

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Adéla Matejíčková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium vlivu monocyklických monoterpenoidů na transkripční
aktivitu pregnanového X receptoru (PXR) v lidské nádorové
buněčné linii LS180**

Bakalářská práce

Adéla Matejízková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Iveta Zůvalová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Adéla MATEJZÍKOVÁ**
Osobní číslo: **R21751**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Studium vlivu monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu pregnanového X receptoru (PXR) v lidské nádorové buněčné linii LS 180**
Zadávací 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**

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., Nádvořník P., Nepal B., Kortagere S., Kopečná M., Kopečný D., Šebela M., Rastinejad F., Pu H., Soural M., Rolfes KM, Haarmann-Stemann 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: 26. 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

Jméno a příjmení autora: Adéla Matejízková

Název práce: Studium vlivu monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu pregnanového X receptoru (PXR) v lidské nádorové buněčné linii LS180

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: Mgr. Iveta Zůvalová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: reportérová esej, pregnanový X receptor, monocyklické monoterpenoidy, biotransformace

Počet stran: 47

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Souhrn:

Pregnanový X receptor slouží v organismu jako transkripční faktor a je aktivován řadou ligandů. Zapojuje se do mnoha fyziologických a patofyziologických procesů. Jeho funkcí je regulace exprese velkého množství genů, které kódují enzymy podílející se na metabolismu endogenních a exogenních látek. Cílem této bakalářské práce bylo sledovat vliv vybraných monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR. Bylo prokázáno, že jednotlivé monocyklické monoterpenoidy nemají cytotoxický efekt na buněčnou linii LS180. Dále pomocí reportérové eseje bylo zjištěno, že testované látky mají indukující účinek na transkripční aktivitu PXR. Největší vliv na indukci PXR měly látky R-karvon, 3-methyl-S-karvon, piperitenon a EN2, naopak nejmenší vliv na aktivaci PXR měla látka S(-)-perillylalkohol. Zároveň bylo zjištěno, že žádná z testovaných látek nebyla antagonistou PXR. Tato bakalářská práce prohlubuje znalosti o účinnosti jednotlivých složek esenciálních olejů rostlin na transkripční aktivitu PXR.

Bibliographical identification

Authors name and surname: Adéla Matejízková

Title: Effects of monocyclic monoterpenoids on the transcriptional activity of human pregnane X receptor (PXR) in human cancer cell line LS180

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Iveta Zůvalová, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: reporter essay, pregnane X receptor, monocyclic monoterpenoids, biotransformation

Number of pages: 47

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary:

The pregnane X receptor serves in the organism as a transcription factor and is activated by a variety of ligands. It is involved in many physiological and pathophysiological processes. Its function is the regulation of the expression of a large number of genes encoding enzymes involved in the metabolism of endogenous and exogenous substances. The aim of this bachelor thesis was to monitor the effects of selected monocyclic monoterpenoids on the transcriptional activity of PXR. It has been demonstrated that individual monocyclic monoterpenoids do not have a cytotoxic effect on the LS180 cell line. Furthermore, using a reporter assay, it was found that the tested substances have an inducing effect on the transcriptional activity of PXR. The greatest impact on PXR induction was observed with the substances R-carvone, 3-methyl-S-carvone, piperitenone, and EN2, while the substance S-(-)-perillyl alcohol had the least effect on PXR activation. It was also found that none of the tested substances were PXR antagonists. This bachelor thesis deepens the knowledge about the effects of individual components of plant essential oils on the transcriptional activity of PXR.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Ivety Zůvalové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

.....

Adéla Matejíková

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce, Mgr. Ivetě Zůvalové, Ph.D., za odbornou pomoc při zpracovávání této bakalářské práce, za vstřícnost a cenné rady při práci v laboratoři a za čas, který mi věnovala. Také bych chtěla poděkovat kolektivu Katedry buněčné biologie a genetiky za ochotu při práci v laboratoři. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	vii
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	x
SEZNAM TABULEK.....	xi
1 ÚVOD.....	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1 Biotransformace	3
3.1.1 I. fáze biotransformace	3
3.1.2 II. fáze biotransformace.....	5
3.1.3 III. fáze biotransformace	5
3.2 Pregnanový X receptor	6
3.2.1 Funkce PXR ve fyziologických a patofyziologických procesech	8
3.2.2 Endogenní a exogenní ligandy	11
3.3 Receptorová teorie.....	11
3.3.1 Agonismus.....	12
3.3.2 Antagonismus.....	13
3.4 Terpeny a terpenoidy	13
3.4.1 Vliv esenciálních olejů a monoterpenoidů na jaderné a steroidní receptory.....	15
4 MATERIÁL A METODY.....	19
4.1 Biologický materiál	19
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	19
4.3 Laboratorní pomůcky	21
4.4 Přístroje.....	21
4.5 Použité metody.....	22
4.5.1 Izolace plazmidu	22
4.5.2 Kultivace a pasážování buněk	22

4.5.3	Příprava buněk na experiment.....	23
4.5.4	Transfekce buněk.....	23
4.5.5	Aplikace monocyklických monoterpenoidů a kontrol na buňky	24
4.5.6	MTT test.....	25
4.5.7	Luciferázová reportérová esej	25
4.5.8	Vyhodnocení experimentálních dat	26
5	VÝSLEDKY	27
5.1	Stanovení cytotoxicity účinků monocyklických monoterpenoidů na buněčnou linii LS180	27
5.2	Vliv monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR.....	29
5.2.1	Agonistický mód	29
5.2.2	Antagonistický mód	32
6	DISKUZE.....	34
7	ZÁVĚR.....	37
8	LITERATURA	38

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette
AF	aktivační funkce
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
AR	androgenní receptor
ARNT	jaderný translokátor aryl uhlovodíkového receptoru
ATP	adenosintrifosfát
BXR	benzoátový X receptor
CPT1A	karnitin palmitoyltransferáza 1A
CYP450	cytochrom P450
DBD	DNA vazebná doména
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM-CS	Dulbecco's Modified Eagle's Medium s hormonálně inaktivovaným FBS
DMSO	dimethylsulfoxid
DR	direct repeats
DTT	dithiotreitol
EC ₅₀	poloviční maximální efektivní koncentrace
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EST	expressed-sequence tag
FGF	fibroblastový růstový faktor
FMO	flavinové monooxygenázy
FoxO1	forkhead box protein O1
G6P	glukóza-6-fosfatáza
GPP	geranylpyrofosfát

GR	glukokortikoidní receptor
GST	glutation S-transferázy
HAT	histon acetyltransferázy
HDAC	histondeacetylázová aktivita
HMGCS2	3-hydroxy-3-metylglutarát-CoA syntáza 2
IC ₅₀	poloviční maximální inhibiční koncentrace
IFN- γ	interferon- γ
IL-1 β	interleukin-1 β
IRS	inzulinový receptorový substrát
LBD	ligand vazebná doména
MATE	multidrug and toxin extrusion transportér
MDR	multidrug resistance transportér
MEP	nemevalonátová dráha
MRP	multidrug resistance protein
MTT	methylnitrotetrazoliová sůl
MVA	mevalonátová dráha
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
NAT	N-acetyltransferáza
NCoR	korepresor jaderného receptoru
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NRI12	jaderný receptor podrodiny 1, skupiny I, člen 2
OAT	organické anionové transportéry
OATP	organické anionové transportující polypeptidy
OCT	organické kationové transportéry

PAPS	3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfát
PAPSS2	3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfát syntetáza 2
PBS	fosfátový pufr
PEPCK	fosfoenolpyruvát karboxykináza
PXR	pregnanový X receptor
RIF	rifampicin
RXR	retinoidní X receptor
SCD1	stearoyl-CoA desaturáza 1
SLC	solute carrier
SRC	koaktivátor steroidního receptoru
SULT	sulfotranferáza
SXR	steroidní X receptor
TNF- α	tumor nekrotizující faktor- α
UDPGA	kyselina uridin-5'-difosfoglukuronová
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
UT	untreated
VDR	vitamin D receptor

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura pregnanového X receptoru

Obrázek 2: Přehled funkcí PXR v lidském organismu a jeho aktivace

Obrázek 3: Chemická struktura izoprenové jednotky

Obrázek 4: Vliv monocyklických monoterpenoidů na životaschopnost buněk LS180 po působení 24 hodin

Obrázek 5: Vliv monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR v buněčné linii LS180 po působení 24 hodin v agonistickém módu

Obrázek 6: Vliv monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR v buněčné linii LS180 po působení 24 hodin v antagonistickém módu

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled testovaných monocyklických monoterpenoidů

Tabulka 2: Množství látek pro přípravu transfekční směsi

Tabulka 3: Hodnoty EC_{50} testovaných monocyklických monoterpenoidů

1 ÚVOD

Pregnanový X receptor (PXR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor a spadá do rodiny jaderných receptorů. Hraje velkou roli v metabolismu xenobiotik v tělech savců a jeho nejvyšší exprese je pozorována v játrech a v tenkém střevě. Podílí se také na jiných fyziologických procesech jako např. regulace buněčné proliferace, glukoneogeneze, lipogeneze a oxidace mastných kyselin.

PXR rozpoznává spoustu endogenních a exogenních ligandů, mezi které patří např. steroidy, antibiotika, antimykotika, léčiva a environmentální toxiny. Za endogenní ligandy můžeme považovat hormony, androstany, pregnany, žlučové kyseliny a mikrobiální metabolity. Po navázání ligandu na receptor dochází k vytvoření heterodimeru PXR-RXR a k expresi cílových genů, jejichž produktem je řada enzymů podílejících se na metabolismu a odbourávání látek v procesu zvaném biotransformace. Při ní dochází v těle k chemickým procesům, např. k hydroxylaci, které jsou katalyzovány řadou enzymů, mezi něž patří hlavně monooxygenázy (systém cytochromu P450).

Mezi látky, které mohou mít potencionální vliv na aktivitu PXR, můžeme zařadit různé složky potravy a řadu léčivých přírodních sloučenin. Příkladem ligandů PXR mohou být potenciálně také terpenoidy. Jedná se o látky přirozeně se vyskytující v rostlinách, které jsou charakteristické svou vůní či chutí. Terpenoidy lze rozdělit podle počtu izoprenových jednotek a podle chemické struktury např. na monoterpeny, diterpeny či triterpeny. Mezi významné zástupce těchto monoterpenoidů patří např. menthol, karvon a pulegon, které se vyskytují v mátě peprné (*Mentha piperita*). Výzkum vlivu těchto monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR by mohl v budoucnu přinést lepší znalosti, jak využít přirozeně se vyskytující látky v rostlinách při léčbě střevních chorob, jako např. Crohnova choroba.

2 CÍLE PRÁCE

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.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Biotransformace

Biotransformací rozumíme proces, při kterém je měněna chemická struktura určité látky katalýzou enzymů. Jsou díky ní biologicky deaktivovány látky a následně dojde k jejich vyloučení z těla. Zakládá se na mechanismu, kdy jsou látky rozpustné v tucích přeměňovány na látky rozpustné ve vodě a méně polární látky jsou tak přeměňovány na látky polárnější. Tato přeměna probíhá ve dvou fázích, v I. a II. fázi biotransformace. Po chemické přeměně musí být látky z těla vyloučeny, tento proces shrnuje poslední III. fáze biotransformace.

Celý průběh biotransformace probíhá převážně v játrech a ve střevě, podílí se na něm ovšem i ledviny a plíce. Rozdílem mezi těmito orgány při biotransformaci je, že se na procesu podílí všechny jaterní buňky, ledviny a plíce mají však jen několik specializovaných buněk. Ne všechny látky, které do těla vstoupí, musejí procesu biotransformace podléhat. V takovém případě se látky vylučují ve stavu, ve kterém byly organismem přijaty. Jedná se převážně o látky hydrofilní, polární či ionizovatelné. Pokud jde o látky lipofilní neboli v tucích rozpustné, ty jsou přeměňovány v již zmíněných orgánech. V ledvinách dochází k jejich reabsorpci z glomerulárního filtrátu do krve a přeměně na polárnější metabolity, které jsou následně vyloučeny močí (Katzung, 2018; Phang-Lyn *et al.*, 2024; Susa, *et al.*, 2024).

Rizikem biotransformace může být přeměna xenobiotika, které není pro tělo nebezpečné, v látku toxickou. Tato přeměna se nazývá metabolická aktivace. Příkladem této aktivace může být zástupce polycyklických aromatických uhlovodíků, benzo(a)pyren, který se po své bioaktivaci přeměňuje na benzo(a)pyrene-7,8-dihydro-diol-9,10-epoxid, což je silný karcinogen (Rojas, 2004).

3.1.1 I. fáze biotransformace

Hlavní funkcí I. fáze biotransformace je vnesení či odkrytí polární skupiny xenobiotika za účelem zvýšení polaritativity látky. Dochází tak k přípravě látky na následující fázi biotransformace. Příkladem polárních funkčních skupin mohou být aminoskupina $-NH_2$, hydroxylová skupina $-OH$ nebo sulfanylová skupina $-SH$. Tyto polární skupiny vznikají při řadě chemických reakcí. Mezi ně patří např. hydroxylace, sulfooxidace, dehydrogenace, redukce a hydrolýza (Jancova *et al.*, 2010).

