšie molekuly ako napríklad rifampicín (Matic *et al.*, 2007).



Obrázok 1: Štruktúra jadrového receptora

### 3.2.2 Signalizácia

Vo väčšine prípadoch je PXR v absencii ligandu lokalizovaný v cytoplazme a až po naviazaní ligandu dochádza k jeho translokácii do jadra. Nedávne štúdie však dokazujú prítomnosť PXR v jadre aj bez naviazaného ligandu (Orans *et al.*, 2005).

Ak je v absencii ligandu PXR lokalizovaný v cytoplazme, tak sú na PXR naviazané korepresové proteíny (Rigalli *et al.*, 2021). Korepresory potláčajú exprimáciu génov a to mechanizmom asociácie s histónovými deacetylázami (Watson *et al.*, 2012). Ku korepresorom patrí jadrový receptorový korepresor (NCoR), mediátor utlmenia retinoidov a hormónov (SMRT) a iné. Interakcia s jadrovými receptormi vedie k deacetylácii histónov, kompaktii chromatínu a represii expresie génu. Po naviazaní ligandu do LBD sa spúšťa disociácia korepresorov a naväzujú sa koregulátory. Koregulátorové proteíny tvoria uzly, pomocou ktorých interagujú fyziologicky alebo patofyziologicky, čo nakoniec ovplyvní regulačnú funkciu PXR (Rigalli *et al.*, 2021). Medzi koregulátory PXR patria steroidné receptorové koaktivátory (SRCs), ktoré zahŕňajú SRC1, SRC2 a SRC3 (Rigalli *et al.*, 2021).

Po väzbe ligandu do LBD, dochádza k aktivácii PXR. Ten je translokovaný z cytoplazmy do jadra bunky, kde tvorí heterodimér s jadrovým receptorom kyseliny 9-cis retinovej (RXR) (Ihunnah *et al.*, 2011). Potom sa viaže na responzívne elementy v promótoroch a enhanceroch cieľových génov. Najčastejšie ide o priame opakovania 3 a 4 (DR3 a DR4) alebo evertované opakovania 6 (ER6) a viaže sa do konsenzuálneho motívu AG(G/T)TC(A/C) (Matic *et al.*, 2007). Takto aktivovaný PXR je schopný vyvolať bunkovú odpoveď na xenobiotiká a to indukciou enzýmov zapojených do oxidácie a konjugácie liečiv, rovnako tak aj s indukciou xenobiotických a endobiotických transportérov (Rosenfeld *et al.*, 2003).

### 3.2.3 Fyziologické a patologické procesy

V súčasnosti je PXR receptor pokladaný za jeden z najznámejších xenobiotických senzorov. Ako už bolo vyššie spomínané, svojou flexibilitou je schopný viazať množstvo terapeutických látok o rôznej veľkosti, štruktúry a účinku. Jednou z jeho fyziologických úloh, po aktivácii naviazaním ligandu, je upregulovať expresiu biotransformačných enzýmov a transportérov (Rigalli *et al.*, 2019). Touto reguláciou získava dôležitú fyziologickú funkciu, kedy chráni organizmus pred vysokými a stále sa zvyšujúcimi koncentráciami potenciálne toxických zlúčenín. Na jednej strane môže ísť o prospešnú funkciu pri zabránení absorpcie a zároveň podpory vylučovania toxických látok, no na druhej sa účastní sa aj interakcie medzi jednotlivými liečivami, ktoré môžu mať aj negatívny vplyv (Rigalli *et al.*, 2021). Aktivácia PXR vedie k indukcii expresie CYP3A4, P-glykoproteínu a iných enzýmov a transportérov biotransformácie, čo umožní mnoho klinicky významných interakcií medzi liečivami (Kliewer *et al.*, 2002a).

Moduláciou expresie významných enzýmov účastniacich sa distribúcie liekov a metabolizmu bola PXR receptoru pridelená hlavná úloha regulácie metabolizmu xenobiotík a endobiotík. Rovnako tak je aj spojený s bojom proti zápalu a udržaní homeostázy čriev (Dvořák *et al.*, 2020), s interakciou liečiv, detoxikáciou organizmu, metabolizmom vitamínov a žľových kyselín (Skandalaki *et al.*, 2021). Ukázalo sa, že sa účastní viacerých imunitných odpovedí (Venkatesh *et al.*, 2014), pri ochorení diabetes (Hukkanen *et al.*, 2014) ako aj pri rôznych druhoch rakovín (Planque *et al.*, 2016).

V dnešnej dobe neustále pribúdajú dôkazy, že aktivácia PXR má za následok reguláciu homeostázy glukózy. Rovnomerná koncentrácia glukózy v krvi je udržiavaná hormonálne a to tak, že tieto hormóny regulujú aktivitu kľúčových enzýmov metabolizmu glukózy (Lv *et al.*, 2022). Bolo dokázané, že aktivácia PXR inhibuje expresiu dvoch hlavných enzýmov, ktorými sú glukóza-6-fosfatáza (G6Páza) a fosfoenolpyruvátkarboxykináza (PEPCK) a tým dochádza k inhibícii glukoneogenézy (Bhalla *et al.*, 2004). G6Páza katalyzuje defosforyláciu glukózy-6-fosfátu, čo je finálny krok glukoneogenézy a glykogenolýzy. PEPCK1 je enzým, ktorý mení oxalacetát na fosfoenolpyruvát v glukoneogenéze. PXR reguluje glukoneogenézu aj interakciou s proteínom jedna zo skupiny „forkhead box“ (FOXO1), viažucim sa na element pre odpoveď na cAMP (CREB) a jadrovým faktorom hepatocytov 4 (HNF4), ktorý má s koaktivátorom PGC-1 $\alpha$  pozitívny vplyv na glukoneogenézu (Kodama *et al.*, 2004).

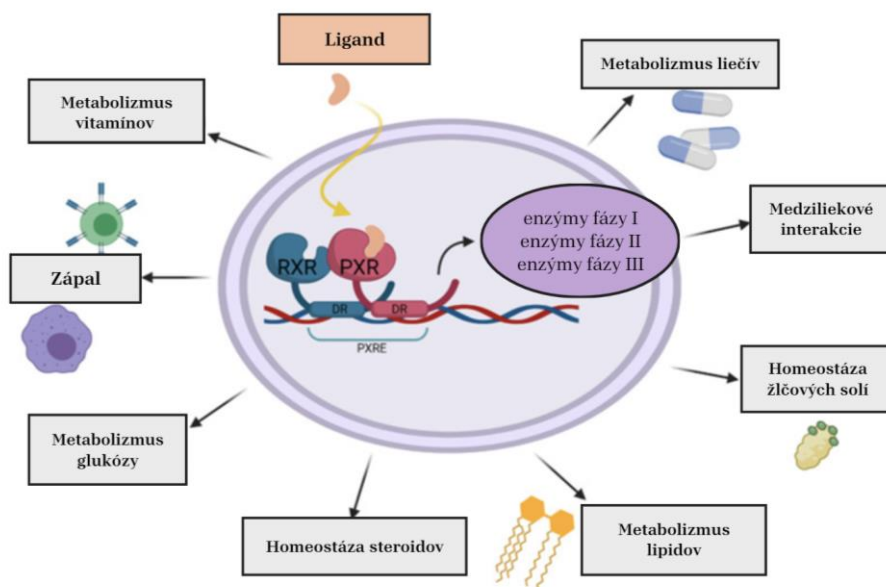
Produkcia žľových kyselín v pečeni súvisí s odbúraním cholesterolu a rozpúšťaním a transportom lipidov v črevách. Je však veľmi dôležité obsah žľových kyselín regulovať, pretože pri vysokej koncentrácii prejavujú toxicitu pre daný organizmus. Niektoré z nich ako

napríklad kyselina cholová alebo kyselina chenodeoxycholová formujú konjugáty s taurínom a glycínom a vo fyziologických koncentráciách sa viažu na PXR receptor (Kliewer *et al.*, 2002b). Rovnako tak sekundárna žľčová kyselina lithocholová (LCA) môže slúžiť ako ligand pre PXR (Staudinger *et al.*, 2001). Bolo dokázané, že PXR pôsobí ako fyziologický senzor LCA a jej metabolitov tak, že inhibuje CYP7A1. CYP7A1 blokuje syntézu žľčových kyselín a indukuje organický aniónový transportér 2 (OAT2), čím dochádza k zvyšovaniu vstrebávania LCA a iných žľčových kyselín do hepatocytov. V nich sú totiž tieto látky hydroxylované členmi CYP3A a stávajú sa pre telo jednoduchšie vylúčiteľné (Jonker *et al.*, 2012).

Nedávne štúdiá dokazujú účasť PXR receptoru v zápalových ochoreniach čriev (IBD). Aktivácia PXR všeobecne inhibuje signalizáciu NF- $\kappa$ B a tým potláča zápal. NF- $\kappa$ B je teda kľúčový regulátor zápalu a s ním súvisiacu imunitnú odpoveď (Zhou *et al.*, 2006). Tým sa dokazuje priame prepojenie medzi PXR a liekovým antagonizmom NF- $\kappa$ B (Xie *et al.*, 2006). PXR bol identifikovaný ako gén, ktorý je silno spojený s náchylnosťou na zápalové ochorenie čriev aj u ľudí (Dring *et al.*, 2006). Zápalové ochorenie čriev je chronické ochorenie tráviaceho traktu, ktorý sa delí do dvoch hlavných typov, ulcerózna kolitída a Crohnova choroba. Rozdiel je len v tom, že ulcerózna kolitída postihuje len hrubé črevo, no Crohnova choroba sa môže vyskytnúť hlavne v tenkom a hrubom čreve, ale v podstate v celej časti gastrointestinálneho traktu. U pacientov so zápalovým ochorením čriev sa pozorovalo zníženie expresie PXR a jeho cieľových génov (Langmann *et al.*, 2004). Podrobnejšia identifikácia úlohy PXR pri zápalových ochoreniach čriev by mohla prispieť k zisteniu terapeutickú stratégiu pre zápalové ochorenia čriev.

PXR hrá dôležitú rolu aj pri rakovinových ochoreniach. Štúdiá dokazujú, že aktiváciou PXR receptoru môžeme pozorovať pokles v počte rakovinových buniek. Princípom je napríklad zvýšenie hladiny inhibítora cyklín-depedentnej kinázy (CDK) označovaného p21, ktorý reguluje rast rakovinových buniek v hrubom čreve (Ouyang *et al.*, 2010). Rovnako tak bola dokázaná aj tumor-supresívna funkcia PXR. V rakovinových bunkách neuroblastómu boli gény PXR metylované a tým pádom bol PXR neaktívny, čo viedlo k rakovinovému bujneniu. Po demetylácii génov bola obnovená tumor-supresívna funkcia PXR, čo malo pozitívny vplyv na liečbu (Misawa *et al.*, 2005). Z vyššie uvedených informácií je jasné, že PXR plní v organizme množstvo dôležitých úloh a niektoré z nich sú uvedené v Obrázku 2.





Obrázok 2: Pôsobenie a funkcie pregnanového X receptora

Upravené podľa (Skandalaki *et al.*, 2021)

### 3.2.4 Ligandy PXR

Ligandy pre pregnanový X receptor (PXR) sú prírodného aj syntetického pôvodu a môžeme sem zaradiť endobiotiká ako aj xenobiotiká (Tabuľka 1). Medzi endogénne ligandy zaradíme steroidy ako  $5\beta$ -pregnán-3,20-dion, 17-OH progesteron (Kliwer *et al.*, 1998) a estradiol (Jones *et al.*, 2000), antiglukokortikoid pregnenolón  $16\alpha$ -karbonitril (PCN) (Heuman *et al.*, 1982), ďalej produkty degradácie lipidov žľčovú kyselinu ako napríklad kyselinu lithocholovú a jej derivát kyselina 6-hydroxylitocholovú (Staudinger *et al.*, 2001).

V posledných štúdiách bolo dokázané, že aj indoly a ich deriváty ako napríklad indol-3-propionová kyselina (IPA) a indol-3-octová kyselina (IAA) sú aktívnymi endogénnymi ligandami pre ľudský aj myšší pregnanový X receptor (Venkatesh *et al.*, 2014). Vývojom syntetických napodobenín mikrobiálnych indolov, je teda možné zvýrazniť väzbu indolových derivátov na receptory, medzi ktoré patrí aj PXR a tým potlačiť až odstrániť črevný zápal (Dvořák *et al.*, 2020).

Agonisti PXR spomedzi xenobitík sú protinádorové lieky, ako tamoxifén a taxol, známe antibiotikum rifampicín (RIF), látka hyperforín (Orans *et al.*, 2005), antibiotikum rifaximín (Ma *et al.*, 2007), inhibítor HIV proteázy ritonavir (Dussault *et al.*, 2001), antimykotikum clotrimazol, ďalej glukokortikoid dexametazon či liek na zníženie cholesterolu lovastatín

(Lehmann *et al.*, 1998), antineoplastický liek cyklofosfamid, endokrinné lieky cyproterónacetát a RU486 (Zhang *et al.*, 2008).

Poznáme aj slabo aktivujúce exogénne ligandy PXR, ktoré sú získané z potravy a zaradujeme sem vitamín E (Landes *et al.*, 2003) a vitamín K (Tabb *et al.*, 2003).

Medzi látky aktivujúce PXR patria taktiež mnohé enviromentálne polutanty ako napríklad bisfenol A, dietylhexylftalát alebo nonylfenol (Masuyama *et al.*, 2000; Takeshita *et al.*, 2001). Všetky vyššie spomínané látky sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Príklady endogénnych a exogénnych ligandov PXR

<b>TYP LIGANDU</b>	<b>POVAHA</b>	<b>LIGAND</b>
<b>ENDOGENNY</b>	<b>Steroidy</b>	5 $\beta$ -pregnán-3,20-dion
		estradiol
		17-OH progesteron
		pregnenolón 16 $\alpha$ -karbonitril
	<b>Metabolity typtofánu</b>	indol-3-propionová kyselina
		indol-3-octová kyselina
	<b>Žlčové kyseliny</b>	kyselina lithocholová
		kyselina 6-OH-lithocholová
<b>EXOGENNY</b>	<b>Liečivá</b>	tamoxifén
		taxol
		rifampicín
		hyperforín
		rifaximín
		clotrimazol
		dexametazon
		lovastatín
		cyklofosfamid
		cyproteronacetát
		RU486
		ritonavir
	<b>Enviromentálne polutanty</b>	bisfenol A
		dietylhexylftalát
		nonyfenol
	<b>Vitamíny</b>	vitamín E
		vitamín K

### 3.3 Receptorová teória

Receptorová teória popisuje interakcie medzi receptorom, ligandom a výslednou bunkovou odpoveďou. Tradičná receptorová teória liečiv sa postupne vyvíjala od roku 1935 a jej základom pomohli koncepcie opísané v prácach prvých farmakológov: Clark, Ariëns, Stephenson a Furchgott a iných (Kenakin, 2013). Za zakladateľa receptorovej teórie však môžeme považovať Johna Newporta Langleyho, ktorý ako prvý popísal jej princíp v roku 1905 (Ritter *et al.*, 2019).

Dôležitými charakteristikami každého ligandu sú afinita k danému receptoru a vnútorná aktivita. Afinita opisuje schopnosť viazať sa na receptor a je jedinečná pre každý pár liečivo-receptor, pretože závisí na ich štruktúrach. Rôzna afinita pre rôzne subtypy receptorov umožňuje selektivitu receptorov (Berg *et Clarke*, 2018). Hoci afinita nasmeruje liečivo na receptor, neurčí však aké funkčné dôsledky vyplývajú z tejto interakcie. K upresneniu teda slúži pojem vnútorná aktivita, ktorá popisuje účinok liečiva na aktivitu receptoru. Aktivita receptoru ďalej môže viesť k zmenám v bunkovej aktivite. Vnútorná aktivita je rovnako ako afinita špecifická konštanta, závisiaca od štruktúry liečiva a receptoru a je teda špecifická pre každý pár liečivo-receptor (Berg *et Clarke*, 2018). Naviazanie ligandu alebo liečiva môže ale nemusí viesť k aktivácii receptora. Z toho vyplýva, že väzba a aktivácia predstavujú dva rozličné kroky pri generovaní výslednej odpovede. Ak sa liek na receptor naviaže a zároveň vyvolá tkanivovú odpoveď hovoríme o agonizme. Naopak, ak sa liečivo na receptor naviaže, avšak nevyvolá žiadnu odpoveď, čiže iba zabráni naviazaniu agonistu, vtedy hovoríme o antagonizme (Ritter *et al.*, 2019).

#### 3.3.1 Agonizmus

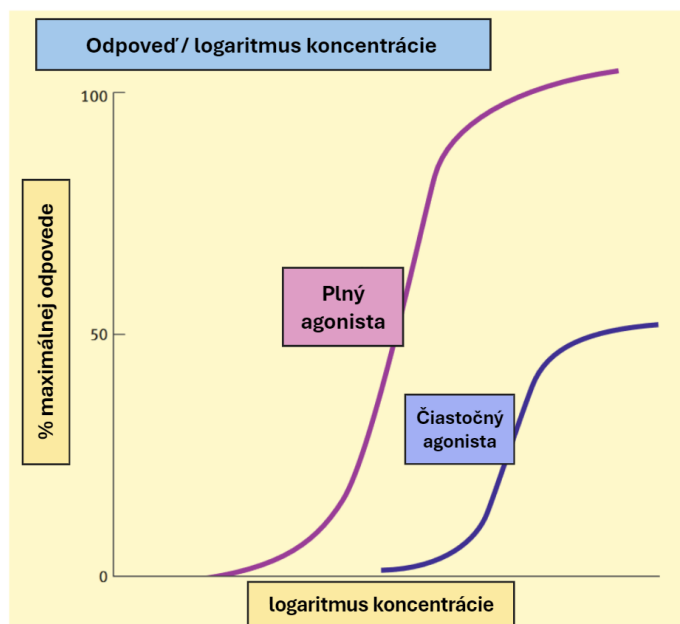
Agonistom je látka viažuca sa na receptor, ktorý aktivuje a vyvolá v bunkách odpoveď. Látky pôsobiace agonisticky môžu mať rôznu účinnosť. Tá popisuje ako moc sa môžu agonisti líšiť v odpovedi, ktorú produkujú aj keď obsadia rovnaký počet receptorov. Podľa tohoto kritéria rozdeľujeme látky na plných a čiastočných agonistov.

Plný agonista dokáže vyvolať najväčšiu odpoveď, akú mu je miesto pôsobenia poskytnúť. Plným agonistom je liek, ktorého účinnosť je dostatočná na vyvolanie maximálnej odpovede aj v prípade, keď je obsadených menej ako 100 % receptorov (Ritter *et al.*, 2019).

Naopak čiastočný agonista nedokáže plne aktivovať receptory, čiže nevyvolá maximálnu odpoveď a to ani pri vyššej koncentrácii a plnej obsadenosti receptorov (Pleuvry,

2004). Inak povedané, látka označovaná ako čiastočný agonista má nižšiu účinnosť, takže 100% obsadenie receptorov vyvolá len submaximálnu odpoveď (Ritter *et al.*, 2019).

Vzťah koncentrácia-odpoveď schematicky zvyčajne pozorujeme ako hyperbolu. Ak je tento vzťah preformulovaný ako odpoveď-logaritmus koncentrácie, potom sa obvykle pozoruje sigmoidná krivka (Obrázok 3).



Obrázok 3: Schéma vzťahu pôsobenia plného a čiastočného agonistu  
Upravené podľa (Pleuvry, 2004).

Zistilo sa, že existujú prípady, kedy dochádza k aktivácii receptora aj bez prítomnosti aktivujúceho ligandu. Receptory vtedy preukazujú svoju konštitutívnu aktivitu. Ak ligand znižuje úroveň konštitutívnej aktivácie a vyvoláva opačný účinok ako agonista, hovoríme o inverzných agonistoch. Tí môžu byť považovaní za látky s negatívnou účinnosťou. Na rozdiel od neutrálnych agonistov, ktorí majú pozitívnu účinnosť, a na rozdiel od neutrálnych antagonistov, ktorí majú nulovú účinnosť (Nutt *et al.*, 2017).

### 3.3.2 Antagonizmus

Látky a liečivá síce s afinitou k receptoru, ale nulovou vlastnou účinnosťou, ktoré nevyvolajú žiadnu odpoveď, sa nazývajú antagonisty. V prítomnosti antagonistu je obsadenie receptorov agonistom redukované a s tým súvisí aj zníženie odpovede.

Poznáme dva základné typy inhibície reverzibilnú a ireverzibilnú a podľa účinku sa členia ďalej na kompetitívnu a nekompetitívnu.

Pokiaľ ide o reverzibilné naviazanie, antagonista sa viaže na rovnaký receptor ako agonista, nevyvolá žiadnu odpoveď, ale zvýšením koncentrácie agonistu sa účinok antagonistu vyruší. Ireverzibilné naviazanie sa vo väčšine prípadov nedá zvrátiť. Ak sa neprekonateľný antagonista raz kovalentne naviaže, tak ani po zvýšení koncentrácie agonistu ho agonista nedokáže vytlačiť. Ireverzibilný účinok je možné zvrátiť pridaním konkurenčných agonistov ešte predtým ako sa vytvorí kovalentná väzba (Pleuvry, 2004). V prítomnosti kompetitívneho antagonistu je v danej koncentrácii znížená obsadenosť receptora agonistom, pretože na receptore je naviazaný práve antagonista. Avšak, pretože navzájom súperia o miesto na receptore, zvýšenie koncentrácie agonistu môže obnoviť obsadenie receptora prevažne agonistom a tým sa obnoví tkanivová odpoveď (Ritter *et al.*, 2019). Nekompetitívny antagonista sa viaže na alosterické miesto receptora, ktoré je nezávislé od viazania agonistu. Po naviazaní na receptor alebo receptor-agonista komplex dochádza k zabráneniu prejavu tkanivovej odpovedi. Výsledné zníženie aktivity receptora je nezávislé od koncentrácie agonistu, pretože inhibítor a agonista nesúperia o naviazanie na aktívne miesto receptora (Delaune *et Alsayouri*, 2024)

### 3.4 Študované monoterpenoidy

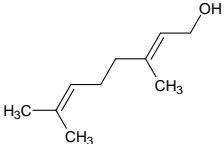
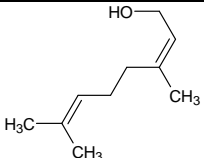
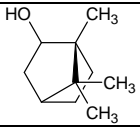
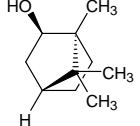
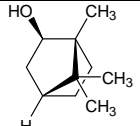
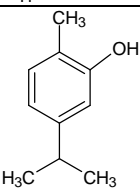
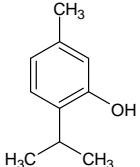
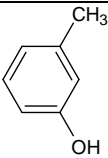
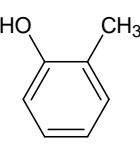
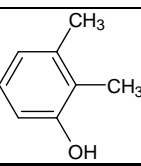
Terpény tvoria rozsiahlu skupinu sekundárnych metabolitov a nachádzajú sa vo viac ako 50 000 zmesí (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2019). Ich molekuly sa skladajú z dvoch alebo viacerých, reťazovo spojených molekúl izoprénu. Vzhľadom k nízkej molekulovej hmotnosti sa jedná o látky lipofilného charakteru nachádzajúce sa v esenciálnych olejoch rastlín (Zielińska-Błajet *et Feder-Kubis*, 2020).

Prírodné esenciálne alebo éterické oleje sú definované ako aromatické olejnaté kvapaliny, ktoré môžu byť extrahované z rôznych častí rastlín, ako napríklad listy, kôra, kvety, puky, semená a iné. Tieto koncentrované, hydrofóbne kvapaliny pozostávajú hlavne z terpénov, éterov, esterov, alkoholov, aldehydov, uhľovodíkov, karboxylových kyselín a mnoho ďalších. Z vyššie spomenutých rastlinných materiálov môžu byť získané destiláciou, lisovaním, extrakciou, zberom živice a podobne. V dnešnej dobe sa esenciálne oleje využívajú hlavne v kozmetike, potravinárstve a už aj v medicínskych aplikáciách ako napríklad v aromaterapii či ako antiseptiká (Bartoňková *et Dvořák*, 2018). Mimo antibakteriálnych účinkov boli dokázané aj protivírusové, antimykotické a antiparazitické pôsobenie EOs (Burt, 2004).

Terpény sa členia podľa počtu spojených izoprénových jednotiek na hemiterpény, pozostávajúce z jednej izoprénovej jednotky, monoterpény (2), seskviterpény (3), diterpény (4) a polyterpény (n). Terpenoidy sú deriváty terpénov vyznačujúce sa prítomnosťou prídavných skupín alebo reťazcov k samotnému terpénu. V tejto práci sa zameriame predovšetkým na monoterpény, konkrétne monoterpenoidy.

Monoterpenoidy môžu existovať ako cyklické, acyklické ale aj bicyklické. Množstvo z nich má antibakteriálne, protizápalové, antioxidantné analgetické a farmakologické účinky (Zielińska-Błajet *et* Feder-Kubis, 2020). Zlúčeniny patriace do tejto skupiny látok sú zaujímavé svojou výraznou vôňou, vďaka čomu sú využívané v kozmetickom aj farmaceutickom priemysle (Perveen, 2018). V tejto práci boli v experimentoch testované aromatické, bicyklické a alifatické monoterpenoidy uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Vybrané monoterpenoidy spolu s ich identifikačnými údajmi a štruktúrnym vzorcom.

NÁZOV	CAS ČÍSLO	KATALÓGOVÉ ČÍSLO	ZARADENIE	ŠTRUKTÚRA
GERANIOL	106-24-1	sc-235242	Alifatické	
NEROL	106-25-2	sc-234382	Alifatické	
R-(+)-BORNEOL	464-43-7	420247	Bicyckické	
S-(-)-BORNEOL	464-45-9	139114	Bicyckické	
IZOBORNEOL	124-76-5	I13901	Bicyckické	
KARVAKROL	499-75-2	282197	Aromatické	
TYMOL	89-83-8	T0501	Aromatické	
M-KREZOL	108-39-4	C85727	Aromatické	
O-KREZOL	95-48-7	C85700	Aromatické	
2,3-DIMETYLFENOL	526-75-0	D174009	Aromatické	



### 3.5 Vplyv terpenoidov na jadrové receptory

Terpény, hlavne monoterpény a seskviterpény patria medzi najčastejšie vyskytujúce sa zlúčeniny v esenciálnych olejoch (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014). Deriváty terpénov, terpenoidy, čiže zlúčeniny zložené z terpénov s naviazaným kyslíkom, boli tiež identifikované ako súčasť éterických olejov. V nedávnych štúdiách bol dokázaný vplyv niektorých zložiek EOs na aktivitu jadrových receptorov.

Jadrové receptory aktivované peroxizómovými proliferátormi (PPARs) sú zapojené v kontrole expresie enzýmu cyklooxygenázy 2 (COX-2), ktorá, hrá rolu v biosyntéze prostaglandínu a zápalových procesoch. Pôsobením esenciálnych olejov z tymiánu, klinčekov, ruže a eukalyptu bola inhibovaná aktivita promotora COX-2. Okrem toho, karvakrol, hlavná zložka tymiánového oleja, pôsobil inhibične na promotorovú aktivitu COX-2, závislú od PPARs (Hotta *et al.*, 2010).

Ďalšími látkami sú (+)-borneol a (-)-borneol, u ktorých bola pozorovaná inhibícia funkcie P-glykoproteínu ako jedného z transportérov tretej fázy biotransformácie a tým dochádza k akumulácii protinádorových liečiv v bunkách (Yang *et al.*, 2021). Izoborneol bol testovaný použitím PXR-CYP3A4 stabilne transfekovanej ľudskej bunkovej línie HepG2 na možnú aktiváciu CYP3A4 enzýmov. Výsledná indukcia izoborneolom bola vyššia než indukcia modelovým rifampicínom (Xiao *et al.*, 2014).

Taktiež bolo dokázaný účinok karvakrolu a tymolu ako zložiek esenciálnych olejov na transkripčnú aktivitu jadrového aryl uhlovodíkového receptora (AhR) v ľudskej nádorovej bunkovej línii AZ-AhR. AhR bol aktivovaný pomocou modelového ligandu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxínu (TCDD). Karvakrol a tymol, obsiahnuté v tymiánovom a oregánovom oleji, silne inhibujú TCDD-indukovanú aktivitu AhR a sú považovaní za čiastočných agonistov AhR (Bartoňková *et* Dvořák, 2018).