Reakce I. fáze biotransformace jsou zprostředkovány skrze řadu enzymů. Mezi ty nejvýznamnější řadíme enzymy cytochromu P450 (CYP450) a flavinové monooxygenázy (FMO). CYP450 je rozsáhlá rodina monooxygenáz, jejíž hladina je vysoká hlavně v játrech a střevě, kde dochází k jejich nejvyšší expresi. Hlavní funkcí těchto enzymů je hydroxylace a oxidace endogenních i exogenních látek na jednodušší složky, které jsou pro tělo snáze vylučitelné (Poulos, 2005). CYP450 katalyzují hydroxylaci substrátu s účastí donoru elektronu nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) a molekulárního kyslíku, který se váže na atom železa na aktivním místě CYP450. Enzymy CYP450 jsou zapojeny do mnoha metabolických reakcí, např. metabolismus steroidních hormonů, prostaglandinů, žlučových kyselin a mnoha dalších (Nebert *et Russell*, 2002). Geny CYP450 jsou rozděleny do 18 rodin a 43 podrodin, z čehož rodiny CYP2, CYP3 a CYP4 obsahují nejvíce genů ze všech. Rodina CYP3, která je nejvíce zapojená do metabolismu xenobiotik, obsahuje jedinou podrodinu CYP3A. Podrodina CYP3A obsahuje čtyři geny kódující funkční enzymy – CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43 (Zanger *et Schwab*, 2013; Klyushova *et al.*, 2022). Všichni zástupci podrodiny CYP3A jsou indukováni řadou endogenních a exogenních látek, např. makrolidními antibiotiky, organochlorinovými pesticidy a antimykotikem imidazol (Quattrochi *et Guzelian*, 2001). Enzym CYP3A4 je považován za nejdůležitější enzym zapojený do metabolismu léčiv. Katalyzuje metabolismus více než 60 % léčiv. Vazebná doména CYP3A4 je velká a flexibilní, a proto dokáže metabolizovat mnoho velkých lipofilních sloučenin, mezi která lze zařadit např. imunosupresivum cyklosporin A, makrolidní antibiotikum erythromycin nebo lék proti rakovině taxol. Dokáže však metabolizovat i menší látky, např. ifosfamid, tamoxifen, benzodiazepiny, statiny a antidepresiva. Je také důležitý v katabolismu různých endogenních steroidních sloučenin, jako např. testosteron, progesteron, kortisol a žlučové kyseliny (Scott *et Halpert*, 2005; Zanger *et Schwab*, 2013).

FMO katalyzují hlavně hydroxylaci a sulfooxidaci a jsou klasifikačně rozděleny do 8 skupin podle donorů elektronu, typu oxidační reakce a dalších faktorů. Podílejí se na katabolismu přírodních či průmyslových látek (Huijbers *et al.*, 2014). Jejich mechanismus se zakládá na začlenění jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu a následné redukci jiného atomu kyslíku na vodu. Dalšími důležitými enzymy podílejících se na I. fázi biotransformace jsou peroxidázy, hydrolázy a alkoholdehydrogenázy.

3.1.2 II. fáze biotransformace

Fáze, která následuje po I. fázi biotransformace, je založena hlavně na konjugačních reakcích. Těm podléhá xenobiotikum, které prošlo I. fází biotransformace, nebo xenobiotikum, které již ve své chemické struktuře obsahuje potřebné polární funkční skupiny. Díky vzniku konjugátu, kdy se na polární skupiny xenobiotika naváže endogenní skupina, se metabolizovaná látka stává polárnější a rozpustnější ve vodě, a následně je možné ji vyloučit z těla. Konjugačními látkami jsou hydrofilní sloučeniny, např. kyselina glukuronová, sulfát, glutation či aminokyseliny. Jelikož se jedná o chemické reakce, při kterých dochází k syntéze dvou různých chemických struktur, je nutné, aby tento děj byl katalyzován transferázami (Katzung, 2018).

Známymi transferázami zapojenými do II. fáze biotransformace jsou např. UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULT), N-acetyltransferázy (NAT) či glutation S-transferázy (GST). Savčí UGT jsou rozděleny do 2 rodin, UGT1 a UGT2, ty se dále rozdělují na podrodiny UGT1A, UGT2A a UGT2B (Mackenzie *et al.*, 2005). Transferázy UGT katalyzují navázání glukuronové kyseliny na hydroxylovou, karboxylovou nebo aminoskupinu exogenní hydrofobní látky. Donorem glukuronové kyseliny je kyselina uridin-5'-difosfoglukuronová (UDPGA) (Oda *et al.*, 2015). Lidské SULT se skládají ze 4 rodin, SULT1, SULT2, SULT4 a SULT6. Rodina SULT1 obsahuje 8 členů, z čehož SULT1A1 a SULT1B1 jsou považovány za významné enzymy zapojené v metabolismu xenobiotik (Coughtrie, 2016). SULT1A1 a SULT1B1 tvoří skoro 70 % sulfotransferáz přítomných v játrech (Riches *et al.*, 2009). SULT jsou zodpovědné za přenos sulfonátové skupiny z donorové molekuly 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na hydroxylové či aminové skupiny lipofilní molekuly (Falany, 1997).

3.1.3 III. fáze biotransformace

Při poslední fázi biotransformace je nutno již polarizované a konjugované látky transportovat z buňky a následně z organismu. Na rozdíl od I. a II. fáze zde nedochází k chemické přeměně látek. Hlavními proteiny zapojujícími se do této fáze jsou transportéry a membránové přenašeče, které jsou rozmístěny v různých tkáních a orgánech, např. v játrech, střevě, ledvinách či mozku. Transport rozlišujeme influxní, tedy směrem dovnitř buňky, a efluxní, směrem ven z buňky. Transportéry rozdělujeme do dvou základních velkých skupin – SLC (solute carrier) a ABC transportéry (ATP-binding cassette).

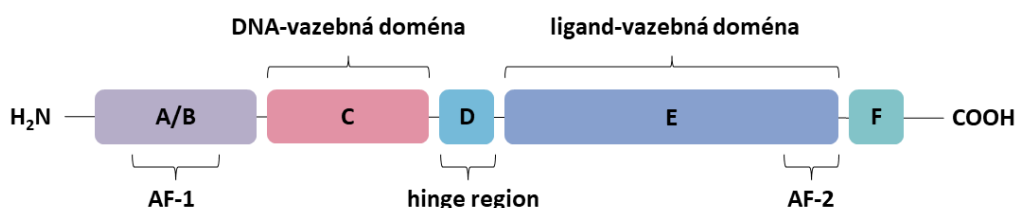
Do rodiny SLC transportérů patří organické kationové transportéry (OCT), organické anionové transportující polypeptidy (OATP), organické anionové transportéry (OAT) a „multidrug and toxin extrusion“ transportéry (MATE). Všechny tyto transportéry zprostředkovávají influxní transport látek. Výjimkou jsou transportéry MATE, které zprostředkovávají transport efluxní. SLC transportéry přenáší skrze buněčnou membránu rozmanité množství látek, např. cukry, aminokyseliny, vitamíny a mnoho dalších. Proteiny skupiny OATP plní funkci přenosu amfifilních organických sloučenin, např. thyroidních hormonů, žlučových kyselin a mnoha xenobiotik a léčiv (Estudante *et al.*, 2013). Látky, které jsou pozitivně nabitě a odpovídají fyziologickému pH, jsou transportovány pomocí OCT.

ABC transportéry zajišťují efluxní transport a to za energie čerpané z hydrolýzy ATP proti elektrochemickému gradientu (Lin *et al.*, 2015). Lidský genom obsahuje 48 genů pro ABC transportéry, které kódují 44 membránových transportérů. Mezi látky přenášené těmito transportéry řadíme hormony, vitamíny, tuky, steroly, mastné kyseliny, peptidy a různá xenobiotika (Alam *et al.*, 2023). Skupina ABC transportérů zahrnuje P-glykoprotein multidrug resistance transporter 1 (MDR1), který je nejvýznamnějším lékovým transportérem. Dále do této rodiny patří multidrug resistance proteiny 1, 2 a 6 (MRP1, MRP2, MRP6) (Lin *et al.*, 2003).

3.2 Pregnanový X receptor

Existence pregnanového X receptoru byla objevena roku 1998, kdy byl nezávisle klonován ve dvou laboratořích – v laboratoři Dr. Stevena A. Kliewera pod společností Glaxo Wellcome v Severní Karolíně a v Salk Institutu Rona Evanse ve městě La Jolla v Kalifornii (Blumberg *et al.*, 1998; Kliewer *et al.*, 1998). Laboratoř Dr. Stevena A. Kliewera objevila myši PXR z genového fragmentu pocházejícího z myši expressed-sequence tag (EST) databáze univerzity ve Washingtonu. Lidský PXR byl klonován v laboratoři Rona Evanse jako homolog benzoátového X receptoru (BXR) rodu *Xenopus* z lidské genomické knihovny. Původně byl receptor pojmenován SXR, neboli steroidní xenobiotický receptor, díky své schopnosti vázat mnoho přírodních a syntetických steroidů a xenobiotik (Blumberg *et al.*, 1998). Později však převzal název pregnanový X receptor díky objevu jeho endogenního ligandu 5 β -pregnan-3,20-dionu, čímž došlo k jeho deorfanzaci. Objev PXR přispěl k porozumění regulace transkripce enzymů podílejících se na procesu biotransformace xenobiotik (Smutny *et al.*, 2020).

Lidský PXR je produktem genu NR1I2, který se nachází na chromozomu 3 v úseku 3q12-q13.3 a je dlouhý 40 kb (Sandanaraj *et al.*, 2008). Samotný protein má velikost 49,7 kDa (Skandalaki *et al.*, 2021). PXR se svou strukturou příliš neliší od ostatních jaderných receptorů, které společně sdílí 5-doménovou strukturu s oblastmi o různých funkcích. Na svém N konci začíná A/B doménou, která obsahuje tzv. AF-1 oblast (activation function). Tato oblast má aktivační funkci, která však není závislá na vazbě ligandu. V literatuře se však vyskytuje také informace, že PXR doménu AF-1 postrádá (Pondugula *et Mani*, 2013). Po AF-1 doméně následuje DNA-vazebná doména (C doména). Krátký úsek na D doméně, tzv. hinge region, je krátká sekvence zajišťující regulaci subcelulární distribuce jaderných receptorů a spojuje DNA-vazebnou doménu s následující ligand-vazebnou doménou (E doména). Ligand-vazebná doména PXR je specifická svou schopností navázat mnoho chemických látek lišících se od sebe svou chemickou strukturou. Na konci E domény na C konci se nachází AF-2 oblast, která má na rozdíl od AF-1 aktivační funkci pouze po navázání ligandu (Sayaf *et al.*, 2021).



Obrázek 1: Struktura pregnanového X receptoru

Pokud není na PXR navázán žádný ligand, jeho aktivita je regulována transkripčními korepresory. Mezi ně patří korepresory jaderných receptorů 1 a 2 (NCoR1 a NCoR2). Oba tyto korepresory inhibují transkripci cílových genů PXR přes histonovou deacetylázovou aktivitu (HDAC) (Johnson *et al.*, 2006; Pondugula *et Mani*, 2013). Jakmile se na LBD PXR naváže určitý ligand, dojde k disociaci korepresorů NCoR1 a NCoR2, komplex ligand-PXR je translokován z cytoplazmy do jádra a vytvoří heterodimer s dalším jaderným receptorem – retinoidním X receptorem (RXR). Aby mohlo dojít k zesílení vazby konzervovaných motivů zinkových prstů v DBD PXR s DNA response elementy v promotorech cílových genů, je nutná přítomnost steroid receptor koaktivátorů 1 a 3 (SRC-1 a SRC-3). Následně se na tento velký proteinový komplex váží další sekundární koaktivátory a histon acetyltransferáza (HAT). Komplex dále přeskupí transkripci nepřístupné chromatinové vlákno cílových genů a je umožněná jejich transkripce pomocí transkripčních proteinů a enzymů, např. RNA polymerázy II (Pavek, 2016; Hall *et al.*, 2021; Sayaf *et al.*, 2021).

3.2.1 Funkce PXR ve fyziologických a patofyziologických procesech

Orgány, ve kterých je PXR nejvíce exprimován, jsou ledviny, tenké střevo a játra. Jeho exprese se odehrává i v jiných orgánech a tkáních, např. v žaludku, vaječnících, plicích či v periferní krvi, hladina exprese je zde ovšem mnohem nižší (Pavek *et Dvorak*, 2008; Pondugula *et Mani*, 2013). Funkcí PXR v těchto orgánech je regulace různých enzymů metabolických drah a jejich exprese.

Jedním z důležitých metabolických dějů probíhajících v játrech je glukoneogeneze neboli proces tvorby glukózy, která je hlavním zdrojem energie organismu. PXR reguluje tento metabolický děj inhibicí exprese dvou důležitých enzymů – glukóza-6-fosfatázy (G6P) a fosfoenolpyruvát karboxykinázy (PEPCK). Jejich inhibicí je zabráněno přeměně meziproductů na glukózu, konkrétně pro enzym glukóza-6-fosfát přeměně glukóza-6-fosfátu na glukózu a fosfát a pro fosfoenolpyruvát karboxykinázu je pozastavena přeměna oxalacetátu na fosfoenolpyruvát (Cai *et al.*, 2021). Aktivací PXR je přímo zabráněno vazbě mezi forkhead box proteinem O1 (FoxO1) a inzulinovým receptorovým substrátem (IRS), což má za následek supresi genové exprese enzymů G6Pázy a PEPCK a pozastavení glukoneogeneze (Ihunnah *et al.*, 2011).