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Biologický materiál

V tejto bakalárskej práci bola použitá adherentná bunková línia LS 180 (ECACC, kat. č. 87021202) odvodená od karcinómu hrubého čreva. Táto línia bola kultivovaná v Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM) s prídavkom 5 ml L-glutamínu, 5 ml neesenciálnych aminokyselín, 5 ml roztoku antibiotík penicilín/streptomycín a 50 ml fetálneho bovinného séra. Kultivácia prebiehala v inkubátore pri 37 °C za prítomnosti 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti.

### 4.2 Použité plazmidy

Pre účely tejto bakalárskej práce boli použité dva plazmidové konštrukty. Expresný vektor pSG5-hPXR nesúci gén pre ľudský PXR (Dvořák *et al.*, 2020) a reportérový vektor p3A4-luc (Novotná *et al.*, 2014).

### 4.3 Použité chemikálie, sady a roztoky

- 0,04% roztok trypanovej modrej v H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, kat. č. T6146)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, kat. č. T4049)
- Dimetylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich, kat. č. )
- 1x Fosfátový pufr bez Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> ( 1x PBS, BioConcept, kat. č. 3-05F29-I)
- FUGENE HD (Promega, kat. č. E231A)
- Izopropyl alkohol (Lach-ner, kat. č. 603-117-00-0)
- Triton X-100 (Serva, kat.č. 37240)
- Kultivačné médium DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom:
  - 5 ml L-glutamínu (Biosera, kat. č. XC.T1715)
  - 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)

- 5 ml roztoku antibiotík penicilín/streptomycín (VWR International , kat. č. 392-0406)
- 50 ml fetálneho bovinného séra (FBS; Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, kat. č. F7524)
- Kultivačné médium DMEM-CS: Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom:
  - 5 ml L-glutamínu (Biosera, kat. č. XC.T1715)
  - 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)
  - 5 ml roztoku antibiotík penicilín/streptomycín (VWR International , kat. č. 392-0406)
  - 50 ml hormonálne inaktivovaného fetálneho bovinného séra (FBS-CS; Fetal Bovine Serum Charcoal Stripped, Sigma-Aldrich, kat. č. F6765)
- Lyzačný pufr (Reporter Lysis 5x Buffer; Promega, kat. č. E397A)
- Metyltetrazoliová soľ (MTT, Sigma-Aldrich, kat. č. M2128)
- Rifampicín (RIF, Sigma-Aldrich, kat. č. R3501)
- Substrát pre luciferázu pripravovaný na objem 300 ml:
  - 12,3 mg/66 µl 0,5M kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA, Sigma-Aldrich, kat. č. E9884)
  - 13,2 ml 1M Tris-acetát pufr (pH 7,8) (BioBasic Inc., kat. č. TB0194)
  - 50 mg D-luciferín (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-207478)
  - 50 mg koenzým A (CoA, Sigma-Aldrich, kat. č. C3144)
  - 100 mg adenosín-5'-trifosfát (ATP, Sigma-Aldrich, kat. č. A9062)
  - 30,3 mg/12,3 ml 100mM heptahydrát síranu horečnatého (Lach:ner, kat. č. 30175-AP0)
  - 1,68 g ditiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, kat. č. 43819)
  - doplnené do 300 ml deionizovanou vodou

- Súprava na izoláciu plazmidovej DNA QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, kat.č.12243)
- Testované terpenoidy:
  - tymol (Sigma-Aldrich, kat. č. T0501)
  - R-(+)-borneol (Sigma-Aldrich, kat. č. 420247)
  - S-(-)-borneol (Sigma-Aldrich, kat. č. 139114)
  - izoborneol (Sigma-Aldrich, kat. č. I13901)
  - karvakrol (Sigma-Aldrich, kat. č. 282197)
  - o-krezol (Sigma-Aldrich, kat. č. C85700)
  - m-krezol (Sigma-Aldrich, kat. č. C85727)
  - geraniol (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-235242)
  - nerol (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-234382)
  - 2,3-dimetylphenol (Sigma-Aldrich, kat.č. D174009)

#### **4.4 Laboratórne pomôcky**

- 96-jamkové biele dosky na meranie luminiscencie (NUNC)
- 96-jamkové kultivačné dosky (TPP)
- Automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5  $\mu$ l, 10 – 100  $\mu$ l, 20 – 200  $\mu$ l, 100 – 1000  $\mu$ l (Eppendorf)
- Buničina (Tork)
- Bürkerova komôrka (Assistent)
- Krycie sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser)
- Mikroskúmavky o objemoch 0,5 ml, 1,5 ml, 5 ml (Eppendorf)
- Multikanálové pipety v rozsahu 0,5 – 10  $\mu$ l, 10 – 100  $\mu$ l, 30 – 300  $\mu$ l (Eppendorf)
- Nastaviteľná elektronická pipeta (Eppendorf)
- Nastaviteľná multikanálová pipeta 15 – 300  $\mu$ l (Eppendorf)
- Petriho misky o objeme 60 ml (TPP)
- Pipetor FastPette (Labnet)

- Plastové falkonové skúmavky o objemoch 15 ml a 50 ml (TPP)
- Plastové kultivačné fľaše 75 ml a 150 ml (TPP)
- Plastové stojany na zkumavky a mikrozukavky
- Plastové špičky v rozsahu 0,1 – 10  $\mu$ l, 2 – 200  $\mu$ l, 20 – 300  $\mu$ l, 100 – 1000  $\mu$ l (Eppendorf)
- Sterilné sérologické pipety o objemoch 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (SPL life sciences)

## 4.5 Prístroje

- Aspirátor FTA-1 (Biosan)
- Digitálne váhy ABS 80–4 (Kern)
- Hlbokomraziaci box MDF-U53V (Sanyo)
- Chladnička (Whirlpool)
- Inkubátor s kultivačnou trepačkou TH 30 (Edmund Bühler GmbH)
- Laboratórny CO<sub>2</sub> inkubátor NB-203 XL (N-Biotek)
- Laminárny box Labculture (ESCO)
- Multifunkčný modulárny reader Infinite M200 (Tecan)
- NanoDrop Lite SN 0499 (ThermoFisher Scientific)
- Svetelný mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- Trepačka Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)
- Vodný kúpeľ LCB 11D (Daihan Labtech)
- Vortex Reax top (Heidolph)

## 4.6 Použité metódy

### 4.6.1 Kultivácia a pasážovanie buniek

Bunkové kultúry patria v dnešnej dobe medzi najčastejšie používané biologické modely využívané vo výskume. Ich kultivácia si vyžaduje špecifické podmienky a vybavenosť laboratória. Mnou bola používaná bunková kultúra LS 180. Pred každým experimentom je potreba bunky spásážovať. Pasážovanie je proces oddelenia buniek z povrchu kultivačnej nádoby a nasleduje rozdelenie buniek v zhlukoch na jednotlivé bunky. Táto metóda je vykonávaná za prísne sterilných podmienok v laminárnom boxe, aby nedošlo ku kontaminácií bunkovej kultúry a média.

Pasážovanie bolo vykonávané každé 3 – 4 dni aby mohol byť vykonaný experiment a aby sa zabránilo premnoženiu buniek. Postup tejto metódy pri použití 150ml kultivačnej nádoby pozostáva s odsatia zvyšného média aspirátorom, nasleduje opláchnutie adherovaných buniek 5 ml 1x PBS a opätovné vysatie do sucha. Následne je potreba bunkovú líniu uvoľniť z dna kultivačnej nádoby do média, k čomu slúži 1 ml trypsínu, ktorý je aktivovaný inkubáciou po dobu 5 minút pri 37 °C za prítomnosti 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti. K bunkám uvoľneným z podkladu je pridaných 9 ml DMEM média a nasávaním a spätným vypúšťaním sú rozdelené na jednotlivé bunky, ktoré sú vhodné na prípravu experimentu. Celá suspenzia je prenesená do 15ml centrifugačnej skúmavky a časť z nej je vrátená do kultivačnej nádoby spolu s 18 ml DMEM média. Kultivačná nádoba je umiestnená naspäť do inkubátora. V prípade následného vysievania buniek na experiment, je odobraných 10 µl suspenzie k počítaniu buniek.

#### **4.6.2 Počítanie a vysievanie buniek na experiment**

Počet buniek v získanej suspenzii bol určený pomocou Bürkerovej komôrky a trypanovej modrej a následnému počítaniu živých buniek vo svetelnom mikroskope. Princíp spočíva v tom, že mŕtve bunky majú na rozdiel od živých narušenú cytoplazmatickú membránu, cez ktorú sa trypanová modrá dostane do vnútra bunky a mŕtve bunky tak majú modré sfarbenie. Do živých buniek sa toto farbivo nedostane, čo nám umožní odlíšiť živé bunky od mŕtvych a určiť ich koncentráciu v zásobnej suspenzii.

K 10 µl bunkovej suspenzie je pridaných 90 µl trypanovej modrej a oba roztoky boli pipetou spolu premiešané. Bürkerova komôrka bola pripravená prikrytím nanášacích plôch krycím sklíčkom a medzi tieto dve sklá bola pridaná zmes bunkovej suspenzie s farbivom. Následne sú bunky počítané vo svetelnom mikroskope v celkom 10tich zorných poliach Bürkerovej komôrky. Hodnoty boli spočítané a bol vypočítaný aritmetický priemer. Počet buniek bol prepočítaný na 1 ml bunkovej suspenzie. K vysatiu buniek na 96-jamkovú dosku je potreba počet buniek prepočítať tak, aby v každej jamke bolo približne 30 000 buniek a v každej jamke musí byť napipetovaných 200 µl bunkovej suspenzie zriedenej DMEM médiom.

#### **4.6.3 Príprava a aplikácia látok a jednotlivých kontrol**

Zásobné roztoky vybraných monoterpenoidov boli pripravené navážením presného množstva daných látok, ktoré boli rozpustené v etanole (99,8%) tak, aby vzniklo 300 µl zásobných roztokov o koncentráciách uvedených v Tabuľke 3. Tieto roztoky boli pri aplikácii látok na 96-jamkové dosky zriedené 1000x použitím DMEM média na koncentrácie uvedené

tiež v Tabuľke 3. Pre tymol a karvakrol boli pripravené ešte zásobné roztoky 250 mM a 500 mM, nakoľko boli veľké rozdiely v cytotoxicite týchto látok v najvyšších koncentráciách. Použité látky sa radia medzi svetlolabilné a z tohto dôvodu boli zásobné roztoky pripravené do čiernych pre svetlo nepriepustných 1,5ml mikroskúmaviek a pracovalo sa s nimi v zhasnutom laminárnom boxe.

Tabuľka 3: Koncentrácie zásobných a zriedených roztokov vybraných monoterpenoidov

ZÁSObNÉ ROZTOKY	1000x ZRIEDENÉ ROZTOKY
0,1 $\mu$ M	0,1 nM
1 $\mu$ M	1 nM
10 $\mu$ M	10 nM
100 $\mu$ M	100 nM
1 mM	1 $\mu$ M
10 mM	10 $\mu$ M
100 mM	100 $\mu$ M
1000 mM	1000 $\mu$ M

#### 4.6.4 MTT test

Za účelom zistenia ich životaschopnosti prebiehalo vyhodnotenie pomocou MTT testu. MTT test spočíva vo vyhodnotení správnej funkcie mitochondriálnych dehydrogenáz. MTT test slúži k testovaniu cytotoxicity látok a s ňou spojenou vitalitou buniek. Princípom MTT testu je redukcia žltej tetrazóliovej soli MTT na fialový formazánový derivát, ktorý tvorí fialové kryštálíky vnútri buniek. Po pridaní detergentu alebo inej látky narušujúcej integritu cytoplazmatickej membrány sú fialové kryštály uvoľnené z buniek a rozpustené. Test sa vyhodnocuje fotometricky.

Pri MTT teste boli látky aplikované vždy v pentaplikáte, a preto bolo do 1,5ml mikroskúmavky pridaných 1,1 ml DMEM média a 1,1  $\mu$ l látky o určenej koncentrácii a roztok bol premiešaný prevrátením mikroskúmaviek. Následne bolo do každej predom odsatej jamky pipetovaných 200  $\mu$ l zriedenej látky od najnižšej po najvyššiu koncentráciu v pentaplikáte. Na rovnakej 96-jamkovej doske boli použité aj kontroly v pentaplikátoch. Pozitívnu kontrolou bol Triton-X100, ktorý bol zriedený z 20% na 2% zmiešaním 2,7 ml DMEM média a 300  $\mu$ l 20% Tritonu-X100. Negatívnu kontrolu prezentovalo samotné DMEM médium. Dosky boli inkubované pri 37 °C za prítomnosti 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % vlhkosti po dobu 24 hodín.

Pred zahájením experimentu bol ako prvé pripravený zásobný roztok MTT o koncentrácii 3 mg/ml rozpustením 150 mg metyl-tetrazóliovej soli v 50 ml deionizovanej vody. Z neho bol pred každým ďalším experimentom pripravený roztok s výslednou koncentraciou 0,3 mg/ml. Napríklad pre dve 96-jamkové dosky zmiešaním 3 ml MTT

o koncentrácii 3 mg/ml a 27 ml DMEM média. Následne boli 96-jamkové dosky boli vyklepnuté do výlevky a boli vysušené poklepaním o buničitú vatú. Do jamiek, kde boli aplikované látky, bolo pridaných 100 µl zriedeného MTT a dosky boli následne inkubované pri 37 °C minimálne 20 minút až do modro-fialového zafarbenia adherovaných buniek. Zvyšný roztok z jamiek bol vyklepnutý do výlevky a dosky boli osušené o buničitú vatú. Následne bolo podľa intenzity sfarbenia napipetovaných 40 – 80 µl DMSO tak, aby namerané hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 570 nm boli v rozmedzí nad 0,2 avšak nesmeli dosahovať hodnoty 1,0. Čím vyššie boli namerané hodnoty absorbancie v jednotlivých jamkách, tým viac buniek v nich bolo bez porušenia funkcie mitochondriálnych enzýmov.

#### 4.6.5 Izolácia plazmidovej DNA

Pred samotnou transientnou transfekciou bola nutná izolácia požadovaných plazmidov. Bakteriálna kultúra *Escherichia coli* bola inkubovaná cez noc pri 37 °C v inkubačnej trepačke a následne bola prevedená izolácia pomocou QIAfilter Midi Kitu (Qiagen). Celý objem bakteriálnej kultúry bol prenesený do centrifugačnej skúmavky a centrifugovaný pri 6000 g pri 4 °C po dobu 15 minút. Supernatant bol vyliaty a pelet bol rozpustený v 4 ml pufru P1. Následne boli pridané 4 ml pufru P2 a jemným preklápaním skúmavky boli roztoky medzi sebou premiešané. Pokračovala inkubácia pri izbovej teplote po dobu 5 minút a roztok zmenil farbu na modrú. Počas inkubovania bol pripravený stojan a kolóna na izoláciu, ktorá bola aktivovaná 4 ml pufru QBT. K modrej suspenzii boli pridané 4 ml pufru P3 aby došlo k rovnomernej lýze buniek bola skúmavka niekoľkokrát prevrátená až kým nebol roztok číry s malými zhlukmi. Lyzát bol premiestnený do striekačky, kde bol inkubovaný 10 minút pri izbovej teplote. Po vytečení celého ekvilibračného QTB pufru bol na kolónu pomocou injekčnej striekačky prenesený celý obsah lyzátu. Po pretečení celého objemu lyzátu bola kolóna premytá dvakrát 10 ml pufru QC. Zachytená DNA v kolóne bola eluovaná 5 ml pufru QF. Následne bola vykonaná precipitácia DNA pridaním 3,5 ml izopropanolu a centrifugáciou v chladenej centrifúge pri 15 000g po dobu 30 minút. Supernatant bol jemne zliaty a pelet bol premytý 2 ml 70% etanolom a skúmavka bola opäť centrifugovaná pri 15 000 g po dobu 10 minút. Po poslednej centrifugácii prebehlo odstránenie supernatantu a vysušenie peletu na vzduchu. Keď bol pelet dostatočne vysušený následne bol rozpustený vo deionizovanej vode na požadovanú koncentráciu, ktorá bola zmeraná pomocou spektrofotometra Nanodropu. Takýmto spôsobom bol izolovaný expresný aj reportérový plazmid.



Použitím QIAfilter Midi Kitu (Qiagen) na izoláciu DNA boli izolované expresný pSG5-hPXR a reportérový p3A4-luc plazmid. Ich koncentrácia bola zameraná a následne boli tieto plazmidy použité k transientnej transfekcii bunkovej línie LS 180. Koncentrácia expresného plazmidu pSG5-hPXR bola 0,7499  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a koncentrácia reportérového plazmidu p3A4-luc bola 1,3673  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### 4.6.6 Transfekcia buniek

Pre hodnotenie transkripčnej aktivity PXR bola použitá mnou transfekovaná línia LS 180. Táto línia bola pripravená transientnou transfekciou bunkovej línie LS 180 expresným plazmidom pSG5-hPXR a reportérovým vektorom p3A4-luc. Jedná sa o metódu vnesenia cudzej nukleovej kyseliny do eukaryotickej bunky, za účelom merania transkripčnej aktivity študovaného receptora. Transfekcia pozostáva z lipofekcie pomocou FUGENE HD, kedy je cudzia nukleová kyselina vložená do lipozómu, ktorý putuje do eukaryotickej bunky. Do mikroskúmaviiek boli pipetované plazmidy spolu s FUGENE HD v pomere 1  $\mu\text{g}$  DNA : 3  $\mu\text{l}$  FUGENE HD. Ako nosič slúžilo DMEM médium bez pridaných aditív o objeme 20  $\mu\text{l}$ /1 jamku.

V prvom kroku boli adherované bunky pasážované a spočítané rovnakým postupom ako je uvedený v kapitole 4.6.1 Kultivácia a pasážovanie a v kapitole 4.6.2 Počítanie a vysievanie buniek na experiment, avšak namiesto klasického DMEM média bolo použité Charcoal Stripped (CS)-DMEM. Prepočet transfekčnej zmesi sa prepočítava zo stanovenej hodnoty pre 24-jamkovú dosku, kedy jedna jamka obsahuje približne 75 000 buniek. Z toho vyplýva, že k vysatiu buniek na 96-jamkovú dosku je potreba počet buniek prepočítať tak, aby v každej jamke bolo približne 25 000 buniek a v každej jamke musí byť napipetovaných 200  $\mu\text{l}$  bunkovej suspenzie zriedenej CS-DMEM médiom. Boli pripravené a popísané dve mikroskúmavky. Do prvej z nich bolo pridaných 20  $\mu\text{l}$ /1 jamku nahriateho DMEM média bez pridaných aditív a FUGENE HD a roztoky boli inkubované po dobu 5 minút. Do druhej mikroskúmavky boli pridané na základe koncentrácie prepočítané objemy reportérového plazmidu p3A4-luc a následne aj expresného plazmidu pSG5-hPXR. Objemy sú prepočítané na 75 000 buniek, čo sú v prepočte 3 jamky na 96-jamkovej doske. Ide teda o 0,3  $\mu\text{g}$  reportérového plazmidu a 0,1  $\mu\text{g}$  expresného plazmidu na 75 000 buniek. Obsah prvej skúmavky bol opatrne prenesený do mikroskúmavky s plazmidmi a inkubácia prebiehala 15 minút pri izbovej teplote. Počas inkubácie boli spočítané bunky vyššie spomínaným spôsobom a zriedená bunková suspenzia bola pripravená do falkonovej skúmavky na požadovaný objem. Po uplynutí inkubačného času

bol celý obsah mikroskúmavky z transfekčnou zmesou kvantitatívne prenesený do 50ml falkonovej skúmavky so zriedenou bunkovou suspenziou. Následne bola falkonová skúmavka niekoľkonásobným klepnutím premiešaná aby správne prebehla integrácia plazmidovej DNA do testovaných buniek. Takto pripravená suspenzia bola pipetovaná do označených 96-jamkových dosiek po 200  $\mu$ l do každej jamky. Následne boli dosky umiestnené do inkubátoru na 24 hodín pri 37 °C za prítomnosti 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % vlhkosti. Po inkubácii bolo médium z jamiek odsaté a boli aplikované testované látky, následne opäť prebiehala inkubácia po dobu 24 hodín pri 37 °C za prítomnosti 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % vlhkosti.

#### **4.5.7 Luciferázová reportérová esej**

Luciferázová reportérová esej je bioluminiscenčná metóda založená na oxidačnej premene D-luciferínu katalizovanej enzýmom luciferázou. Pomocou tejto reakcie vieme určiť aktivitu génov a ich reguláciu v reálnom čase a v živých bunkách. Výsledný produkt, tzv. oxyluciferín emituje svetlo, ktoré je priamo úmerné transkripčnej aktivite génov. K naviazaniu aktivovaného receptora sa musí do bunkovej línie LS 180 transfekovať reportérový vektor p3A4-luc so zaklonovaným génom pre luciferázu a sekvenciou promotora pre väzbu PXR receptora.

Po 24-hodinovej inkubácii buniek s testovanými látkami boli tieto látky vyklepnuté z 96-jamkovej dosky a dosky boli osušené o buničítu vatu. Následne boli jamky premyté 75  $\mu$ l 1x PBS a po opätovnom vyklepnutí a vysušení o buničinu bolo do jamiek aplikovaných 25  $\mu$ l reportérového lyzačného pufru. Dosky boli neskôr umiestnené do mraziaceho boxu pri – 80 °C k zamrazeniu aspoň na 20 minút. Po uplynutí časového limitu boli dosky umiestnené na trepačku k rozmrazeniu a potom bolo prepipetovaných 6  $\mu$ l lyzátu na bielu 96-jamkovú dosku pre meranie aktivity PXR. K lyzátu bolo pripipetovaných 30  $\mu$ l substrátu pre luciferázu a pomocou prístroja Infinite 200 bola zmeraná luminiscencia. Namerané hodnoty zo všetkých opakovaní boli spriemerované. V agonistickom a rovnako tak aj v antagonistickom móde bola luciferázová aktivita vyjadrená percentami indukcie pozitívnou kontrolou, rifampicínom, ktorá predstavovala 100 %.

#### **4.5.8 Vyhodnotenie**

MTT test a rovnako aj luciferázová reportérová esej v oboch módoch boli prevedené v troch na sebe nezávislých experimentoch. V laboratóriu boli odhadnuté hodnoty IC<sub>50</sub> pri MTT teste a hodnoty EC<sub>50</sub> pre každú látku v agonistickom móde luciferázovej eseje. Pomocou *t*-testu

boli stanovené štatisticky dokázané rozdiely medzi mojimi výsledkami a kontrolami. O štatisticky významné rozdiely na hladine spoľahlivosti boli považované všetky tie, ktorých  $p < 0,05$ . Všetky vytvorené grafy, výpočty  $IC_{50}$  a  $EC_{50}$ , rovnako ako štatistické hodnotenie pomocou  $t$ -testu boli prevedené v programe Graphpad 7.4 (La Jolla, Kalifornia, USA).

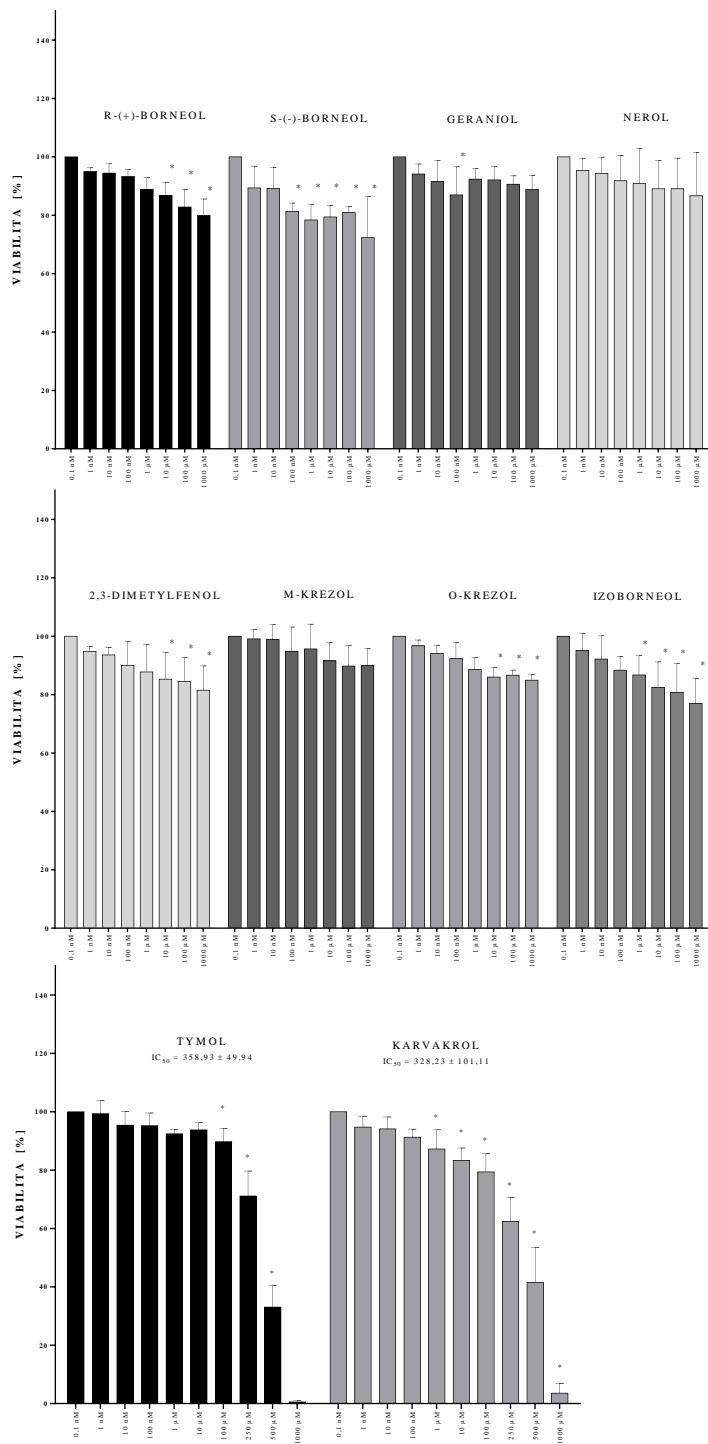
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovenie cytotoxických účinkov vybraných monoterpenoidov na bunkovú líniu LS 180

Pri kultivácii buniek s testovanými látkami je možné, že pri určitej koncentrácii danej látky, sa môže prejavíť toxické pôsobenie. Pomocou MTT testu bola stanovená cytotoxicita vybraných monoterpenoidov na bunkovú líniu LS 180. Na základe výsledkov z troch na sebe nezávislých meraní môžeme usúdiť, že pri 24-hodinovej kultivácii buniek s R-(+)-borneolom, geraniolom, S-(-)-borneolom, nerolom, 2,3-dimetylfenolom, m-krezolom, o-krezolom a izoborneolom neklesla viabilita buniek pod 70 % ani pri najvyššej koncentrácii (Obrázok 4).

Naopak pôsobením tymolu a karvakrolu životaschopnosť buniek so zvyšujúcou sa koncentráciou výrazne klesala. Vzhľadom na tento fakt boli tieto látky dodatočne otestované o koncentrácii 250  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$ . Pri koncentrácii 500  $\mu\text{M}$  bola viabilita kultivácie buniek s karvakrolom v troch nezávislých meraniach priemerne 41,5 % a s tymolom v priemere 33 %. Jedná sa o zníženie životaschopnosti o viac ako 50 %, z toho dôvodu bola určená hodnota  $\text{IC}_{50}$ . Ide o parameter vyjadrujúci takú koncentráciu látky, ktorá zredukuje životaschopnosť buniek na polovicu. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pre tymol predstavovala hodnotu  $358,93 \pm 49,94 \mu\text{M}$  a pre karvakrol  $328,23 \pm 101,11 \mu\text{M}$ . Pri testovaní koncentrácie 1000  $\mu\text{M}$  týchto monoterpenoidov bola viabilita takmer nulová. (Obrázok 4).

Zvážením všetkých výsledkov, môžeme konštatovať, že pri vyšších koncentráciách niektorých monoterpenoidov ide o cytotoxický efekt pre bunkovú líniu LS 180. Následne boli vybrané zásobné roztoky vybraných monoterpenoidov o čo najvyššej netoxickéj koncentrácii a tie boli použité na testovanie ich vplyvu na transkripčnú aktivitu PXR.



Obrázok 4: Vplyv pôsobenia vybraných monoterpenoidov na viabilitu bunkovej línie LS 180 po 24 hodinovej inkubácii.

Látky boli aplikované v koncentráciách 0,1 nM – 1000 μM. Graf zobrazuje priemerné hodnoty so smerodajnými odchýlkami z troch nezávislých opakovaní MTT testu pre každú látku v pentaplikáte pre každý experiment. Hviezdičky v grafe označujú výsledky *t*-testu, a tam kde sa nachádzajú je *p*-hodnota nižšia než 0,05.