Zdrojem energie pro organismus jsou také tuky. Metabolismus tuků probíhá v játrech skze několik drah, z čehož nejvýznamnější je β -oxidace, díky které jsou oxidovány mastné kyseliny na acetyl-CoA, a lipogeneze, což je proces tvorby tuků. V minulosti byl zkoumán vliv PXR v myších játrech na klíčové enzymy β -oxidace, lipogeneze a také ketogeneze, která tvoří ketolátky jako alternativní zdroj energie pro tělo. Výsledkem výzkumu bylo zjištění, že aktivace PXR způsobuje represi forkhead transkripčního faktoru A2 (FoxA2) a tím snižuje expresi enzymů karnitin palmitoyltransferázy 1A (CPT1A) a 3-hydroxy-3-metylglutarát-CoA syntázy 2 (HMGCS2). CPT1A je transferáza, která katalyzuje přesun acylové skupiny z koenzymu A na karnitin za tvorby palmitoylkarnitinu při β -oxidaci, mezitím co HMGCS2 je důležitá při ketogenezi. Exprese klíčového enzymu pro lipogenezi, stearoyl-CoA desaturázy 1 (SCD1), je aktivitou PXR zvyšována. Aktivace PXR tak může mít za následek vysokou hladinu tuků v organismu způsobenou zvýšenou lipogenezí a zpomalením β -oxidace a ketogeneze (Nakamura *et al.*, 2007).

Játra zajišťují také udržování stálé hladiny žlučových kyselin v těle a jejich metabolismus. Žlučové kyseliny jsou látky odbourávající cholesterol z našeho organismu. Jejich syntéza probíhá v játrech, odkud jsou následně vyloučeny do střeva. Zde dochází k postupnému vstřebávání cholesterolu a vitamínů rozpustných v tucích (Ihunnah *et al.*, 2011).

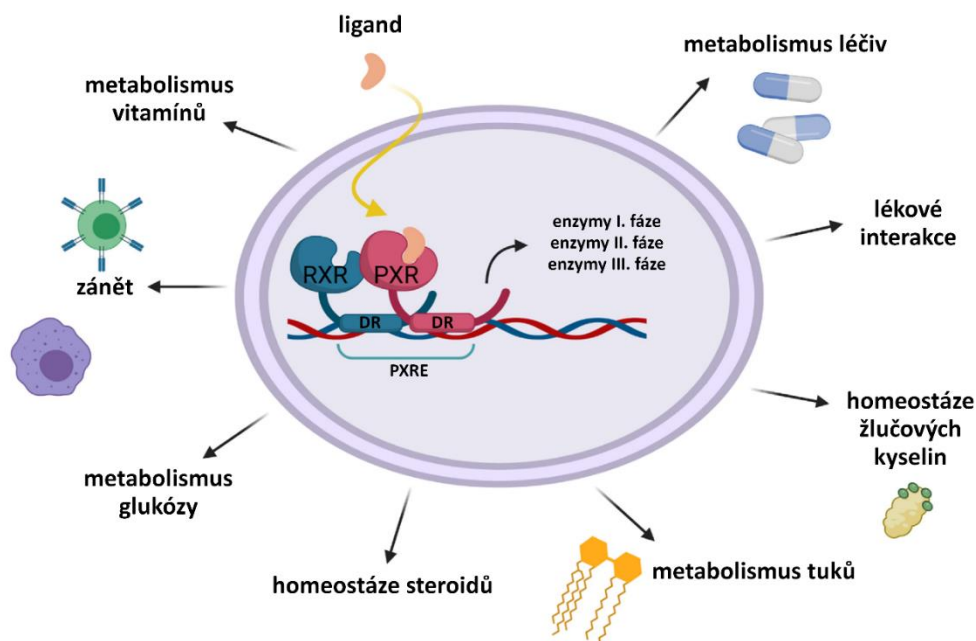
Důležité je však regulovat hladinu samotných žlučových kyselin, vzhledem k faktu, že jejich nadměrné množství má cytotoxický efekt a způsobuje mnohé patofyziologické procesy (Fiorucci *et al.*, 2007). Tato regulace je zprostředkována aktivací PXR, která způsobuje indukci exprese enzymů, jejichž funkcí je hydroxylace žlučových kyselin. Na metabolismu těchto látek se podílí nejen CYP3A4, ale také jiné cílové geny receptoru. Enzym SULT2A, patřící do velké rodiny konjugujících enzymů cytosolických sulfotransferáz, způsobuje detoxifikaci konkrétní žlučové kyseliny – kyseliny lithocholové (Sonoda *et al.*, 2002). Ta se řadí mezi jedny z nejtoxičtějších při jejím nadbytku. Cytosolické sulfotransferázy jsou enzymy II. fáze detoxifikace a jsou zodpovědné za přenos sulfonátové skupiny z donorové molekuly 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na hydroxylové či aminové skupiny lipofilní molekuly. Konjugací této sulfonátové skupiny se zvyšuje rozpustnost látky ve vodě, čímž je usnadněn proces jejího odstranění z těla (Falany, 1997). Aktivace PXR indukuje také enzym PAPS syntetázu 2 (PAPSS2), jehož funkcí je tvorba donorů sulfonátových skupin PAPS (Sonoda *et al.*, 2002).

PXR má kromě již výše vypsanych funkcí také funkci v metabolismu xenobiotik, kde slouží jako regulátor. Jeho cílovým genem je CYP3A4, který se podílí na metabolismu řady léčiv. Bylo prokázáno, že aktivací PXR dochází k indukci exprese CYP3A4 a tím k lékovým interakcím v organismu. Kromě zmíněných cílových genů se PXR podílí na expresi dalších proteinů. Jedná se o UGT1A1 a transportní proteiny MDR1 a multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) (Gao *et al.* 2010). UGT1A1 je protein důležitý v metabolismu xenobiotik a endogenních látek jako např. bilirubin a je nejčastějším izotypem rodiny UDP-glukuronosyltransferáz. Funkcí transportního proteinu MRP2 je přenos konjugátů produktů II. fáze biotransformace.

Role PXR je důležitá nejen při fyziologických procesech organismu, uplatňuje se také při různých zánětlivých onemocněních. Jedním z regulátorů zánětlivých reakcí je nukleární faktor kappa B (NF- κ B) (Oeckinghaus *et al.* Ghosh, 2009). Při jeho aktivaci dochází ke zvýšené transkripci prozánětlivých mediátorů, např. interleukinu 1 β (IL-1 β), tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α) či interferonu γ (IFN- γ) a dochází k zánětu (Goulart, 2022; Na *et al.*, 2022; Qin *et al.*, 2022; Matias *et al.*, 2024). Vztah mezi PXR a NF- κ B byl mnohokrát studován na geneticky modifikovaných myších. Při aktivaci NF- κ B byla inhibována funkce PXR a tím pádem byla snížena exprese jeho cílových genů. Na druhou stranu, aktivace PXR vedla k inhibici NF- κ B a tím došlo ke snížení exprese genů zodpovědných za tvorbu prozánětlivých mediátorů (Zhou, 2006). Příkladem zánětlivých onemocnění může být např. Crohnova choroba,

kteřá je součástí rozsáhlé skupiny onemocnění s názvem nespecifické střevní záněty (Lee *et al.*, 2018). Projevuje se dysregulací střevní rovnováhy, narušením střevní epiteliální stěny a zvýšením propustnosti střev (Zhang, 2014). Na myších bylo prokázáno, že aktivace PXR přímo vede ke snížení exprese NF- κ B responzivních genů a ke zmírnění příznaků DSS-indukované kolitidy. Ačkoliv je detailní proces, kterým PXR způsobuje represi NF- κ B, stále neznámý, je jisté, že role PXR by mohla být stěžejní při léčbě střevních zánětlivých onemocnění (Shah *et al.* 2007).

Kromě zánětlivých onemocnění je PXR zapojen i do procesů apoptózy, regulace buněčného cyklu, proliferace a oxidativního stresu. Tyto děje jsou úzce spojeny také s rozvojem a progresí rakovinného bujení. Nevýhodou aktivace PXR v rakovinných liniích je následná rezistence vůči některým léčivům proti rakovině, např. ixabepilon a paclitaxel, díky zvýšené regulaci enzymů odbourávající léčiva. Mezi enzymy a proteiny, které jsou za tuto resistenci zodpovědné, patří P-glykoprotein a CYP3A4 (Qiao *et al.*, 2013). Aktivita PXR má také vliv na zrychlení rakovinného bujení díky zvýšené expresi proteinů zodpovědných za buněčnou proliferaci, např. fibroblastových růstových faktorů (FGF) (Gupta *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). PXR tedy hraje významnou roli i při studiu a léčbě rakoviny a jeho vysoká míra exprese v nádorech může být využívána jako jeden z prognostických markerů např. v rakovině prsu (Conde *et al.*, 2008).



Obrázek 2: Přehled funkcí PXR v lidském organismu a jeho aktivace (převzato podle (Skandalaki *et al.*, 2021))

PXR = pregnanový X receptor; RXR = retinoidní X receptor; PXRE = xenobiotic responsive element; DR = direct repeats

3.2.2 Endogenní a exogenní ligandy

Jako endogenní ligandy chápeme látky, které se přirozeně vyskytují v těle, a svou vazbou na jaderné receptory, konkrétně jejich LBD, mění jejich konformaci. Receptory, jejichž přirozený endogenní ligand není zatím znám, se obecně označují jako receptory sirotčí (Schupp *et Lazar*, 2010). PXR byl původně sirotčí receptor, ale došlo k jeho deorfanzaci po objevení jeho endogenního ligandu 5 β -pregnan-3,20-dionu (Lehmann *et al.*, 1998).

PXR je aktivován řadou endogenních ligandů lišících se svou chemickou strukturou díky své flexibilní a dynamické ligand-vazebné doméně (Buchman *et al.*, 2018). Příkladem těchto endogenních látek jsou žlučové kyseliny, které v těle vznikají oxidací cholesterolu a podílejí se také na metabolismu lipidů. Indukci PXR způsobuje také řada steroidních hormonů, mezi něž patří progesteron, estradiol, 5 β -pregnan-3,20-dion a mnoho dalších (Lv *et al.*, 2022). Mezi endogenní ligandy PXR řadíme také mikrobiální metabolity – deriváty L-tryptofanu – tryptamin, indol, skatol, indol-3-acetát, indol-3-aldehyd, indol-3-ethanol, indol-3-laktát a další deriváty indolu (Dvořák *et al.*, 2020).

Látky, které pochází z vnějšího prostředí a v těle se za běžných okolností nevyskytují, označujeme jako exogenní ligandy. Mezi exogenní ligandy PXR patří mnoho léčiv, např. rifampicin, který se používá jako jeden z modelových ligandů PXR, dále rifamixin, klotrimazol, dexamethazon, lovastin a metyrapon (Lehmann *et al.*, 1998; Goodwin *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000). Dalšími léčivy, které se vážou na PXR, jsou antibiotikum ritonavir, antineoplastikum cyklofosfamid, taxol, tamoxifen, protizánětlivý indometacin, troglitazon a sedativa glutetimid a fenobarbital (Chang *et al.*, 1997; Desai *et al.*, 2002; Honkakoski *et al.*, 2003; Persson *et al.*, 2006). PXR je aktivován také řadou environmentálních polutantů, zde lze zařadit ftaláty a bisfenoly (Wyde *et al.*, 2005), dále bylinnými produkty a potravinovými doplňky. Mezi bylinné přípravky indukující PXR lze zařadit extrakt třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) či extrakt pepřovníku opojného (*Piper methysticum*), jinak nazývaného kava kava (Staudinger *et al.*, 2006).

3.3 Receptorová teorie

Receptorová teorie se zabývá interakcemi mezi ligandem, receptorem buňky a konečnou buněčnou odpovědí. Je velice důležitá pro pochopení buněčných dějů v organismu. Za jejího zakladatele se považuje John Newport Langley, který prováděl experimenty s analogy nikotinu na izolovaná svalová vlákna. Díky těmto experimentům byl položen základ buněčné

receptorové teorie. Nejčastěji je využívána pro sledování efektů různých léčiv na lidský organismus a kvantifikaci účinků xenobiotik. Ta jsou schopna účinkovat v biologických systémech odlišně na základě změny podmínek, ve kterých se vyskytují (Rang, 2006; Kenakin, 2008).

Interakce mezi ligandem a určitým receptorem se liší podle toho, o jaký typ receptoru se jedná. Rozlišujeme 4 skupiny receptorů – receptory spřažené s iontovými kanály, receptory spřažené s G-proteiny, dále receptory spojené s enzymovou aktivitou, a nakonec jaderné a steroidní receptory. Každá z těchto skupin má odlišný mechanismus přenosu signálu a liší se zprostředkováním buněčné odpovědi.