### 5.3 Vplyv vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu PXR v bunkovej línii LS 180

V tejto práci bolo skúmané pôsobenie 10 vybraných monoterpenoidov na ligandom aktivovanú transkripčnú aktivitu PXR pomocou luciferázovej reportérovej eseje. K experimentom bola použitá línia LS 180 transientne transfekovaná expresným a reportérovým plazmidom (detaily 4.2 Použité plazmidy). Bunková línia bola po dobu 24 hodín inkubovaná spolu s vybranými monoterpenoidmi o koncentráciách od 0,1  $\mu\text{M}$ -1000  $\mu\text{M}$ , okrem tymolu a karvakrolu, kedy boli monoterpenoidy o koncentracii 0,1  $\mu\text{M}$ -250  $\mu\text{M}$ . Pri antagonistickom móde prebiehala inkubácia za prítomnosti rifampicínu (10  $\mu\text{M}$ ) a pri agonistickom móde v jeho absencii. Grafy boli zostrojené z priemerných hodnôt troch nezávislých meraní. K jednotlivým látkam bol vypočítaný odhad hodnoty  $\text{EC}_{50}$  z troch experimentov.

#### 5.3.1 Agonistický mód

V agonistickom móde boli výsledky vyjadrené v percentách indukcie transkripčnej aktivity PXR modelovým ligandom rifampicínom. Z Obrázku 5 môžeme povedať, že všetky skúmané látky so zvyšujúcou koncentráciou indukujú transkripčnú aktivitu PXR. Avšak v prítomnosti vysokých koncentrácií niektorých látok experiment vyústil v znížení luciferázovej aktivity. Tento jav môže byť spôsobený možnou cytotoxicitou tak vysokej koncentrácie.

Indukcia transkripčnej aktivity PXR pôsobením R-(+)-borneolu bola najvyššia pri koncentrácii 100  $\mu\text{M}$  a to 42,7 % v zrovnaní s pôsobením rifampicínu (Obrázok 5). Pri koncentrácii 1000  $\mu\text{M}$  už mierne klesla na 40,4 %. S-(-)-borneol ako izomér predchádzajúcej látky aktivoval PXR pri koncentrácii 100  $\mu\text{M}$  64,6 % voči kontrolnému rifampicínu. Taktiež ako v predchádzajúcom prípade sa aktivita pri koncentrácii 1000  $\mu\text{M}$  znížila na 50,4 %. Izoborneol pôsobil podobne a teda pri koncentrácii 100  $\mu\text{M}$  bola indukcia transkripčnej aktivity najvyššia a bola stanovená na 30,3 % a pri 1000  $\mu\text{M}$  sa znížila na 11,1 %.

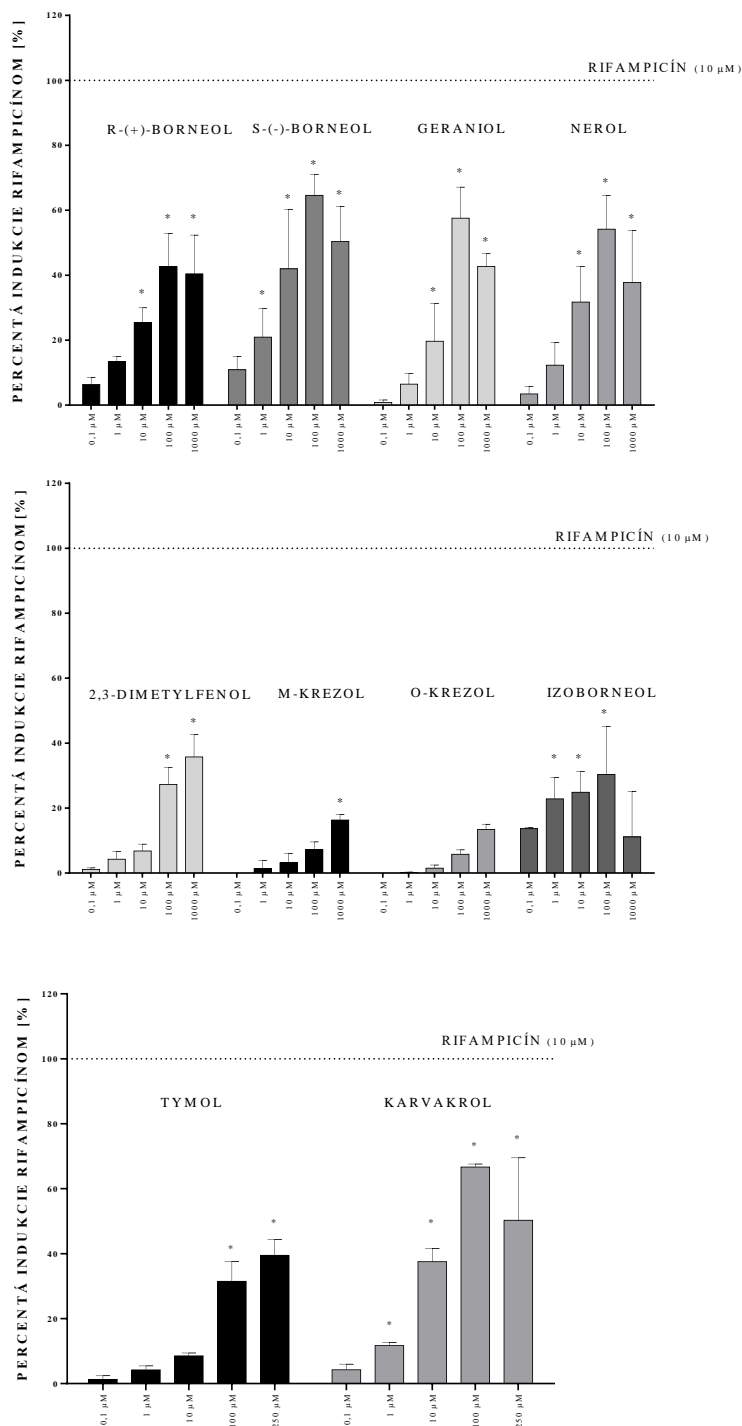
Ďalšie látky, geraniol a nerol, sa prejavili s podobným trendom ako pri predchádzajúcich látkach. Zaujímavosťou je veľký nárast aktivity PXR z koncentrácie 10  $\mu\text{M}$  na 100  $\mu\text{M}$ . Pri geraniole sa zvýšila indukcia z 19,6 % na 57,5 %. Pôsobenie nerolu sa zvýšilo z 31,7 % na 54,2 %. V koncentrácii 1000  $\mu\text{M}$  bol pozorovaný pokles indukcie transkripčnej aktivity PXR pri geraniole na 42,7 % a pri nerole na 37,8 % (Obrázok 5).

Účinok 2,3-dimetylfenolu, m-krezolu a o-krezolu sa so zvyšujúcou koncentráciou látok zvyšoval a nebol pozorovaný pokles v najvyššej koncentrácii spôsobený možnou toxicitou. Pri 2,3-dimetylfenole bol bádany vysoký skok aktivity PXR z koncentrácie 10  $\mu\text{M}$ , kde bola indukcia transkripčnej aktivity iba 6,8 % na koncentráciu 100  $\mu\text{M}$ , kde to bolo už 27,3 %. Pri najvyššej skúmanej koncentrácii (1000  $\mu\text{M}$ ) bol pozorovaný nárast indukcie transkripčnej aktivity PXR na 35,8 % v porovnaní s rifampicínom.

Izoméry m-krezol a o-krezol neprejavili žiaden efekt pri najnižšej koncentrácii (0,1  $\mu\text{M}$ ) no so zvyšujúcou sa koncentráciou sa aktivita PXR zvyšovala. Najvyššia bola pre obe látky pri koncentrácii 1000  $\mu\text{M}$  a to 16,3 % pre m-krezol a 13,4 % pre o-krezol (Obrázok 5)

Po inkubácii bunkovej línie s karvakrolom bola pozorovaná indukcia vo všetkých koncentráciách. Karvakrol sa spomedzi všetkých látok prejavil najväčšou aktivitou PXR o koncentrácii 100  $\mu\text{M}$  a to až 66,7 % v porovnaní so 100% rifampicínom ako modelovým ligandom PXR (Obrázok 5). Vo vyššej koncentrácii karvakrolu (250  $\mu\text{M}$ ) sa znížila indukcia na 50,3 %, pravdepodobne vplyvom cytotoxicity na bunkovú líniu LS 180.

Rovnako ako za prítomnosti karvakrolu, tak aj pri tymole sa prejavilo zvýšenie luciferázovej aktivity vo všetkých použitých koncentráciách (Obrázok 5). Najvýraznejší nárast aktivity bol z koncentrácie 10  $\mu\text{M}$  na 100  $\mu\text{M}$  a to z 8,5 % na 31,5 %. Najvyššia indukcia transkripčnej aktivity PXR bola pozorovaná v koncentrácii 250  $\mu\text{M}$ , ktorej hodnota bola 39,5 %.



Obrázok 5: Vplyv pôsobenia vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu PXR v agonistickom móde v bunkovej línii LS 180 po 24 hodinovej inkubácii.

Látky boli aplikované v koncentráciách 0,1 μM – 1000 μM, respektíve 0,1 μM – 250 μM pre tymol a karvakrol. Graf zobrazuje priemerné hodnoty so smerodajnými odchýlkami z troch nezávislých opakovaní agonistického módu luciferázovej eseje pre každú látku v kvadruplicátoch pre každý experiment. Hviezdičky v grafe označujú výsledky *t*-testu, a tam kde sa nachádzajú je *p*-hodnota nižšia než 0,05.



U látok indukujúcich transkripčnú aktivitu PXR boli odhadnuté hodnoty  $EC_{50}$  (Tabuľka 4). Spomedzi všetkých testovaných monoterpenoidov má najvyššiu hodnotu  $EC_{50}$  m-krezol a to  $155,35 \mu\text{M} \pm 18,31$ . Naopak najnižšou hodnotou  $EC_{50}$  disponuje látka R-(+)-borneol, ktorej hodnota je  $3,50 \mu\text{M} \pm 1,06$  (Tabuľka 4)

Tabuľka 4: Odhad hodnôt  $EC_{50}$  pre každú látku určený priemernou hodnotou troch nezávislých experimentov so smerodajnou odchylkou

LÁTKA	HODNOTA $EC_{50} \pm$ SMERODAJNÁ ODCHYLKA
IZOBORNEOL	26,68 nM $\pm$ 16,51
R-(+)-BORNEOL	3,50 $\mu\text{M} \pm$ 1,06
S-(-)-BORNEOL	4,41 $\mu\text{M} \pm$ 3,35
NEROL	6,53 $\mu\text{M} \pm$ 4,40
GERANIOL	13,71 $\mu\text{M} \pm$ 3,59
TYMOL	25,69 $\mu\text{M} \pm$ 12,93
KARVAKROL	13,89 $\mu\text{M} \pm$ 7,18
O-KREZOL	105,26 $\mu\text{M} \pm$ 29,05
M-KREZOL	155,35 $\mu\text{M} \pm$ 18,31
2,3-DIMETYLFENOL	45,15 $\mu\text{M} \pm$ 1,37

Zhrnutím podrobnejších výsledkov sa zistilo, že látkami najviac indukujúcimi transkripčnú aktivitu PXR boli v mnou testovanom súbore karvakrol a S-(-)-borneol, ktoré dosahovali hodnôt 66,7% a 64,6%. Na druhú stranu, najnižšie hodnoty  $EC_{50}$  mali R-(+)-borneol a to  $3,50 \pm 1,06 \mu\text{M}$  a S-(-)-borneol, pre ktorý bola táto hodnota  $4,41 \pm 3,35 \mu\text{M}$ . Naopak látka, ktorá prejavila minimálnu indukciu transkripčnej aktivity PXR bol m-krezol. Maximálna hodnota indukcie transkripčnej aktivity PXR v porovnaní s modelovým ligandom rifampicínom bola pre túto látku približne 16 %. Pre m-krezol bola spomedzi všetkých testovaných určená aj najvyššia hodnota  $EC_{50}$ , ktorá predstavovala  $155,35 \pm 18,31 \mu\text{M}$ .

### 5.3.2 Antagonistický mód

Rifampicín bol použitý ako modelový ligand indukujúci transkripčnú aktivitu PXR a bolo zisťované, či testované látky kooperujú s rifampicínom a tým zvyšujú indukciu alebo či s ním kompetujú a tým znižujú luciferázovú aktivitu, ktorá je priamo úmerná transkripčnej aktivite PXR. Pri antagonistickom móde bola najnižšia koncentrácia určená hodnotou 100 %

indukcie rifampicínom. V obrázku 6 vidieť, že u väčšiny látok dochádza k miernemu vzrastu so zvyšujúcou sa koncentráciou testovaných látok, avšak v najvyšších koncentráciách naopak k poklesu indukcie. Tento jav však nemusí hneď znamenať antagonistický trend. Vo väčšine prípadov boli použité aj mierne toxické koncentrácie daných látok a teda nemusí ísť o zníženie indukcie vplyvom antagonizmu, ale vplyvom zníženia viability buniek.

Indukcia transkripčnej aktivity PXR pôsobením R-(+)-borneolu o koncentrácii 10  $\mu\text{M}$  spolu s pôsobením rifampicínu sa zvýšila na 107,7 %. Od ďalšej koncentrácie (100  $\mu\text{M}$ ) dochádza k poklesu a v najvyššej koncentrácii sa hodnota indukcie rifampicínom znížila na 74,6 % (Obrázok 6). Podobným spôsobom reagujú aj S-(-)-borneol a izoborneol. Najvyššiu indukciu som pri S-(-)-borneole zaznamenala pri jeho koncentrácii 1  $\mu\text{M}$ , kedy došlo k zvýšeniu až na 117,8 % indukcie rifampicínom (Obrázok 6). Rovnako ako pri R-(+)-borneole tak aj pri S-(-)-borneole so zvyšujúcou koncentráciou tohto monoterpenoidu, dochádza k poklesu luciferázovej aktivity až na 78,4 %. Najvyššia aktivácia PXR pri izoborneole bola zaznamenaná v koncentrácii 10  $\mu\text{M}$  a to 114,1 % a so zvyšujúcou koncentráciou klesla až na 77,7 % v najvyššej koncentrácii. Vo všeobecnosti môžem však povedať, že výsledky sú negatívne pre všetky testované borneoly.

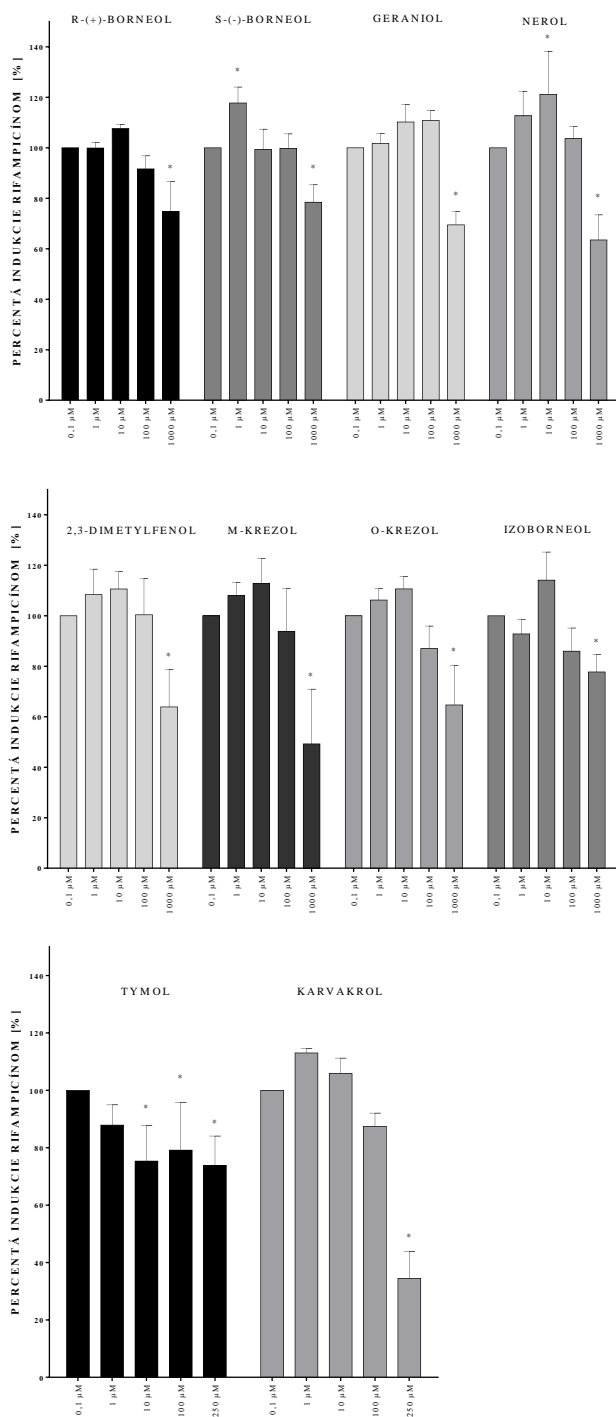
Maximálna indukcia monoterpenoidom geraniol bola v koncentrácii 100  $\mu\text{M}$  a to 110,8 % , no v ďalšej a teda najvyššej koncentrácii indukcia rifampicínom klesla na 69,5 %. Pre nerol bola najvyššia indukcia transkripčnej aktivity PXR v koncentrácii 10  $\mu\text{M}$  a dostala sa až na 121,2 %. Minimálna indukcia rifampicínom dosahovala hodnotu 63,5 % a bola opäť v najvyššej použitej koncentrácii nerolu (Obrázok 6). Geraniol a nerol teda nie sú antagonistami PXR po indukcii rifampicínom.

Pri inkubácii buniek s 2,3-dimetylfenolom bola najvyššia indukcia rifampicínom v experimentoch o koncentrácii 10  $\mu\text{M}$  a to 110,6 % a najnižšia v koncentrácii 1000  $\mu\text{M}$ , kedy sa znížila až na 63,9 % (Obrázok 6). V tomto prípade sa tiež nejedná o antagonizmus, ale ide o zníženie indukcie vplyvom miernej toxicity látky v najvyššej koncentrácii.

V prípade dvoch izomérov m-krezolu a o-krezolu je pozorovaná najvyššia aktivácia PXR v prítomnosti rifampicínu v koncentrácii 10  $\mu\text{M}$  a to pri m-krezole 112,9 % a pri o-krezole 110,7 %. V oboch prípadoch bolo zaznamenané zníženie indukcie rifampicínom so zvyšujúcou sa koncentráciou až na najnižšiu, ktorá bola v najvyššej koncentrácii. Tieto hodnoty boli pre m-krezol 59,2 % a pre o-krezol 64,7 %. Nakoľko sa všetky koncentrácie v MTT teste prejavili ako netoxické a neklesli pod 85 %, môžeme povedať, že po prevedení antagonistického módu luciferázovej eseje vykazujú slabý antagonizujúci účinok v poslednej koncentrácii.

Posledné testované boli tymol a karvakrol. Tymol sa prejavil už od druhej použitej koncentrácie (1  $\mu\text{M}$ ) poklesom indukcie rifampicínom (Obrázok 6) a minimálnu indukciu 73,8 % vykazoval v koncentrácii 250  $\mu\text{M}$ . Pre karvakrol bola zistená maximálna indukcia v koncentrácii 1  $\mu\text{M}$  a to 113 %. V poslednej koncentrácii bola pozorovaných iba 34,5% indukcia rifampicínom, ktorá je spomedzi všetkých látok najnižšia (Obrázok 6). Jednalo sa teda už o toxickú koncentráciu, ktorá bola určená už aj MTT testom.

Sumarizáciou všetkých vyššie spomenutých výsledkov, môžeme konštatovať, že žiadna z testovaných látok nemá významný antagonistický účinok voči PXR. Boli pozorované len slabé efekty, ktoré však boli spôsobené veľmi miernou toxicitou daných látok na testovanú bunkovú líniu LS 180.



Obrázok 6: Vplyv pôsobenia vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu PXR v antagonistickom móde v bunkovej línii LS 180 po 24 hodinovej inkubácii.

Látky boli aplikované v koncentráciách 0,1 µM – 1000 µM, respektíve 0,1 µM – 250 µM pre tymol a karvakrol spolu s rifampicínom o koncentrácii 10 µM. Graf zobrazuje priemerné hodnoty so smerodajnými odchýlkami z troch nezávislých opakovaní antagonistického módu luciferázovej eseje pre každú látku v kvadruplicátoch pre každý experiment. Hviezdičky v grafe označujú výsledky *t*-testu, a tam kde sa nachádzajú je *p*-hodnota nižšia než 0,05.

## 6 DISKUSIA

V súčasnosti sa vedci začínajú venovať vplyvu esenciálnych olejov na jadrové receptory a ich celkový účinok na organizmus. Prihliadnuc na to, že terpenoidy tvoria prevažnú časť esenciálnych olejov je dôležité preskúmať aj pôsobenie čistých terpenoidov na jadrové receptory a zistiť tak, či je pôsobenie samostatného terpenoidu odlišné alebo rovnaké ako pôsobenie esenciálneho oleja.

Príkladom tohto rozporu môže byť oregánový olej, ktorého hlavnými zložkami sú p-cymén,  $\gamma$ -terpinén, tymol a karvakrol. Použitím reálnych koncentrácií látok nachádzajúcich sa v tomto oleji p-cyménu a  $\gamma$ -terpinénu sa tieto látky preukázali antagonistickou aktivitou na AhR, zatiaľ čo karvakrol a tymol preukázali čiastočnú agonistickú aktivitu. Špecifická kombinácia koncentrácií týchto látok v éterickom oleji je dôležitá, pretože indukcia transkripčnej aktivity AhR bola pozorovaná len pri koncentrácii 50  $\mu\text{g/mL}$  (Bartoňková *et Dvořák*, 2018)

V tejto bakalárskej práci bol študovaný vplyv vybraných monoterpenoidov (geraniol, nerol, izoborneol, R-(+)-borneol, S-(-)-borneol, 2,3-dimetylfenol, m-krezol, o-krezol, karvakrol a tymol) na aktiváciu PXR v transientne transfekovanej ľudskej bunkovej línii LS 180, odvodenej od karcinómu hrubého čreva.

Prvé experimenty boli zamerané na stanovenie potenciálne toxických účinkov testovaných látok na bunkovú líniu LS 180 použitím MTT testu. Zo získaných výsledkov bola väčšina látok považovaná za netoxické aj keď v najvyšších koncentráciách začala životaschopnosť postupne klesať, no nedostala sa pod 70 %. Pri tymole a karvakrole bolo v koncentrácii 1000  $\mu\text{M}$  pozorované výrazné zníženie viability, ktoré dosahovalo takmer 0 % životaschopnosť. Zvážením tohoto faktu bola pre tieto dva monoterpenoidy otestovaná cytotoxicita v koncentrácii 250 a 500  $\mu\text{M}$  a určené hodnoty  $\text{IC}_{50}$ . Tymol mal hodnotu  $\text{IC}_{50}$  358,93  $\pm$  49,94  $\mu\text{M}$  a karvakrol 328,23  $\pm$  101,11  $\mu\text{M}$ . V rámci testovania cytotoxicity tymolu a karvakrolu na bunkovú líniu AZ-AhR odvodenej od nádorových pečenevých buniek (Novotna *et al.*, 2011). Po 24 hodinách bol cytotoxický efekt potvrdený a zároveň boli určené podobné hodnoty  $\text{IC}_{50}$ , ktoré mali hodnotu pre tymol 392,8  $\pm$  56,5  $\mu\text{M}$  a pre karvakrol bola určená na 383,1  $\pm$  106,8  $\mu\text{M}$  (Zůvalová Iveta, osobné oznámenie, Olomouc 16.4.2024).

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce bolo testovanie vplyvu vybraných monoterpenoidov na transkripčnú aktivitu PXR pomocou luciferázovej reportérovej eseje. Vybrané monoterpenoidy boli testované v agonistickom a antagonistickom móde po inkubácii bunkovej línie LS 180 po dobu 24 hodín.

Z výsledkov agonistického módu môžeme usúdiť, že všetky látky v rôznej miere aktivovali PXR. V zrovnaní s rifampicínom najvyššiu indukciu transkripčnej aktivity PXR vykazovali karvakrol a S-(-)-borneol v koncentrácii 100  $\mu\text{M}$  a to  $64,6 \pm 5 \%$  a  $66,7 \pm 1 \%$ . Naopak najnižšia aktivácia PXR bola zaznamenaná pri najvyššej koncentrácii (1000  $\mu\text{M}$ ) inkubácie buniek s izomérmí m-krezol a o-krezol. V tejto koncentrácii dosahovali hodnôt  $16,3 \pm 2 \%$  a  $13,4 \pm 2 \%$ .

V agonistickom móde bola pre jednotlivé látky určená aj hodnota  $\text{EC}_{50}$ . Najnižšia hodnota bola priradená k R-(+)-borneolu, pre ktorý predstavovala hodnotu  $3,50 \pm 1,06 \mu\text{M}$ , no veľmi podobnú mal aj S-(-)-borneol a to  $4,41 \pm 3,35 \mu\text{M}$ . Tak nízka koncentrácia na vyvolanie 50% odpovede je potenciálne zaujímavá pre budúce praktické využitie. Pre m-krezol bola spomedzi všetkých látok zistená najvyššia hodnota  $\text{EC}_{50}$  a to  $155,35 \pm 18,31 \mu\text{M}$ . Vysoké koncentrácie, často vykazujú toxicitu a z toho dôvodu by boli tieto látky pre budúce medicínske aplikácie nepoužiteľné.

Z predchádzajúcich štúdií vieme, že borneol je jednou z látok indukujúcich CYP3A enzýmy. Bolo dokázané, že sa zvýšila aktivita enzýmu CYP3A, expresia mRNA a rovnako tak obsah proteínov u potkanov, ktorým bol podávaný borneol (Zhang *et al.*, 2013). Tento výsledok poukazuje na pravdepodobnú indukciu transkripčnej aktivity PXR, čo je konzistentné s výsledkami tejto bakalárskej práce.

V antagonistickom móde bolo stanovované, či niektoré z vybraných látok inhibujú rifampicínom aktivovanú aktivitu PXR. Sumarizovaním nebol zistený antagonistický účinok ani u jednej z látok. V najvyššej koncentrácii bol pozorovaný pokles indukcie, ktorý bol spôsobený slabou cytotoxicitou danej koncentrácie, ktorá sa však v MTT teste neprejavila.

Rovnako ako PXR, tak aj AhR bol zaradený medzi hlavné xenobiotické receptory, podieľajúci sa na chemických metabolických procesoch a detoxikačných mechanizmoch v tráviacom trakte (Mackowiak *et Wang*, 2016). Pre tieto receptory je známy prekryv v ligandoch, hovoríme o duálnych ligandoch PXR a AhR. Takýmito ligandami sú niektoré črevné mikrobiálne indoly ako napríklad indol, indol-3-acetamid alebo tryptamín (Vázquez-Gómez *et al.*, 2023). O to viac stojí za zmienku, že všetky mnou testované látky mimo izoborneolu, R-(+)-borneolu a S-(-)-borneolu antagonizujú AhR v stabilnej reportérovej línii AZ-AhR po 4 aj 24 hodinovej inkubácii (Zůvalová Iveta, osobné oznámenie, Olomouc 16.4.2024).

Zhodnotením experimentov spojených s touto bakalárskou prácou sme prišli k záveru, že esenciálne oleje a v nich vyskytujúce sa terpenoidy majú významný význam v medicínskych aplikáciách a konkrétne niektoré terpenoidy indukujú transkripčnú aktivitu

jadrových receptorov. Zo štúdií vieme, že PXR hrá úlohu v metabolizme liečiv a mnohých ďalších fyziologických a patologických procesoch v organizme (Kliewer *et al.*, 2002a). Je známa aj jeho úloha v potláčaní zápalových procesoch čriev, na ktoré v súčasnosti nie je dostatok terapeutík (Dvořák *et al.*, 2020). Vzhľadom na protizápalové účinky terpenoidov by mohli byť práve tieto látky vhodné na zmiernenie príznakov Crohnovej choroby či ulceróznej kolitídy.

Budúce experimenty pre zistenie podrobnejších účinkov týchto látok by sa mohli zamerať na skrátenie inkubačných časov alebo na sledovanie expresie cieľových génov PXR na úrovni RNA a proteínov pomocou kvantitatívneho PCR či Western blottingu.