Vazba ligandu na receptor je spjata s mnoha různými vztahy, které lze matematicky vyjádřit. Obecně se také rozlišuje mnoho pojmů, které popisují vztah mezi látkou a receptorem buňky. Afinita vyjadřuje jak ochotně se látka, ligand, bude vázat na daný receptor. Afinita může být buď selektivní, kdy se ligand váže jen k určitému subtypu receptoru, či neselektivní, kdy je vazba ligandu zprostředkována přes více subtypů receptoru. Potence je veličina srovnávající koncentraci dvou látek, které vyvolají 50 % maximální odpovědi EC_{50} . Další důležitou veličinou je tzv. IC_{50} , která vyjadřuje koncentraci inhibitoru vytěsňující 50 % ligandu z vazby na receptor. V buněčné biologii a receptorové teorii od sebe odlišujeme látky podle zprostředkování buněčné odpovědi po vazbě na receptor – agonisty a antagonisty (Currie, 2018; Katzung, 2018).

3.3.1 Agonismus

Látka, která je schopna se navázat na buněčný receptor a vyvolává buněčnou odpověď, se nazývá agonista. Svou vazbou na daný receptor mění jeho konformaci a spouští signální kaskádu. Schopnost léčiva vázat se na receptor a jeho potence jsou důležitými ukazateli ve farmakologii. Je nutné říci, že ligand, který se pro jeden receptor chová jako jeho agonista, může být pro jiný receptor jeho antagonistou.

Kromě klasických agonistů rozlišujeme také parciální a inverzní agonisty. Parciálním agonistou rozumíme látku, která i přes plné receptorové obsazení vyvolává slabší odpověď než agonista, a nedokáže tedy maximálně indukovat receptor. Nevýhodou parciálního agonisty je fakt, že má antagonistický účinek v přítomnosti agonisty, se kterým soutěží o vazebné místo, pokud je jejich cílem stejný receptor. Inverzní agonisté jsou ligandy, které po vazbě na receptor

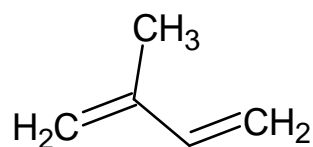
vyvolají opačnou odpověď, než jakou by vyvolala vazba agonisty na stejný receptor (Neubig *et al.*, 2003; Pleuvry, 2004; Negus, 2006; Currie, 2018).

3.3.2 Antagonismus

Antagonistou je látka, která má vlastnost se vázat na receptor, ale neaktivuje ho. Jeho vazba na receptor brání účinku agonistické látky. Antagonismus rozdělujeme na reverzibilní a ireverzibilní. Při reverzibilním antagonismu se antagonist váže na receptor nekovalentní vazbou, a proto lze jeho účinek zvrátit určitou koncentrací agonisty. Neplatí tak však u ireverzibilního antagonismu, kdy zvýšení dávky agonisty neovlivní inhibici jeho účinku a reakce je nezvratná, protože vazba antagonisty je kovalentní. Receptor se v tomto případě musí syntetizovat *de novo* (Page *et Maddison*, 2008). Dále lze antagonismus rozlišit na kompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní antagonist se váže na stejné vazebné místo jako agonista a tím blokuje možnost agonisty se na receptor vázat. Nekompetitivní antagonist je látka, která má schopnost se navázat na jiné než vazebné místo, tzv. alosterické místo, tím změní konformaci receptoru a znemožní agonistické látce vazbu na receptor (Katzung, 2018).

3.4 Terpeny a terpenoidy

Terpeny a terpenoidy jsou zástupci organických sloučenin a řadí se mezi nenasycené uhlovodíky. Molekuly jsou složeny z dvou či více izoprenových jednotek (viz obr. 3), díky tomu se jim často říká také izoprenoidy. Zástupci těchto látek mají většinou rostlinný původ. Jsou složkami silic neboli éterických olejů, nebo rostlinné pryskyřice. Vznik izoprenových jednotek je v rostlinách regulován dvěma metabolickými dráhami – mevalonátovou (MVA) a nemevalonátovou (MEP) dráhou. Po dokončení těchto drah následuje geranyl pyrofosfátová fáze, při které vzniká prekurzor terpenů a terpenoidů geranylpyrofosfát (GPP) (Bergman *et al.*, 2019).



Obrázek 3: Chemická struktura izoprenové jednotky

Ačkoliv jsou oba názvy často zaměňovány, terpeny a terpenoidy mají odlišnou chemickou strukturu a vlastnosti. Terpeny mohou být buď acyklické nebo cyklické. Dále je lze rozdělit podle počtu izoprenových jednotek na monoterpeny, kdy látka obsahuje 2 molekuly izoprenu, seskvi- (3), di- (4), tri- (6), tetra- (8) až polyterpeny (Ninkuu *et al.*, 2021). Jedná se o nepolární, ve vodě nerozpustné těkavé látky.

Velmi podobnými látkami jsou terpenoidy, které lze považovat za modifikované terpeny. Hlavním rozdílem mezi terpeny a terpenoidy je výskyt dalších funkčních skupin, které obsahují kyslík. Jejich struktura se také může mírně lišit díky ztrátě či posunu části molekuly, většinou se jedná o methylovou skupinu (Moss *et al.*, 1995).

Terpenoidy jsou složkami esenciálních olejů rostlin a jsou charakteristické svou vůní (Abdallah *et Quax*, 2017). Esenciální neboli éterické oleje jsou směsí různých těkavých látek, mezi které patří např. aldehydy, alkoholy, fenoly, ketony, estery či ethery. Esenciální oleje lze z rostliny získat mnoha metodami – destilací, lisováním za studena či odpichováním pryskyřice a její extrakcí rozpouštědlem (Tongnuanchan *et Benjakul*, 2014). V dnešní době je známo přibližně 3000 esenciálních olejů, z nichž 300 je komerčně využíváno v různých odvětvích, např. ve farmaceutickém průmyslu a v medicíně ve formě aromaterapií a koupelí (Bakkali *et al.*, 2008; Bartoňková *et Dvořák*, 2018b). Jsou také využívány v kosmetice díky antifungálním a antibakteriálním vlastnostem. V přírodě se esenciální oleje uplatňují jako ochrana rostlin proti bakteriím, virům, houbám a býložravé zvěři. Mají také schopnost přilákat hmyz, který může následně roznášet pyl a semena rostliny (Bakkali *et al.*, 2008). Značné množství je obsaženo v bylinkách a koření využívaných při vaření pro dochucování jídel.

Terpenoidy, které ve své základní chemické struktuře o 10 uhlících obsahují dvě izoprenové jednotky, se nazývají monoterpenoidy. Ty lze dále rozdělit do tří skupin – acyklické, monocyklické a bicyklické. Atomy monocyklických monoterpenoidů jsou vzájemně uzavřeny do jednoho cyklu a obsahují různé funkční skupiny. Mezi významné zástupce monocyklických monoterpenoidů můžeme zařadit např. menthol, který se v přírodě vyskytuje ve dvou izoformách, (+)-menthol a (-)-menthol. Patří mezi sekundární metabolity máty peprné (*Mentha piperita*) (Souza *et al.*, 2022). Dalšími významnými látkami spadajícími do skupiny monocyklických monoterpenoidů jsou např. S-karvon a R-karvon. S-karvon lze najít v kmínu kořeněném (*Carum carvi*) či kopru vonném (*Anethum graveolens*), jeho izomer R-karvon má svůj přirozený výskyt v mátě klasnaté (*Mentha spicata*) (Nogoceke *et al.*, 2016).

3.4.1 Vliv esenciálních olejů a monoterpenoidů na jaderné a steroidní receptory

V minulosti již proběhlo několik experimentů vlivu esenciálních olejů vybraných druhů koření na transkripční aktivitu aryl uhlovodíkového (AhR) (Bartoňková *et Dvořák*, 2018b), glukokortikoidního (GR), androgenního (AR), vitamin D receptoru (VDR) (Bartoňková *et Dvořák*, 2018a) a také PXR (Bartonkova *et Dvorak*, 2018c).

Při testování vlivu látek na AhR, jehož hlavním cílovým genem je CYP1A1, byly pozorovány látky jak indukující, tak inhibující transkripční aktivitu AhR. V rámci testování vlivu esenciálních olejů byla pozorována inhibice transkripční aktivity AhR esenciálním olejem z kmínu (*Carum carvi*) a spearmintu (*Mentha spicata*), jejichž hlavními složkami jsou monocyklické monoterpenoidy S-karvon a R-karvon (Bartoňková *et Dvořák*, 2018b). Vliv těchto dvou látek byl také přímo testován na transkripční aktivitu AhR a bylo zjištěno, že S-karvon a R-karvon mají antagonistický účinek. Bylo prokázáno, že oba izomery karvonu inhibují samotnou vazbu AhR s ARNT (jaderný translokátor aryl uhlovodíkového receptoru), a tím tvorbu heterodimeru. Při zablokování této vazby je nemožné se navázat na promotor CYP1A1 genu, což má za následek supresi exprese tohoto genu (Ondrová *et al.*, 2023).

Dalšími receptory, na nichž byl testován vliv látek, byly AR, GR a VDR. Po působení esenciálních olejů na transkripční aktivitu AR nebyl pozorován indukující ani inhibující vliv těchto látek. Ve studii, která se zabývala agonistickým a antagonistickým vlivem antimikrobiálních látek v produktech používaných na péči o chrup, byl testován vliv mimo jiné také mentholu na AR. Zde bylo prokázáno, že menthol je slabým kompetitivním inhibitorem AR (Michalíková *et al.*, 2019). Při studiu vlivu řady esenciálních olejů různých druhů koření na transkripční aktivitu GR byla pozorována výrazná antiglukokortikoidní aktivita, která byla způsobena několika zástupci esenciálních olejů. Jednalo se o látky kmínu, spearmintu, kurkumy a několika dalších. Tato aktivita se projevila jen v reportérových esejích, na úrovni exprese RNA již žádné účinky pozorovány nebyly. Předmětem studie Ryu *et al.* (2021) byl GR receptor, jehož aktivita byla sledována v rámci testování buněčného sensorového systému pro screening kortizolu. Sensorové buňky byly po aplikaci 5 různých esenciálních olejů pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Silný signál byl pozorován u sensorových buněk po aplikaci esenciálního oleje máty peprné (*Mentha piperita*). Následně byl testován vliv jednotlivých složek esenciálního oleje máty peprné na sensorové buňky, aby byly identifikovány ligandy GR. Sensorové buňky reagovaly na látku (-)-menthol, z čehož lze usoudit, že (-)-menthol se selektivně váže na GR a podílí se na jeho aktivaci. Při studiu esenciálních olejů na transkripční

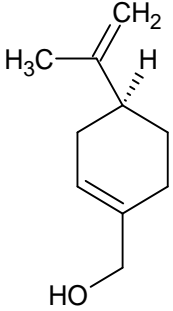
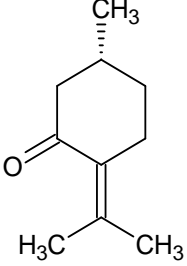
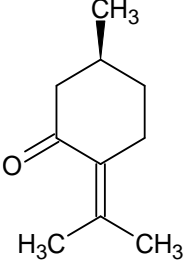
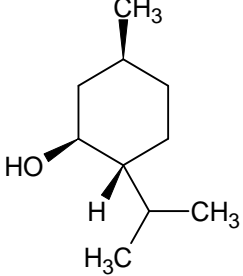
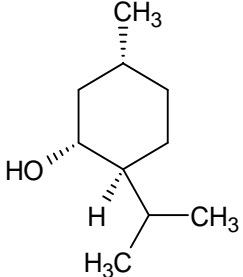
aktivitu VDR byl potvrzen potencující efekt u látek kmínu, koriandru, zázvoru, spearmintu a kurkumy a dalších (Bartoňková *et Dvořák*, 2018a).

Středem zájmu byl také PXR, na jehož transkripční aktivitu mělo vliv hned několik esenciálních olejů vybraných druhů koření (Bartonkova *et Dvorak*, 2018c). Všechny testované esenciální oleje indukovaly transkripční aktivitu PXR. Jejich vliv byl testován také přímo na expresi lidského CYP3A4, kdy testované látky indukovaly expresi *CYP3A4* mRNA v buněčných liniích a lidských hepatocytech. Testovanými látkami byly např. esenciální oleje z bazalky, majoránky, zázvoru, oregana, vanilky či máty. Další studie, věnující se vztahu mezi warfarinem a mentholem, potvrdila indukující vliv mentholu na expresi CYP2C a CYP3A v játrech. Warfarin je léčivo s antikoagulačním efektem. Bylo pozorováno, že u pacientů, kteří brali warfarin a zároveň konzumovali přípravky s obsahem mentholu, klesla účinnost warfarinu. Na základě této studie bylo zjištěno, že menthol působí přímo na jaterní buňky a podporuje jadernou translokaci PXR. Menthol také přímo indukuje expresi CYP2C a CYP3A, tím je zrychlen metabolismus warfarinu a je snížen jeho antikoagulační efekt (Hoshino *et al.*, 2014).

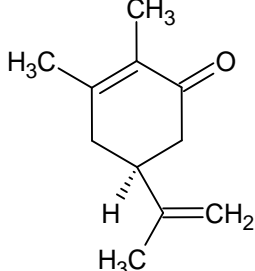
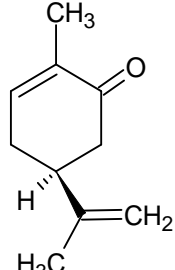
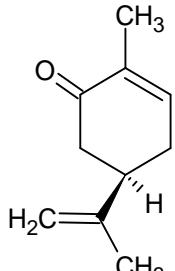
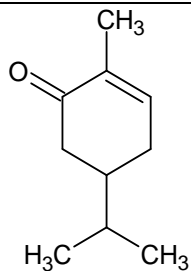
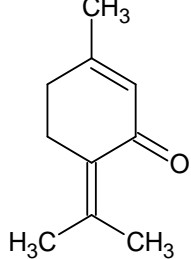
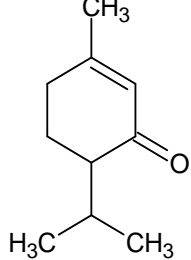
Mezi přírodní bylinné produkty, které se v poslední době staly velmi populární, patří přípravky s obsahem třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) (Nowack, 2008). Esenciální olej získaný z třezalky tečkované obsahuje přes 20 složek, z nichž nejvýznamnější je hyperforin. Rostlina je známá pro své antidepresivní účinky (Linde *et al.*, 1996). Extrakt třezalky tečkované byl testován na aktivitu PXR a vliv exprese CYP3A4, který je s PXR úzce spjat. Byla prokázána silná afinita hyperforinu k PXR a následná indukce exprese genu CYP3A4 v lidských jaterních buňkách. Vzhledem k faktu, že látka obsažená v třezalce tečkované má silně indukující vliv na CYP3A4, který metabolizuje většinu předepsaných léčiv, by měla být konzumaci těchto přípravků věnována pozornost (Moore *et al.*, 2000).

V rámci této bakalářské práce byl testován vliv vybraných monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu lidského PXR pomocí reportérové eseje. Charakteristika testovaných látek je uvedena v Tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled testovaných monocyklických monoterpenoidů

Názvy látek	Identifikátor látky CAS No.	Chemická struktura
(S)-(-)-perillylalkohol	18457-55-1	
R-(+)-pulegon	89-82-7	
S-(-)-pulegon	3391-90-0	
(+)-menthol	15356-20-4	
(-)-menthol	2216-51-5	

Pokračování tabulky 1: Přehled testovaných monocyklických monoterpenoidů

Názvy látek	Identifikátor látky CAS No.	Chemická struktura
3-methyl-S-karvon	85710-66-3	
S-karvon	2244-16-8	
R-karvon	6485-40-1	
EN2	43205-82-9	
piperitenon	491-09-8	
piperiton	89-81-6	

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro stanovení cytotoxicity monocyklických monoterpenoidů a pro reportérovou esej byla použita lidská buněčná linie LS180 (ECACC, kat. č. 87021202) odvozená od karcinomu tlustého střeva. Buňky byly kultivovány v kultivační lahvi v inkubátoru při 37 °C v 95% vlhkosti a v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Používané buňky byly kultivovány pomocí média Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) s přídavkem L-glutaminu, neesenciálních aminokyselin, roztoku antibiotik penicilin/streptomycin a fetálního bovinního séra.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- (-)-menthol (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-202705)
- (+)-menthol (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-229843)
- (S)-(-)-perillylalkohol (Sigma-Aldrich, kat. č. 218391-10G)
- EN2 (Enamine, kat. č. ENAH049F21DA)
- 3-methyl-S-karvon (Enamine, kat. č. ENAH049F21DA)
- piperitenon (Enamine, kat. č. EN300-126320)
- piperiton (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-476481)
- R-(+)-pulegon (Merck, kat. č. 8186650010)
- R-karvon (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-293985)
- S-(-)-pulegon (Sigma-Aldrich, kat. č. 328847)
- S-karvon (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-239480)
- 5x reportérový lyzační pufr (Promega, kat. č. E397A)
- dimethylsulfoxid DMSO (Sigma-Aldrich, kat. č. D8418)
- fosfátový pufr Dulbecco's PBS (BioConcept, kat. č. 3-05F29-I)
- FUGENE HD (Roche, kat. č. E231A)
- izopropylalkohol (Lach-Ner, kat. č. 20037-CT0-M1000-1)
- methyltetrazoliová sůl MTT (Sigma-Aldrich, kat. č. M2128)
- rifampicin (Sigma-Aldrich, kat. č. R3501)
- trypanová modř (Sigma-Aldrich, kat. č. T6146-25G)

- trypsin (Sigma-Aldrich, kat. č. T4049)

Použité roztoky a jejich příprava

- 20% Triton X-100 (Serva, kat. č. 37240)
- kultivační médium DMEM (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546)
 - 5 ml L-glutaminu (biosera, kat. č. XC-T1715/100)
 - 5 ml neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)
 - 5 ml roztoku antibiotik penicilin/streptomycin (VWR International, kat. č. 392-0406)
 - 50 ml fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich, kat. č. F7524)
- kultivační médium DMEM-CS (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546)
 - 5 ml L-glutaminu (biosera, kat. č. XC-T1715/100)
 - 5 ml neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)
 - 5 ml roztoku antibiotik penicilin/streptomycin (VWR International, kat. č. 392-0406)
 - 50 ml hormonálně inaktivního fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich, kat. č. F6765)
- luciferin (substrát pro Firefly luciferázu)
 - 1,68 g DTT (Sigma-Aldrich, kat. č. 43819)
 - 100 mg ATP (Sigma-Aldrich, kat. č. A9062)
 - 12,3 mg/66 µl 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich, kat. č. E9884)
 - 13,2 ml Tris-acetát (1M, pH 7,8) (BioBasic Canada Inc., kat. č. TB0194)
 - 30,3 mg/12,3 ml 100 mM MgSO₄ · 7 H₂O (Lach-Ner, kat. č. 30175-AP0)
 - 50 mg D-luciferin (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-207478)
 - 50 mg Koenzym A (Sigma-Aldrich, kat. č. C3144)
 - doplnit deionizovanou vodou do 300 ml

Použité soupravy

- The QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, kat. č. 12243)

4.3 Laboratorní pomůcky

- 96-jamková bílá deska na měření luminiscence (NUNC Denmark)
- 96-jamková kultivační deska (TPP)
- automatické pipety s rozsahem 0,1-2,5 μ l, 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf)
- buničina
- Bürkerova komůrka 0,100 mm (BRAND)
- elektrická nastavitelná pipeta (Eppendorf)
- krycí sklíčka 22x22mm
- mikrozkušavky o objemech 0,5 ml, 1,5 ml, 5 ml (Eppendorf)
- multikanálové pipety s rozsahem 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 30-300 μ l (Eppendorf)
- nastavitelná multikanálová pipeta 15-300 μ l (Eppendorf)
- Petriho misky o objemech 60 ml a 100 ml (Eppendorf)
- pipetor FastPette (Labnet)
- plastové kultivační lahve 75 ml a 150 ml (Eppendorf)
- plastové stojany na zkumavky a mikrozkušavky
- plastové špičky s rozsahem 0,1-10 μ l, 2-200 μ l, 20-300 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf)
- QIArack (QIAGEN, kat. č. 19015)
- sterilní skleněné pipety o objemech 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (SPL Life Sciences)
- zkumavky o objemech 15 ml a 50 ml (Eppendorf)

4.4 Přístroje

- aspirátor FTA-1 (bioSan)
- centrifuga (Centrifuge 5810R, Eppendorf)
- digitální váhy (KERN)
- hlubokomrazicí box (Sanvo)
- chladnička (WHIRPOO)
- inkubátor TH 30 s třepačkou (Edmund Bühler GmbH)
- laboratorní inkubátor CO₂ (NB-203 XL, N-Biotek)
- laminární box Labculture (Box Biohazard Cabinet BIO)
- lednice (354LT)

- multifunkční modulární reader Infinite 200M (Tecan)
- Nanodrop Lite (SN 0599)
- stolní centrifuga Combi-Spin (bioSan)
- světelný mikroskop (Novel Optics)
- třepačka Reax Top (Heidolph)
- vodní lázeň (LCB11D)

4.5 Použité metody

4.5.1 Izolace plazmidu

K izolaci plazmidu z transformovaných bakterií *Escherichia coli* byl použit komerční The QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, kat. č. 12243). Bakteriální suspenze byla centrifugována při 6000 g po dobu 15 minut ve vychlazené centrifuze na 4 °C. Získaný pelet byl resuspendován ve 4 ml pufru P1 a následně byly přidány 4 ml pufru P2. Obsah byl zamíchán 4-6x převrácením falkony a díky LyseBlue reagentu zmodral. Následně byl obsah inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Během inkubace byl nachystán QIArack (QIAGEN, kat. č. 19015) a kolony QIAfilter Cartridge. Po inkubaci byly k lyzátu přidány 4 ml chlazeného pufru P3, obsah byl zamíchán 4-6x převrácením falkony a došlo k odbarvení roztoku. Získaný lyzát byl přenesen do nachystaných kolon QIAfilter Cartridge a byl inkubován 10 minut. Kolony QIAGEN-tip byly kalibrovány promytím 4 ml pufru QBT, který volně prokapal ven. Do kolon QIAfilter Cartridge s lyzátem byly vloženy písty a lyzát byl silou filtrován do připravených kolon QIAGEN-tip umístěných pod kolonami QIAfilter Cartridge. Kolony QIAGEN-tip byly promyty 2x 10 ml puftrem QC. Izolovaná DNA byla eluována 5 ml puftrem QF do 15 ml falkon. DNA byla precipitována přidáním 3,5 ml isopropanolu, obsah byl promíchán a centrifugován ve vychlazené centrifuze na 4 °C při 15 000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet byl sušen na vzduchu 5-10 minut. Koncentrace získaného plazmidu byla změřena pomocí spektrometru Nanodrop. DNA byla následně rozpuštěna v deionizované PCR grade H₂O ve zkumavce podle hodnoty získané koncentrace a byla uskladněna v mrazáku v -20 °C.

4.5.2 Kultivace a pasážování buněk

Buňky LS180 byly kultivovány v kultivační láhvi v inkubátoru při 37 °C v 95% vlhkosti a v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Pasážování probíhalo za přísně sterilních

podmínek v laminárním boxu. DMEM médium a 1x PBS byly předem vyhřáty ve vodní lázni na 37 °C. Z kultivační láhve bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty 5 ml 1x PBS. Po jeho odsátí byl na buňky napipetován 1 ml 0,25% trypsinu a kultivační láhev s buňkami byla umístěna na 5 minut do inkubátoru k trypsinizaci při 37 °C. Po trypsinizaci byla kultivační láhev s buňkami přesunuta zpět do laminárního boxu a buňky byly resuspendovány v 9 ml média o dno kultivační láhve. Resuspendované buňky byly přepipetovány do plastové zkumavky, ze které byly odebrány 2 ml a byly vráceny do kultivační láhve společně s 18 ml média. Kultivační láhev byla umístěna zpátky do inkubátoru. Buňky byly pasážovány vždy každý třetí nebo čtvrtý den.

4.5.3 Příprava buněk na experiment

Buňky musely být vždy před experimentem zasazovány a resuspendovány. Po pasážování byla suspenze buněk přenesena do falkony, ze které bylo přepipetováno 10 µl suspenze buněk do mikrozkušavky a následně do ní bylo připipetováno 90 µl trypanové modři. Po promíchání byla směs nanášena do Bürkerovy komůrky a buňky byly pozorovány pod světelným mikroskopem pro zjištění jejich množství. Z tohoto údaje byla vypočítána jejich koncentrace. Pro MTT test bylo nutné suspenzi buněk naředit DMEM médiem tak, aby 1 jamka 96-jamkové desky obsahovala 30 000 buněk pro 24 hodinový test. U luciferázové reportérové eseje bylo nutné suspenzi buněk naředit DMEM-CS médiem tak, aby 1 jamka 96-jamkové desky obsahovala 25 000 buněk pro 24 hodinový test. Pro luciferázovou reportérovou esej bylo nutné buňky před aplikací testovaných látek transfekovat. Buňky byly vysety na 96-jamkovou desku a umístěny do inkubátoru k 24 hodinové inkubaci při 37 °C, 95% vlhkosti a atmosféře obsahující 5 % CO₂. Po inkubaci bylo médium odsáto z jamek a byly aplikovány testované látky.