## 7 ZÁVER

V tejto bakalárskej práci bol študovaný vplyv vybraných monoterpenoidov, ktorými boli geraniol, nerol, R-(+)-borneol, S-(-)-borneol, izoborneol, m-krezol, o-krezol, tymol, karvakrol a 2,3-dimetylphenol, na transkripčnú aktivitu ľudského pregnanového X receptora.

V literárnej rešerši bol popísaný proces biotransformácie, jej troch fáz a najpodstatnejších enzýmov účastniacich sa jednotlivých fáz. Následne bol popísaný PXR jeden z najznámejších xenobiotických senzorov, ktorý reguluje expresiu génov spojených so správnym fungovaním biotransformácie. Bola priblížená jeho štruktúra, signalizácia, funkcie a úlohy vo fyziologických a patofyziologických dejoch a samozrejme príklady endogénnych a exogénnych ligandov PXR. V závere boli spomenuté dôležité informácie receptorovej teórie a popis testovaných látok.

Experimentálna sekcia bola rozdelená na dve na seba nadväzujúce časti. V prvej fáze bola testovaná cytotoxicita látok pomocou MTT testu na ľudskej nádorovej bunkovej línii LS 180. Bolo zistené, že niektoré z vybraných monoterpenoidov boli vo vysokých koncentráciách na danú bunkovú líniu mierne toxické, z toho dôvodu boli v nasledujúcej časti použité len netoxické koncentrácie vybraných monoterpenoidov.

V druhej fáze bola pomocou luciferázovej reportérovej eseje určovaná sila aktivácie či miera inhibície už aktivovaného PXR receptora po 24-hodinovom pôsobení vybraných monoterpenoidov na transientne transfekovanej ľudskej nádorovej bunkovej línii LS 180.

Experimentami v rámci tejto bakalárskej práce bolo zistené, že všetky testované monoterpenoidy sú agonistami ľudského pregnanového X receptora. Žiadna z testovaných látok nevykazovala antagonistický účinok. Na základe týchto zistení, by mohli byť tieto látky použité ako terapeutiká v medicíne, napríklad na zmiernenie zápalových procesov pri Crohnovej chorobe či ulceróznej kolitíde.



## 8 LITERATÚRA

ALMAZROO, Omar Abdulhameed, Mohammad Kowser MIAH a Raman VENKATARAMANAN, 2017. Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease* [online]. 2017, roč. 21, č. 1, Drug Hepatotoxicity, s. 1–20. ISSN 1089-3261. Dostupné na: doi:10.1016/j.cld.2016.08.001

BARTOŇKOVÁ, Iveta a Zdeněk DVOŘÁK, 2018. Essential oils of culinary herbs and spices display agonist and antagonist activities at human aryl hydrocarbon receptor AhR. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, roč. 111, s. 374–384. ISSN 0278-6915. Dostupné na: doi:10.1016/j.fct.2017.11.049

BERG, Kelly A a William P CLARKE, 2018. Making Sense of Pharmacology: Inverse Agonism and Functional Selectivity. *International Journal of Neuropsychopharmacology* [online]. 2018, roč. 21, č. 10, s. 962–977. ISSN 1461-1457. Dostupné na: doi:10.1093/ijnp/pyy071

BHALLA, Sonali, Cengiz OZALP, Sungsoon FANG, Lingjin XIANG a Jongsook Kim KEMPER, 2004. Ligand-activated Pregnane X Receptor Interferes with HNF-4 Signaling by Targeting a Common Coactivator PGC-1 $\alpha$ : FUNCTIONAL IMPLICATIONS IN HEPATIC CHOLESTEROL AND GLUCOSE METABOLISM \*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, roč. 279, č. 43, s. 45139–45147. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné na: doi:10.1074/jbc.M405423200

BREWER, C. Trent a Taosheng CHEN, 2016. PXR variants: the impact on drug metabolism and therapeutic responses. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2016, roč. 6, č. 5, Drug Metabolism and Pharmacokinetics, s. 441–449. ISSN 2211-3835. Dostupné na: doi:10.1016/j.apsb.2016.07.002

BURK, Oliver, Katja A. ARNOLD, Anke GEICK, Heike TEGUDE a Michel EICHELBAUM, 2005. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression [online]. 2005, roč. 386, č. 6, s. 503–513. ISSN 1437-4315. Dostupné na: doi:10.1515/BC.2005.060

BURT, Sara, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, roč. 94, č. 3, s. 223–253. ISSN 0168-1605. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

DELAUNE, Keith P. a Khalid ALSAYOURI, 2024. Physiology, Noncompetitive Inhibitor. V: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 25.4.2024]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545242/>

DRING, Megan M., Carol A. GOULDING, Valerie I. TRIMBLE, Denise KEEGAN, Anthony W. RYAN, Karen M. BROPHY, Claire M. SMYTH, P. W. Napoleon KEELING, Diarmuid O'DONOGHUE, Maria O'SULLIVAN, Colm O'MORAIN, Nasir MAHMUD, Ann-Charlotte WIKSTRÖM, Dermot KELLEHER a Ross MCMANUS, 2006. The Pregnane X Receptor Locus Is Associated With Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* [online]. 2006, roč. 130, č. 2, s. 341–348. ISSN 0016-5085, 1528-0012. Dostupné na: [doi:10.1053/j.gastro.2005.12.008](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.008)

DUSSAULT, Isabelle, Min LIN, Kevin HOLLISTER, Eric H. WANG, Timothy W. SYNOLD a Barry Marc FORMAN, 2001. Peptide Mimetic HIV Protease Inhibitors Are Ligands for the Orphan Receptor SXR \*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, roč. 276, č. 36, s. 33309–33312. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné na: [doi:10.1074/jbc.C100375200](https://doi.org/10.1074/jbc.C100375200)

DVOŘÁK, Zdeněk, Felix KOPP, Cait M COSTELLO, Jazmin S KEMP, Hao LI, Aneta VRZALOVÁ, Martina ŠTĚPÁNKOVÁ, Iveta BARTOŇKOVÁ, Eva JISKROVÁ, Karolína POULÍKOVÁ, Barbora VYHLÍDALOVÁ, Lars U NORDSTROEM, Chamini V KARUNARATNE, Harmit S RANHOTRA, Kyu Shik MUN, Anjaparavanda P NAREN, Iain A MURRAY, Gary H PERDEW, Julius BRITKO, Lucia TOPOROVA, Arne SCHÖN, Bret D WALLACE, William G WALTON, Matthew R REDINBO, Katherine SUN, Amanda BECK, Sandhya KORTAGERE, Michelle C NEARY, Aneesh CHANDRAN, Saraswathi VISHVESHWARA, Maria M CAVALLUZZI, Giovanni LENTINI, Julia Yue CUI, Haiwei GU, John C MARCH, Shirshendu CHATTERJEE, Adam MATSON, Dennis WRIGHT, Kyle L FLANNIGAN, Simon A HIROTA, Ryan Balfour SARTOR a Sridhar MANI, 2020a. Targeting the pregnane X receptor using microbial metabolite mimicry. *EMBO Molecular Medicine* [online]. 2020, roč. 12, č. 4, s. e11621. ISSN 1757-4676. Dostupné na: [doi:10.15252/emmm.201911621](https://doi.org/10.15252/emmm.201911621)

FOROOZESH, Maryam, Navneet GOYAL a Jiawang LIU, 2019. Coumarins and P450s, Studies Reported to-Date. *Molecules* [online]. 2019, roč. 24, č. 8, s. 1620. ISSN 1420-3049. Dostupné na: [doi:10.3390/molecules24081620](https://doi.org/10.3390/molecules24081620)

FROMM, Martin F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2004, roč. 25, č. 8, s. 423–429. ISSN 0165-6147. Dostupné na: doi:10.1016/j.tips.2004.06.002

HEUMAN, D. M., E. J. GALLAGHER, J. L. BARWICK, N. A. ELSHOURBAGY a P. S. GUZELIAN, 1982. Immunochemical evidence for induction of a common form of hepatic cytochrome P-450 in rats treated with pregnenolone-16 alpha-carbonitrile or other steroidal or non-steroidal agents. *Molecular Pharmacology*. 1982, roč. 21, č. 3, s. 753–760. ISSN 0026-895X.

HOTTA, Mariko, Rieko NAKATA, Michiko KATSUKAWA, Kazuyuki HORI, Saori TAKAHASHI a Hiroyasu INOUE, 2010. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression. *Journal of Lipid Research* [online]. 2010, roč. 51, č. 1, s. 132–139. ISSN 0022-2275. Dostupné na: doi:10.1194/jlr.M900255-JLR200

HUKKANEN, Janne, Jukka HAKKOLA a Jaana RYSÄ, 2014. Pregnane X receptor (PXR) – a contributor to the diabetes epidemic? *Drug Metabolism and Drug Interactions* [online]. 2014, roč. 29, č. 1, s. 3–15. ISSN 2191-0162. Dostupné na: doi:10.1515/dmdi-2013-0036

IHUNNAH, Chibueze A., Mengxi JIANG a Wen XIE, 2011. Nuclear Receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2011, roč. 1812, č. 8, s. 956–963. ISSN 0006-3002. Dostupné na: doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.014

INGELMAN-SUNDBERG, Magnus, 2004. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [online]. 2004, roč. 369, č. 1, s. 89–104. ISSN 1432-1912. Dostupné na: doi:10.1007/s00210-003-0819-z

IOANNIDES, Costas, 1996. *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. B.m.: CRC Press. ISBN 978-1-4398-1070-5.

IYANAGI, Takashi, 2007. Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. V: *International Review of Cytology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 35–112 [cit. 2.4.2024]. Dostupné na: doi:10.1016/S0074-7696(06)60002-8

JAMES M. RITTER, ROD J. FLOWER, GRAEME HENDERSON, YOON KONG LOKE, DAVID MACEWAN, HUMPHREY P. RANG, 2019. *Rang & Dale's Pharmacology* [online].

B.m.: Elsevier Science. 9. [cit. 18.4.2024]. ISBN 978-0-7020-7448-6. Dostupné na: <https://www.martinus.sk/934775-rang-dale-s-pharmacology/kniha>

JONKER, Johan W., Christopher LIDDLE a Michael DOWNES, 2012. FXR and PXR: Potential therapeutic targets in cholestasis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [online]. 2012, roč. 130, č. 0, s. 147–158. ISSN 0960-0760. Dostupné na: doi:10.1016/j.jsbmb.2011.06.012

KENAKIN, Terry, 2013. New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR Review 2. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2013, roč. 168, č. 3, s. 554–575. ISSN 0007-1188. Dostupné na: doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02223.x

KHOJASTEH, Siamak Cyrus, Harvey WONG a Cornelis E.C.A. HOP, 2011. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics Quick Guide* [online]. New York, NY: Springer [cit. 2.4.2024]. ISBN 978-1-4419-5628-6. Dostupné na: doi:10.1007/978-1-4419-5629-3

Kliwer, S.A., Goodwin, B. and Willson, T.M. (2002 a) ‘The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism’, *Endocrine Reviews*, 23(5), pp. 687–702. Available at: <https://doi.org/10.1210/er.2001-0038>.

Kliwer, S.A. *et al.* (1998) ‘An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a Novel Steroid Signaling Pathway’, *Cell*, 92(1), pp. 73–82. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80900-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80900-9).

Kliwer, S.A. and Willson, T.M. (2002 b) ‘Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor’, *Journal of Lipid Research*, 43(3), pp. 359–364. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)30141-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)30141-3).

KODAMA, Susumu, Chika KOIKE, Masahiko NEGISHI a Yukio YAMAMOTO, 2004. Nuclear Receptors CAR and PXR Cross Talk with FOXO1 To Regulate Genes That Encode Drug-Metabolizing and Gluconeogenic Enzymes. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2004, roč. 24, č. 18, s. 7931–7940. ISSN 0270-7306. Dostupné na: doi:10.1128/MCB.24.18.7931-7940.2004

LANDES, Nico, Paul PFLUGER, Dirk KLUTH, Marc BIRNINGER, Ralph RÜHL, Gaby-Fleur BÖL, Hansruedi GLATT a Regina BRIGELIUS-FLOHÉ, 2003. Vitamin E activates gene

expression via the pregnane X receptor. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2003, roč. 65, č. 2, s. 269–273. ISSN 0006-2952. Dostupné na: doi:10.1016/S0006-2952(02)01520-4

LANGMANN, Thomas, Christoph MOEHLE, Richard MAUERER, Michael SCHARL, Gerhard LIEBISCH, Alexandra ZAHN, Wolfgang STREMMEL a Gerd SCHMITZ, 2004. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* [online]. 2004, roč. 127, č. 1, s. 26–40. ISSN 0016-5085, 1528-0012. Dostupné na: doi:10.1053/j.gastro.2004.04.019

LEHMANN, J M, D D MCKEE, M A WATSON, T M WILLSON, J T MOORE a S A KLIEWER, 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *Journal of Clinical Investigation*. 1998, roč. 102, č. 5, s. 1016–1023. ISSN 0021-9738.

LIU, Wenyu, Jing LI, Rui ZHAO, Yao LU a Panpan HUANG, 2023. The Uridine diphosphate (UDP)-glycosyltransferases (UGTs) superfamily: the role in tumor cell metabolism. *Frontiers in Oncology* [online]. 2023, roč. 12, s. 1088458. ISSN 2234-943X. Dostupné na: doi:10.3389/fonc.2022.1088458

LV, Ye, Yi-Yang LUO, Hui-Wen REN, Cheng-Jie LI, Zhi-Xin XIANG a Zhi-Lin LUAN, 2022. The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2022, roč. 13, s. 959902. ISSN 1664-2392. Dostupné na: doi:10.3389/fendo.2022.959902

MA, Xiaochao, Yatrik M. SHAH, Grace L. GUO, Ting WANG, Kristopher W. KRAUSZ, Jeffrey R. IDLE a Frank J. GONZALEZ, 2007. Rifaximin is a gut-specific human pregnane X receptor activator. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2007, roč. 322, č. 1, s. 391–398. ISSN 0022-3565. Dostupné na: doi:10.1124/jpet.107.121913

MACKOWIAK, Bryan a Hongbing WANG, 2016. Mechanisms of Xenobiotic Receptor Activation: Direct vs. Indirect. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2016, roč. 1859, č. 9, s. 1130–1140. ISSN 0006-3002. Dostupné na: doi:10.1016/j.bbagr.2016.02.006

MASUYAMA, Hisashi, Yuji HIRAMATSU, Mamoru KUNITOMI, Takafumi KUDO a Paul N. MACDONALD, 2000. Endocrine Disrupting Chemicals, Phthalic Acid and Nonylphenol, Activate Pregnane X Receptor-Mediated Transcription. *Molecular Endocrinology* [online]. 2000, roč. 14, č. 3, s. 421–428. ISSN 0888-8809. Dostupné na: doi:10.1210/mend.14.3.0424

MATIC, Marko, Andre MAHNS, Maria TSOLI, Anthony CORRADIN, Patsie POLLY a Graham R. ROBERTSON, 2007. Pregnane X Receptor: Promiscuous regulator of detoxification pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2007, roč. 39, č. 3, s. 478–483. ISSN 1357-2725. Dostupné na: doi:10.1016/j.biocel.2006.08.017

MEUNIER, Bernard, Samuël P. DE VISSER a Sason SHAIK, 2004. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews* [online]. 2004, roč. 104, č. 9, s. 3947–3980. ISSN 0009-2665. Dostupné na: doi:10.1021/cr020443g

MISAWA, Akiko, Jun INOUE, Yuriko SUGINO, Hajime HOSOI, Tohru SUGIMOTO, Fumie HOSODA, Misao OHKI, Issei IMOTO a Johji INAZAWA, 2005. Methylation-Associated Silencing of the Nuclear Receptor 1I2 Gene in Advanced-Type Neuroblastomas, Identified by Bacterial Artificial Chromosome Array-Based Methylated CpG Island Amplification. *Cancer Research* [online]. 2005, roč. 65, č. 22, s. 10233–10242. ISSN 0008-5472. Dostupné na: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1073

NOVOTNÁ, Aneta, Kristýna KRASULOVÁ, Iveta BARTOŇKOVÁ, Martina KORHOŇOVÁ, Petr BACHLEDA, Pavel ANZENBACHER a Zdeněk DVOŘÁK, 2014. Dual Effects of Ketoconazole cis-Enantiomers on CYP3A4 in Human Hepatocytes and HepG2 Cells. *PLoS ONE* [online]. 2014, roč. 9, č. 10, s. e111286. ISSN 1932-6203. Dostupné na: doi:10.1371/journal.pone.0111286

NOVOTNA, Aneta, Petr PAVEK a Zdenek DVORAK, 2011. Novel Stably Transfected Gene Reporter Human Hepatoma Cell Line for Assessment of Aryl Hydrocarbon Receptor Transcriptional Activity: Construction and Characterization. *Environmental Science & Technology* [online]. 2011, roč. 45, č. 23, s. 10133–10139. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné na: doi:10.1021/es2029334

NUTT, David, Stephen STAHL, Pierre BLIER, Filippo DRAGO, Joseph ZOHAR a Sue WILSON, 2017. Inverse agonists – What do they mean for psychiatry? *European Neuropsychopharmacology* [online]. 2017, roč. 27, č. 1, s. 87–90. ISSN 0924-977X. Dostupné na: doi:10.1016/j.euroneuro.2016.11.013

ORANS, Jillian, Denise G. TEOTICO a Matthew R. REDINBO, 2005. The Nuclear Xenobiotic Receptor Pregnane X Receptor: Recent Insights and New Challenges. *Molecular*

*Endocrinology* [online]. 2005, roč. 19, č. 12, s. 2891–2900. ISSN 0888-8809. Dostupné na: doi:10.1210/me.2005-0156

OUYANG, N, S KE, N EAGLETON, Y XIE, G CHEN, B LAFFINS, H YAO, B ZHOU a Y TIAN, 2010. Pregnane X receptor suppresses proliferation and tumorigenicity of colon cancer cells. *British Journal of Cancer* [online]. 2010, roč. 102, č. 12, s. 1753–1761. ISSN 0007-0920. Dostupné na: doi:10.1038/sj.bjc.6605677

PERVEEN, Shagufta, 2018. Introductory Chapter. V: *Terpenes and Terpenoids* [online]. B.m.: IntechOpen [cit. 29.4.2024]. ISBN 978-1-78984-777-2. Dostupné na: doi:10.5772/intechopen.79683

PLANQUE, Chris, Fatemeh RAJABI, Fanny GRILLET, Pascal FINETTI, François BERTUCCI, Meritxell GIRONELLA, Juan José LOZANO, Bertrand BEUCHER, Julie GIRAUD, Véronique GARAMBOIS, Charles VINCENT, Daniel BROWN, Ludovic CAILLO, Jovana KANTAR, André PELEGRIN, Michel PRUDHOMME, Jérémie RIPOCHE, Jean François BOURGAUX, Christophe GINESTIER, Antoni CASTELLS, Frédéric HOLLANDE, Julie PANNEQUIN a Jean Marc PASCUSI, 2016. Pregnane X-receptor promotes stem cell-mediated colon cancer relapse. *Oncotarget* [online]. 2016, roč. 7, č. 35, s. 56558–56573. ISSN 1949-2553. Dostupné na: doi:10.18632/oncotarget.10646

PLEUVRY, Barbara J, 2004. Receptors, agonists and antagonists. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. 2004, roč. 5, č. 10, Neurosurgical Anaesthesia and Intensive Care, Pharmacology, s. 350–352. ISSN 1472-0299. Dostupné na: doi:10.1383/anes.5.10.350.52312

RIGALLI, Juan Pablo, Dirk THEILE, Julie NILLES a Johanna WEISS, 2021. Regulation of PXR Function by Coactivator and Corepressor Proteins: Ligand Binding Is Just the Beginning. *Cells* [online]. 2021, roč. 10, č. 11, s. 3137. ISSN 2073-4409. Dostupné na: doi:10.3390/cells10113137

RIGALLI, Juan Pablo, Guillermo Nicolás TOCCHETTI a Johanna WEISS, 2019. Modulation of ABC Transporters by Nuclear Receptors: Physiological, Pathological and Pharmacological Aspects. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2019, roč. 26, č. 7, s. 1079–1112. ISSN 1875-533X. Dostupné na: doi:10.2174/0929867324666170920141707

ROSENFELD, John M., Reynaldo VARGAS Jr., Wen XIE a Ronald M. EVANS, 2003. Genetic Profiling Defines the Xenobiotic Gene Network Controlled by the Nuclear Receptor

Pregnane X Receptor. *Molecular Endocrinology* [online]. 2003, roč. 17, č. 7, s. 1268–1282. ISSN 0888-8809. Dostupné na: doi:10.1210/me.2002-0421

SHIMADA, Tsutomu a Yoshiaki FUJII-KURIYAMA, 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Science* [online]. 2004, roč. 95, č. 1, s. 1–6. ISSN 1349-7006. Dostupné na: doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x

SKANDALAKI, Aikaterini, Panagiotis SARANTIS a Stamatios THEOCHARIS, 2021. Pregnane X Receptor (PXR) Polymorphisms and Cancer Treatment. *Biomolecules* [online]. 2021, roč. 11, č. 8, s. 1142. ISSN 2218-273X. Dostupné na: doi:10.3390/biom11081142

STAUDINGER, Jeff L., Bryan GOODWIN, Stacey A. JONES, Diane HAWKINS-BROWN, Kathleen I. MACKENZIE, Anne LATOUR, Yaping LIU, Curtis D. KLAASSEN, Kathleen K. BROWN, John REINHARD, Timothy M. WILLSON, Beverly H. KOLLER a Steven A. KLIEWER, 2001. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2001, roč. 98, č. 6, s. 3369–3374. ISSN 0027-8424. Dostupné na: doi:10.1073/pnas.051551698

TABB, Michelle M., Aixu SUN, Changcheng ZHOU, Felix GRÜN, Jody ERRANDI, Kimberly ROMERO, Hang PHAM, Satoshi INOUE, Shyamali MALLICK, Min LIN, Barry M. FORMAN a Bruce BLUMBERG, 2003. Vitamin K2 Regulation of Bone Homeostasis Is Mediated by the Steroid and Xenobiotic Receptor SXR \*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, roč. 278, č. 45, s. 43919–43927. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné na: doi:10.1074/jbc.M303136200

TAKESHITA, A, N KOIBUCHI, J OKA, M TAGUCHI, Y SHISHIBA a Y OZAWA, 2001. Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription. *European Journal of Endocrinology* [online]. 2001, roč. 145, č. 4, s. 513–517. ISSN 0804-4643. Dostupné na: doi:10.1530/eje.0.1450513

TONGNUANCHAN, Phakawat a Soottawat BENJAKUL, 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* [online]. 2014, roč. 79, č. 7, s. R1231–R1249. ISSN 1750-3841. Dostupné na: doi:10.1111/1750-3841.12492



VÁZQUEZ-GÓMEZ, Gerardo, Jiří PETRÁŠ, Zdeněk DVOŘÁK a Jan VONDRÁČEK, 2023. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and pregnane X receptor (PXR) play both distinct and common roles in the regulation of colon homeostasis and intestinal carcinogenesis. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2023, roč. 216, s. 115797. ISSN 0006-2952. Dostupné na: doi:10.1016/j.bcp.2023.115797

VENKATESH, Madhukumar, Subhajit MUKHERJEE, Hongwei WANG, Hao LI, Katherine SUN, Alexandre P. BENECHET, Zhijuan QIU, Leigh MAHER, Matthew R. REDINBO, Robert S. PHILLIPS, James C. FLEET, Sandhya KORTAGERE, Paromita MUKHERJEE, Alessio FASANO, Jessica LE VEN, Jeremy K. NICHOLSON, Marc E. DUMAS, Kamal M. KHANNA a Sridhar MANI, 2014. Symbiotic Bacterial Metabolites Regulate Gastrointestinal Barrier Function via the Xenobiotic Sensor PXR and Toll-like Receptor 4. *Immunity* [online]. 2014, roč. 41, č. 2, s. 296–310. ISSN 1074-7613. Dostupné na: doi:10.1016/j.immuni.2014.06.014

WANG, Qing, Richard JIA, Cindy YE, Martha GARCIA, Jibin LI a Ismael J. HIDALGO, 2005. Glucuronidation and sulfation of 7-hydroxycoumarin in liver matrices from human, dog, monkey, rat, and mouse. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* [online]. 2005, roč. 41, č. 3, s. 97–103. ISSN 1543-706X. Dostupné na: doi:10.1290/0501005.1

WATKINS, R. E., G. B. WISELY, L. B. MOORE, J. L. COLLINS, M. H. LAMBERT, S. P. WILLIAMS, T. M. WILLSON, S. A. KLIEWER a M. R. REDINBO, 2001. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2001, roč. 292, č. 5525, s. 2329–2333. ISSN 0036-8075. Dostupné na: doi:10.1126/science.1060762

WATSON, Peter J., Louise FAIRALL a John W.R. SCHWABE, 2012. Nuclear hormone receptor co-repressors: Structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2012, roč. 348–135, č. 2–3, s. 440–449. ISSN 0303-7207. Dostupné na: doi:10.1016/j.mce.2011.08.033

WOJTUNIK-KULESZA, Karolina A., Kamila KASPRZAK, Tomasz ONISZCZUK a Anna ONISZCZUK, 2019. Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2019, roč. 16, č. 12, s. e1900434. ISSN 1612-1880. Dostupné na: doi:10.1002/cbdv.201900434

XIAO, Yong, Zeng-chun MA, Yu-gaung WANG, Hong-ling TAN, Hao-sheng LIU, Xian-xie ZHANG, Bei-bei LU, Xiang-lin TANG, Qian-de LINAG a Cheng-rong XIAO, 2014. [Screening active components in compound danshen based on PXR-CYP3A4: an experimental study]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi = Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*. 2014, roč. 34, č. 5, s. 606–610. ISSN 1003-5370.

XIE, Wen a Yanan TIAN, 2006. Xenobiotic receptor meets NF- $\kappa$ B, a collision in the small bowel. *Cell Metabolism* [online]. 2006, roč. 4, č. 3, s. 177–178. ISSN 1550-4131. Dostupné na: doi:10.1016/j.cmet.2006.08.004

XING, Yaqi, Jiong YAN a Yongdong NIU, 2020. PXR: a center of transcriptional regulation in cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica. B* [online]. 2020, roč. 10, č. 2, s. 197–206. ISSN 2211-3835. Dostupné na: doi:10.1016/j.apsb.2019.06.012

YANG, Rong, Zhenxing CHEN, Fuda XIE, Mingxiang XIE, Na LIU, Ziren SU, Jiangyong GU a Ruizhi ZHAO, 2021. (+/-)-Borneol Reverses Mitoxantrone Resistance against P-Glycoprotein. *Journal of Chemical Information and Modeling* [online]. 2021, roč. 61, č. 1, s. 252–262. ISSN 1549-9596. Dostupné na: doi:10.1021/acs.jcim.0c00892

ZHANG, Bin, Wen XIE a Mathew D KRASOWSKI, 2008. PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* [online]. 2008, roč. 9, č. 11, s. 1695–1709. ISSN 1462-2416. Dostupné na: doi:10.2217/14622416.9.11.1695

ZHANG, Rong, Sui-Qing MI a Ning-Sheng WANG, 2013. Effect of borneol on cytochrome P450 3A enzyme and midazolam pharmacokinetics in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* [online]. 2013, roč. 38, č. 3, s. 159–169. ISSN 2107-0180. Dostupné na: doi:10.1007/s13318-013-0125-1

ZHAO, Mingzhe, Jingsong MA, Mo LI, Yingtian ZHANG, Bixuan JIANG, Xianglong ZHAO, Cong HUAI, Lu SHEN, Na ZHANG, Lin HE a Shengying QIN, 2021. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, roč. 22, č. 23, s. 12808. ISSN 1422-0067. Dostupné na: doi:10.3390/ijms222312808

ZHOU, Changcheng, Michelle M. TABB, Edward L. NELSON, Felix GRÜN, Suman VERMA, Asal SADATRAFIEI, Min LIN, Shyamali MALLICK, Barry M. FORMAN,

Kenneth E. THUMMEL a Bruce BLUMBERG, 2006. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF- $\kappa$ B signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2006, roč. 116, č. 8, s. 2280–2289. ISSN 0021-9738. Dostupné na: doi:10.1172/JCI26283

ZIELIŃSKA-BŁAJET, Mariola a Joanna FEDER-KUBIS, 2020. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, roč. 21, č. 19, s. 7078. ISSN 1422-0067. Dostupné na: doi:10.3390/ijms21197078

ZOLLNER, Gernot, Martin WAGNER a Michael TRAUNER, 2010. Nuclear receptors as drug targets in cholestasis and drug-induced hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2010, roč. 126, č. 3, s. 228–243. ISSN 0163-7258. Dostupné na: doi:10.1016/j.pharmthera.2010.03.005