4.5.4 Transfekce buněk

Buňky LS180 byly pro luciferázovou reportérovou esej při testování transkripční aktivity receptoru PXR transfekovány plazmidem pSG5-hPXR a reportérovým vektorem p3A4-luc (Goodwin *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2007) pomocí transfekčního činidla FUGENE HD. Transfekční směs byla připravena tak, aby byl FUGENE HD a DNA v poměru 3:1. Počet vysetých buněk činil 25 000 buněk na 1 jamku 96-jamkové desky. Množství transfekční směsi bylo vypočteno tak, aby na 1 jamku 24-jamkové desky bylo vyseto 75 000 buněk. Tento výpočet

odpovídá množství látek potřebných pro vyšetí 25 000 buněk na 3 jamky 96-jamkové desky. Množství jednotlivých použitých látek na přípravu transfekční směsi je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Množství látek pro přípravu transfekční směsi

Použité látky	Množství na 75 000 buněk
Optimem	20 μ l
FUGENE HD	1,2 μ l
p3A4-luc	0,3 μ g
pSG5-hPXR	0,1 μ g

Pro přípravu transfekční směsi bylo nejprve smícháno činidlo FUGENE HD s Optimem v mikrozkuhavce a látky byly ponechány 5-minutové inkubaci. Mezitím byl v mikrozkuhavce smíchán plazmid pSG5-hPXR s reportérovým vektorem p3A4-luc. Následně byla směs FUGENE HD s Optimem přidána ke směsi plazmidu a reportérového vektoru a byla 15 minut inkubována. Transfekční směs byla po inkubaci smíchána se suspenzí buněk, která byla naředěna DMEM-CS médiem. Směs byla vyseta na 96-jamkovou desku po 200 μ l. Deska byla 24 hodin inkubována v inkubátoru při 37 °C, 95% vlhkosti a atmosféře obsahující 5 % CO₂. Po inkubaci bylo médium z jamek odsáto a byly aplikovány testované látky.

4.5.5 Aplikace monocyklických monoterpenoidů a kontrol na buňky

Monocyklické monoterpenoidy byly rozpuštěny v 99,8% EtOH a naředěny na zásobní roztoky v testovaných koncentracích. Zásobní roztoky bylo nutné při aplikaci látek na 96-jamkové desky 1000x zředit DMEM médiem na koncentrace 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M a 1000 μ M pro MTT a na koncentrace 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M a 1000 μ M pro luciferázovou reportérovou esej. U luciferázové reportérové eseje pro stanovení transkripční aktivity PXR receptoru byly látky ředěny DMEM-CS médiem.

Pro MTT test bylo použito DMEM médium jako negativní kontrola (UT) a 2% triton X-100 jako pozitivní kontrola. Testované látky s kontrolami byly aplikovány v pentaplikátu po 200 μ l na jamku a následně byla 96-jamková deska umístěna do inkubátoru po dobu 24 hodin.

Pro luciferázovou reportérovou esej, díky které byla testována aktivita PXR, bylo použito DMEM-CS médium s rifampicinem jako pozitivní kontrolou a DMEM-CS (UT) jako

negativní kontrolou. Testované látky s kontrolami byly aplikovány v tetraplikátu po 200 μ l na jamku a následně byla 96-jamková deska umístěna do inkubátoru po dobu 24 hodin.

4.5.6 MTT test

Metoda MTT testu slouží ke studiu vlivu látek na buňky. Pomocí ní lze určit, při jak velkých koncentracích jsou testované látky pro buňky toxické. Test je založen na funkci dehydrogenáz, které jsou v mitochondriích aktivní pouze pokud je buňka živá a nepoškozená. Při MTT testu dochází k redukci žlutě zbarvené methyltetrazoliové soli na fialový formazan díky aktivitě dehydrogenáz. Vyhodnocení probíhá pomocí spektrofotometrického měření absorbance při 570 nm. Měřením intenzity vzniklého zbarvení lze určit životaschopnost buněk, která je přímo úměrná absorbanci.

Buňky byly inkubovány 24 hodin s testovanými látkami v 96-jamkové desce. Testované látky byly aplikovány v pentaplikátech. Po inkubaci byly látky z desky vyklepnuty a deska byla usušena vyklepáním na buničinu. Jamky byly promyty 1x PBS, který byl následně opět vyklepnut. Po osušení desky bylo do jamek napipetováno po 100 μ l MTT, které bylo předem 10x zředěno DMEM médiem ze zásobního roztoku o koncentraci 3 mg/ml na výslednou koncentraci 0,3 mg/ml. Deska byla umístěna do inkubátoru přibližně na 20-30 minut, během kterých došlo k vytvoření modro-fialově zbarvených krystalů. Po inkubaci byl obsah desky vyklepnut, deska byla usušena a do jamek bylo napipetováno po 50 μ l DMSO. Deska byla lehce protřepána, aby došlo k rozpuštění krystalů v DMSO a následně byla pomocí spektrofotometru Tecan Infinite 200M změřena absorbance při vlnové délce 570 nm. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny.

4.5.7 Luciferázová reportérová esej

Luciferázová reportérová esej je metoda, díky které lze zjistit, jaký mají určité látky vliv na transkripční aktivitu jaderných receptorů. Metoda je založena na oxidaci D-luciferinu, při které vzniká určité množství emitovaného světla. To se následně měří spektrofotometricky a platí, že množství emitovaného světla je přímo úměrné transkripční aktivitě receptorů. Luciferin je oxidován díky enzymu luciferáza, jehož gen je exprimován při navázání aktivního receptoru na promotor. K navázání je nutné do buněčné linie transfekovat reportérový vektor p3A4-luc s genem pro luciferázu a s promotorem obsahujícím PXR-responzivní element.

Buňky s testovanými látkami byly inkubovány po dobu 24 hodin v 96-jamkových deskách. Testované látky byly aplikovány v tetraplikátech. Po jejich inkubaci byly látky vyklepnuty a jamky byly promyty 50 μ l 1x PBS, následně se 1x PBS z desek vyklepnul a deska byla osušena vyklepáním na buničinu. Do jamek bylo napipetováno po 25 μ l reportérového lyzačního pufru. Desky byly umístěny do mrazícího boxu při -80 °C na minimální dobu 20 minut. Po úplném zamražení reportérového lyzačního pufru v jamkách byly desky umístěny na třepačku pro rozmražení a rovnoměrné promíchání. Lyzát byl přepipetován po 6 μ l do bílé 96-jamkové desky, následně k němu bylo napipetováno 30 μ l substrátu s D-luciferinem. Luminiscence byla změřena ve spektrofotometru Tecan Infinite 200M v programu I-Controll a naměřené hodnoty byly vyhodnoceny.

4.5.8 Vyhodnocení experimentálních dat

Testování vlivu látek na životaschopnost buněk metodou MTT bylo provedeno ve třech nezávislých opakováních. Z naměřených zprůměrovaných hodnot byla stanovena životaschopnost buněk, která je uvedena v procentech vztažených vždy k DMEM (UT) jakožto negativní kontrole, která odpovídala 100% životnosti buněk. Byly vypočítány směrodatné odchylky měření všech testovaných látek a jejich koncentrací. Pro ověření byly výsledky statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu a hvězdičkou byly v příslušném grafu zaznačeny koncentrace, kde byla p-value < 0,05.

Testování vlivu látek na transkripční aktivitu PXR metodou luciferázové reportérové eseje bylo provedeno ve třech nezávislých opakováních. Získané hodnoty byly zprůměrovány a luciferázová aktivita byla vyjádřena jako procenta indukce rifampicinem po působení zkoumaných látek. Ty byly v agonistickém módu vztaženy vůči aktivitě rifampicinu a v antagonistickém módu k aktivitě nejnižší koncentrace testované látky (0,1 μ M). Jako negativní kontrola sloužilo DMEM (UT). Byly vypočítány směrodatné odchylky měření všech testovaných látek a jejich koncentrací. Pro ověření byly výsledky statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu a hvězdičkou byly v příslušném grafu zaznačeny koncentrace, kde byla p-value < 0,05. Všechny grafy, výpočty hodnot EC₅₀ a statistická analýza byly provedeny v programu GraphPad 7.4 (La Jolla, CA, USA).

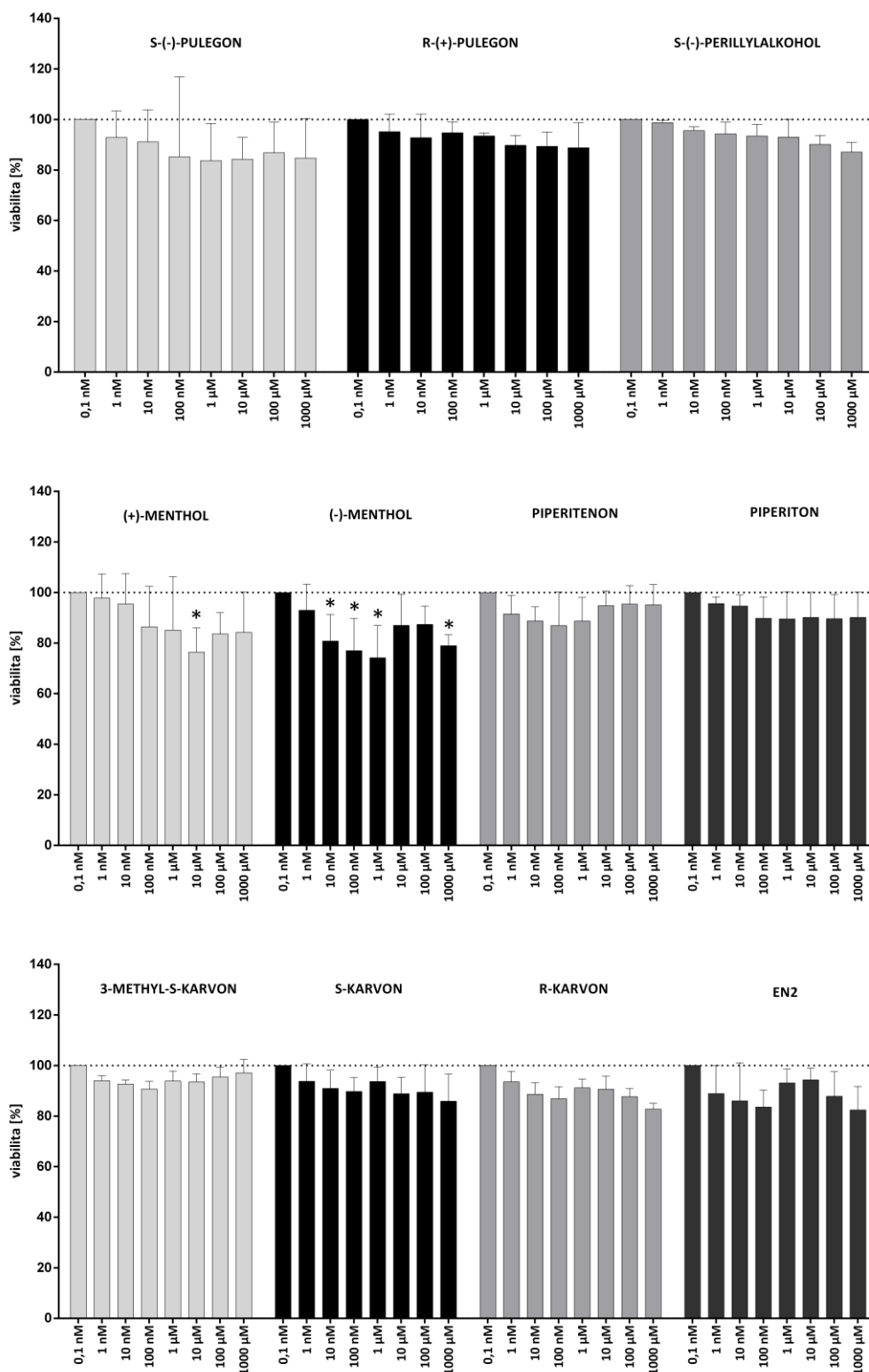
5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení cytotoxicity účinků monocyklických monoterpenoidů na buněčnou linii LS180

K stanovení životaschopnosti buněčné linie LS180, která byla vystavena monocyklickým monoterpenoidům po dobu 24 hodin, byl použit MTT test. Měření probíhalo v pentaplikátu a hodnoty byly zprůměrovány ze tří na sobě nezávislých experimentů.

Z výsledků lze určit, že u žádné koncentrace všech testovaných látek nedošlo k poklesu životaschopnosti pod 70 % (Obr. 4). Největší pokles životaschopnosti buněk byl pozorován u (-)-mentholu, kdy procento životaschopnosti při koncentraci 1 μM kleslo na $74,2 \pm 12,7$ % (Obr. 4). Životnost buněk v dalších dvou vyšších koncentracích vzrostla až o 13 %. Podobný trend lze pozorovat u (+)-mentholu a piperitenonu. U ostatních testovaných monocyklických monoterpenoidů se životaschopnost buněčné linie u většiny koncentrací pohybovala kolem 90 %.

Z výsledků vyplývá, že žádná z testovaných látek nebyla pro buněčnou linii LS180 cytotoxická a mohly tak být využity k testování jejich vlivu na transkripční aktivitu PXR. Po posouzení výsledných hodnot životaschopnosti buněčné linie LS180 po provedení testu MTT bylo vybráno pět koncentrací, které byly dále použity pro měření transkripční aktivity PXR metodou luciferázové reportérové eseje. Jednalo se o koncentrace 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM a 1000 μM .



Obrázek 4: Vliv monocyklických monoterpenoidů na životaschopnost buněk LS180 po působení 24 hodin

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu, hodnoty označené * jsou koncentrace, při kterých bylo $p\text{-value} < 0,05$.

5.2 Vliv monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR

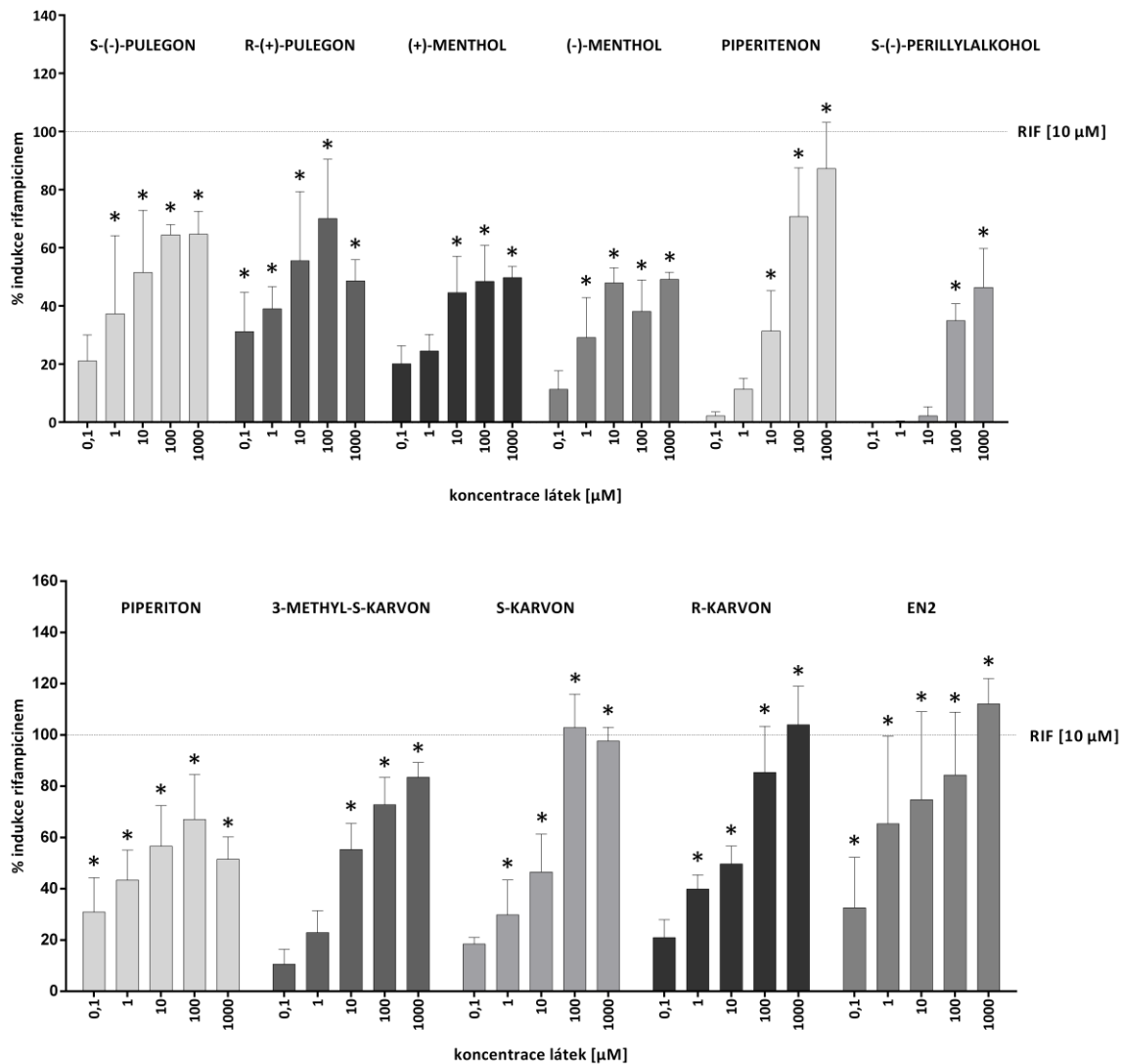
Pro měření vlivu monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR byla použita luciferázová reportérová esej. Měření probíhalo ve dvou módech – v agonistickém a antagonistickém. V agonistickém módu byly na buněčnou linii LS180 aplikovány pouze zředěné látky v DMEM-CS médiu v testovaných koncentracích. V antagonistickém módu byly na buněčnou linii LS180 aplikovány látky zředěné v DMEM-CS médiu, ke kterým byl přidán rifampicin o koncentraci 10 μM . Látky v obou módech působily 24 hodin. Měření probíhalo v kvadruplikátu a hodnoty byly zprůměrovány ze tří na sobě nezávislých experimentů.

5.2.1 Agonistický mód

Jako pozitivní kontrola byl zvolen modelový agonista rifampicin o koncentraci 10 μM , který odpovídal 100 % aktivaci transkripční aktivity PXR. Hodnoty byly vztaženy k rifampicinu, který sloužil jako pozitivní kontrola.

Mezi látky s nejvyšším nárůstem indukce lze považovat S-karvon, R-karvon, EN2 a piperitenon. S-karvon v nejnižší koncentraci 0,1 μM indukoval transkripční aktivitu PXR na $18,4 \pm 2,6$ % a ve druhé nejvyšší testované koncentraci 100 μM dosáhla procenta indukce až $102,8 \pm 13$ %. Látka R-karvon, která je vzájemně stereoizomerem S-karvonu, dosáhla indukce $20,9 \pm 6,9$ % při 0,1 μM a 104 ± 15 % při nejvyšší koncentraci 1000 μM (Obr. 5). Zajímavým porovnáním vůči R-karvonu je S(-)-pulegon, který při 0,1 μM indukoval transkripční aktivitu PXR také při podobné procentuální hodnotě $21 \pm 8,9$ %, ovšem jeho nejvyšší nárůst indukce byl pouze $64,6 \pm 7,8$ % při 1000 μM (Obr. 5). Další látkou s překvapivě rychlým nárůstem indukce s rostoucí koncentrací byl piperitenon. Přestože při 0,1 μM odpovídala hodnota pouze $2,1 \pm 1,3$ % indukce transkripční aktivity PXR, s rostoucí koncentrací se procenta indukce prudce zvyšovala a při 100 μM se již pohybovala na $70,6 \pm 16,8$ % indukce. V nejvyšší koncentraci 1000 μM vzrostla indukce ještě o 17 % na $87,2 \pm 15,8$ % (Obr. 5). Jako látku s nejnižším účinkem na transkripční aktivitu PXR v rámci této práce lze považovat S(-)-perillylalkohol, jehož první dvě nejnižší koncentrace vykazovaly velice nízkou, až nulovou indukci. V nejvyšší koncentraci 1000 μM však došlo k nárůstu indukce na $46,3 \pm 13,3$ % (Obr. 5). Oba izomery mentholu, (+)-menthol a (-)-menthol, měly ve většině měřených koncentrací podobnou účinnost. Při koncentraci 10 μM byla indukce u (+)-mentholu na hodnotě $44,5 \pm 12,5$ %, při stejné koncentraci byla indukce u (-)-mentholu naměřená na $47,9 \pm 5,2$ %. U nejvyšší koncentrace 1000 μM odpovídala hodnota indukce

(+)-mentholu $49,7 \pm 3,8$ %, která je skoro totožná s hodnotou u (-)-mentholu, kdy při $1000 \mu\text{M}$ byla indukce $49,1 \pm 2,4$ % (Obr. 5). U některých látek lze pozorovat pokles hodnoty indukce v poslední testované koncentraci $1000 \mu\text{M}$, tento jev lze zdůvodnit faktem, že látka v této koncentraci již mohla mít mírný cytotoxický efekt na buňky, ovšem ne letální.



Obrázek 5: Vliv monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR v buněčné linii LS180 po působení 24 hodin v agonistickém módu

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu, hodnoty označené * jsou koncentrace, při kterých bylo $p\text{-value} < 0,05$.

U testovaných látek byla vypočtena hodnota EC₅₀. Látky s nejnižší hodnotou EC₅₀ jsou EN2, R-(+)-pulegon, piperiton, (-)-menthol a (+)-menthol. Naopak látky s nejvyšší hodnotou EC₅₀ jsou S(-)-perillylalkohol, piperitenon a S-karvon. Všechny hodnoty EC₅₀ jsou zaznamenány v Tabulce 3.

Tabulka 3: Hodnoty EC₅₀ testovaných monocyklických monoterpenoidů

Látka	Hodnota EC ₅₀ [μM]
(S)-(-)-perillylalkohol	26,15 ± 0,50
R-(+)-pulegon	0,69 ± 3,70
S(-)-pulegon	3,96 ± 11,51
(+)-menthol	0,80 ± 0,31
(-)-menthol	0,79 ± 0,49
3-methyl-S-karvon	4,56 ± 0,46
S-karvon	19,26 ± 10,25
R-karvon	5,77 ± 2,63
EN2	0,27 ± 4,24
piperitenon	21,02 ± 14,97
piperiton	0,75 ± 0,09

Data jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů a vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

Mezi látky, které vykazují silnou indukci PXR a zároveň mají nízkou hodnotu EC₅₀, lze zařadit R-karvon s hodnotou EC₅₀ 5,77 ± 2,63 μM, dále 3-methyl-S-karvon s hodnotou EC₅₀ 4,56 ± 0,46 μM a nakonec EN2 s hodnotou EC₅₀ 0,27 ± 4,24 μM. Látka, která má nejmenší vliv na indukci PXR, je S(-)-perillylalkohol s hodnotou EC₅₀ 26,15 ± 0,50 μM.

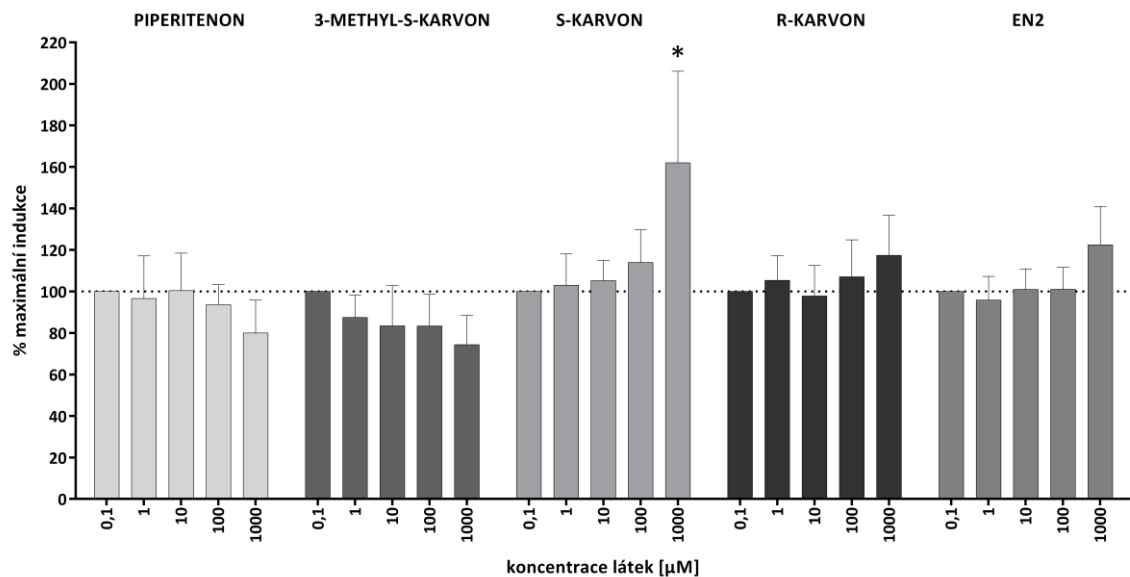
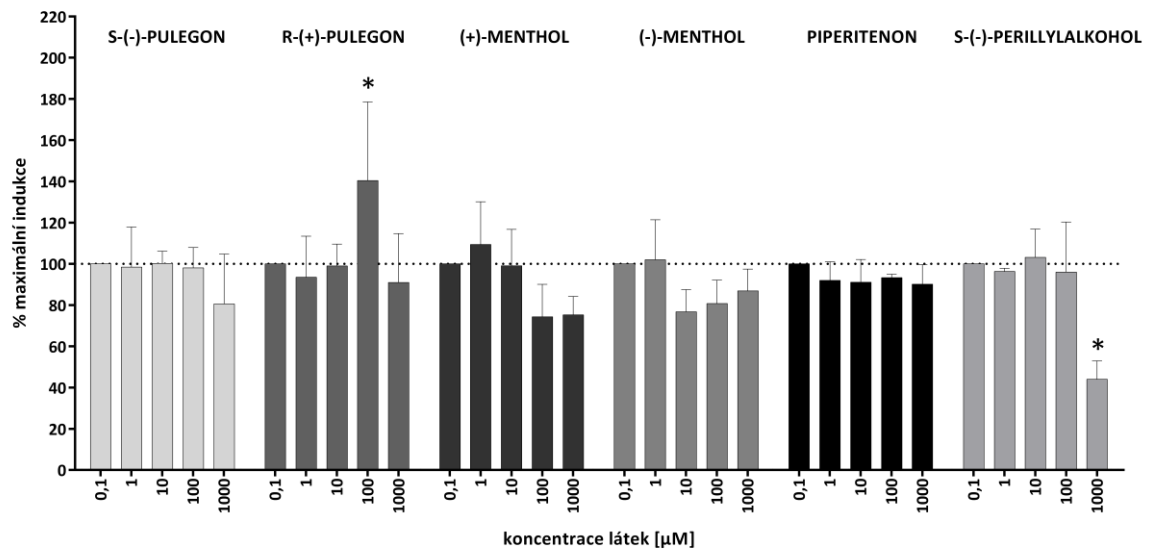
5.2.2 Antagonistický mód

Jako pozitivní kontrola byl použit rifampicin o koncentraci 10 μM , hodnoty byly vztaženy k nejnižší testované koncentraci 0,1 μM a vyjádřeny v procentech maximální indukce, tj. v procentech RIF. Jako negativní kontrola sloužilo DMEM-CS (UT).

U většiny testovaných látek nebyl pozorován signifikantní antagonistický efekt. Procenta maximální indukce u většiny měřených koncentrací testovaných látek neklesla pod 90 %. U některých látek se projevil mírný pokles indukce transkripční aktivity PXR hlavně v nejvyšší koncentraci 1000 μM , konkrétně se jednalo o látky S(-)-pulegon, (+)-menthol, S(-)-perillylalkohol, piperitenon a 3-methyl-S-karvon (Obr. 6). Největší pokles indukce v rámci celého měření lze vidět u S(-)-perillylalkoholu, kdy při 1000 μM kleslo procento indukce na $43,9 \pm 8,9$ % (Obr. 6). Mírný pokles indukce lze také pozorovat u 3-methyl-S-karvonu, při 1000 μM byla hodnota indukce na $74,3 \pm 14$ %, tento pokles nebyl signifikantní a 3-methyl-S-karvon nemá antagonistický vliv na transkripční aktivitu PXR (Obr. 6). Tyto poklesy lze zdůvodnit mírnou toxicitou testovaných koncentrací.

V některých případech hodnoty dokonce převýšily 100 % indukce, např. u látky R(+)-pulegon byla naměřena hodnota $140,3 \pm 38,2$ % při 100 μM (Obr. 6). Podobný nárůst lze také vidět u S-karvonu, R-karvonu a EN2. Tyto nárůsty nicméně nevykazují na dávce závislý trend a nejsou tudíž nijak významné.

Vzhledem k faktu, že u žádné z testovaných látek nebyl pozorován výrazný pokles maximální indukce, lze konstatovat, že testované látky nejsou antagonisty PXR.



Obrázek 6: Vliv monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR v buněčné línii LS180 po působení 24 hodin v antagonistickém módu

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu, hodnoty označené * jsou koncentrace, při kterých bylo $p\text{-value} < 0,05$.

6 DISKUZE

V posledních letech je věnována pozornost sledování vlivu přírodních sloučenin na transkripční aktivitu receptorů jako např. PXR, AhR a GR. Tyto receptory se podílejí na regulaci důležitých fyziologických procesů organismu a regulují expresi genů, které jsou zapojeny do metabolismu xenobiotik, zánětlivých procesů a metabolických drah probíhajících především v játrech a ve střevech. Předmětem těchto studií byl především vliv esenciálních olejů a monoterpenoidů na transkripční aktivitu receptorů a ovlivnění exprese enzymů CYP450 (Bartoňková *et Dvořák*, 2018a; Bartoňková *et Dvořák*, 2018b; Bartonkova *et Dvorak* 2018c; Ondrová *et al.*, 2023).

V této bakalářské práci byl sledován vliv monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu pregnanového X receptoru s využitím lidské buněčné linie LS180, což je linie odvozená od karcinomu tlustého střeva. K provedení reportérové eseje byla buněčná linie LS180 transfekována expresním plazmidem pSG5-hPXR a reportérovým vektorem p3A4-luc, které byly izolovány z transformovaných bakterií *Escherichia coli*. Vybranými testovanými látkami byly (S)-(-)-perillylalkohol, R-(+)-pulegon, S-(-)-pulegon, (+)-menthol, (-)-menthol, S-karvon, R-karvon, piperitenon, piperiton, EN2 a 3-methyl-S-karvon.

Nejprve byly provedeny experimenty pomocí MTT testu, aby bylo zjištěno, zdali mají testované látky cytotoxický účinek na lidskou buněčnou linii LS180. Z výsledků vyplývá, že žádný z monocyklických monoterpenoidů při použitých koncentracích nebyl pro buněčnou linii LS180 cytotoxický. Ve studii Bartoňková *et Dvořák* (2018a) bylo mimo jiné testováno, jestli mají esenciální oleje vybraných druhů koření vliv na životaschopnost vybraných buněčných linií. MTT test byl proveden na lidskou buněčnou linii LS180, která byla použita i v této bakalářské práci. Z testovaných 31 esenciálních olejů mělo 9 cytotoxický efekt na LS180, přičemž životaschopnost klesala ve většině případů od koncentrace 50 µg/ml a pokračovala v poklesu u koncentrací 100 a 250 µg/ml. Mezi kořeními, jejichž esenciální oleje byly testovány a byl pozorován cytotoxický efekt, byla skořice, hřebíček, koriandr, citronová tráva, libeček, oregano, tymián, kurkuma a sporýš. U zbylých 22 testovaných esenciálních olejů nebyly pozorovány cytotoxické účinky. Výsledky z citované studie však nelze úplně porovnávat s výsledky z této bakalářské práce, jelikož esenciální oleje jsou směsí mnoha složek, kdežto v této práci bylo pracováno pouze s vybranými jednotlivými monocyklickými monoterpenoidy. Na základě informace od dr. Zůvalové byly všechny látky testované v rámci této bakalářské práce netoxické i v buněčné linii AZ-AhR (Novotna *et al.*, 2011). Je to stabilně transfekovaná

buněčná linie HepG2, odvozená od karcinomu jater. Testování probíhalo po 24-hodinové inkubaci (Zůvalová, osobní sdělení, 19. dubna 2024).

Další provedené experimenty v rámci této bakalářské práce byly zaměřeny na testování účinků vybraných monocyklických monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR pomocí luciferázové reportérové eseje (Obr. 5 a 6). Vliv testovaných látek byl měřen v agonistickém a v antagonistickém módu vždy po 24hodinovém působení. Po vyhodnocení lze říci, že všechny testované látky aktivovaly PXR. Nejvyšší nárůst indukce v agonistickém módu byl pozorován u látek piperitenonu, 3-methyl-S-karvonu, R-karvonu a EN2. Nejnižší nárůst indukce byl naměřen u S(-)-perillylalkoholu. Z výsledků při měření v antagonistickém módu vyplývá, že žádná z testovaných látek nevykazuje antagonistický účinek, jelikož nebyl pozorován výrazný pokles procent maximální indukce.

Studie Bartonkova *et* Dvorak (2018c) se zabývala tím, jak ovlivňují vybrané esenciální oleje transkripční aktivitu PXR. Látky byly testovány na lidské buněčné linii LS180. Všechny 31 testovaných esenciálních olejů aktivovalo PXR. Dále bylo testováno, zdali mají testované esenciální oleje antagonistický účinek v přítomnosti 10 μ M rifampicinu. K výraznému poklesu indukce PXR došlo u vyšších testovaných koncentrací u 20 z 31 testovaných látek. Jednalo se např. o látky kmínu, hřebíčku, koriandru, kopru, zázvoru a mnoha dalších. U většiny nižších testovaných koncentrací však procenta indukce nijak výrazně neklesla, což se dá pozorovat i u testovaných monocyklických monoterpenoidů v této bakalářské práci. Výsledky citované studie s výsledky této bakalářské práce se nedají přímo porovnat, protože esenciální oleje obsahují více složek, kdežto v této práci bylo pracováno pouze s jednotlivými monocyklickými monoterpenoidy. Některé z testovaných monocyklických monoterpenoidů jsou však přítomny v esenciálních olejích, které byly ve studii testovány. Jedná se např. o esenciální olej máty peprné (*Mentha piperita*), který obsahuje látku menthol. Ve studii je úroveň indukce PXR esenciálním olejem z máty peprné srovnatelná, jako úroveň indukce obou izomerů mentholu v této práci.

Jediným dosud publikovaným zdrojem informací v literatuře zabývajícím se studiem vlivu testovaných monoterpenoidů na transkripční aktivitu PXR je studie Hoshino *et al.* (2014). V rámci této publikace byl testován vliv mentholu na expresi proteinů rodiny CYP450 a zdali má menthol vliv na jadernou translokaci PXR. Z výsledků je zřejmé, že menthol ve 100 μ M koncentraci zvyšuje expresi PXR a CAR cílových genů *CYP2C* a *CYP3A* na úrovni mRNA v HepaRG buňkách. Také působí na myší jaterní buňky, ve kterých indukuje jadernou translokaci PXR a zároveň byla signifikantně zvýšená exprese *MRP3* genu, cílového genu PXR.

Tyto výsledky ukazují vliv mentholu na PXR a jsou konzistentní s výsledky zjištěnými v rámci této bakalářské práce.

Pro jakoukoliv praktickou aplikaci je cross-talk s jinými jadernými receptory nežádoucí. Je tedy nutné zkoumat také interakce testovaných látek s ostatními jadernými receptory. Na základě informace od dr. Zůvalové jsou všechny testované látky v této bakalářské práci, kromě (-)-mentholu a (+)-mentholu, antagonisté lidského AhR (Zůvalová, osobní sdělení, 19. dubna 2024). Vliv R- a S-karvonu na transkripční aktivitu AhR byl detailně popsán v publikaci Ondrová *et al.* (2023), kdy bylo zjištěno, že S-karvon i R-karvon jsou nekompetitivními antagonisty lidského AhR blokujícími tvorbu heterodimeru AhR-ARNT. K zajímavému výsledku týkajícího se vlivu monocyklického monoterpenoidu mentholu došla studie Michalíková *et al.* (2019), kde byl testován vliv antimikrobiálních látek v produktech pro péči o chrup. Pomocí metody androgenic recombinant yeast assay bylo zjištěno, že menthol má slabý indukující efekt na androgenní receptor (AR). V roce 2021 byl (-)-menthol popsán jako induktor transkripční aktivity glukokortikoidního receptoru (GR) (Ryu *et al.*, 2021). Z výše uvedeného je patrná důležitost studia interakce monoterpenoidů testovaných v rámci této bakalářské práce s dalšími jadernými a steroidními receptory.

Při shrnutí dosažených výsledků této bakalářské práce lze říci, že testované monocyklické monoterpenoidy mají vliv na aktivaci PXR a tím by mohly indukovat expresi jeho cílových genů. Díky těmto výsledkům lze říci, že jednotlivé složky esenciálních olejů by mohly mít vliv na metabolismus endogenních látek i léčiv a zasahovat tak do lékových interakcí. Tuto problematiku je tak potřeba v budoucnu dále studovat a provádět další výzkumy nejen s ohledem na PXR, ale i na ostatní jaderné receptory.

Mezi doporučení pro budoucí výzkum k prohloubení znalostí této tematiky by se dalo zařadit např. zkrácení času inkubace při provádění experimentů na 8 nebo 12 hodin. Dalšími doporučeními by bylo provést analýzu exprese cílových genů PXR, tedy *CYP3A4* a *MDR1*, jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu.

7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl testován vliv S-(-)-pulegonu, R-(+)-pulegonu, (+)-mentholu, (-)-mentholu, piperitenonu, S-(-)-perillylalkoholu, piperitonu, 3-methyl-S-karvonu, R-karvonu, S-karvonu a EN2 na transkripční aktivitu lidského pregnanového X receptoru (PXR).

Nejprve byla zjišťována životaschopnost lidské buněčné linie LS180 pomocí MTT testu po aplikaci testovaných látek. Žádná z testovaných látek ve všech testovaných koncentracích nevykazovala cytotoxický efekt.

Dále byl testován vliv těchto látek na transkripční aktivitu PXR v buněčné linii LS180 v agonistickém a v antagonistickém módu po 24hodinovém působení. Výsledků bylo dosaženo pomocí luciferázové reportérové eseje. V agonistickém módu bylo zjištěno, že všechny látky aktivují PXR. Největší vliv na indukci PXR měly látky R-karvon, 3-methyl-S-karvon a EN2. Naopak nejnižší vliv na indukci PXR měla látka S-(-)-perillylalkohol. Z výsledků měření v antagonistickém módu vyplývá, že žádná z testovaných látek není antagonistou PXR, jelikož u žádné z testovaných látek v kombinaci s modelovým ligandem rifampicinem nebyl pozorován výrazný pokles luciferázové aktivity.

Výsledky této práce najdou uplatnění při studiu vlivu přirozeně se vyskytujících látek v rostlinách na metabolismus léčiv a při studiu lékových interakcí. Výsledky také mohou pomoci prohloubit znalost vzniku a potenciálně i léčby zánětlivých procesů a onemocnění střev, např. Crohnovy choroby a dalších metabolických poruch, které jsou s regulací PXR úzce spjaty.

8 LITERATURA

Abdallah, I.I., Quax, W.J. (2017): A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. *KnE Life Sciences*, 3(5): 81

Alam, A., Locher, K.P. (2023): Structure and Mechanism of Human ABC Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 52(1): 275–300

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446–475

Bartoňková, I., Dvořák, Z. (2018a): Assessment of endocrine disruption potential of essential oils of culinary herbs and spices involving glucocorticoid, androgen and vitamin D receptors. *Food & Function*, 9(4): 2136–2144

Bartonkova, I., Dvorak, Z. (2018c): 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

Bartoňková, I., Dvořák, Z. (2018b): 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

Bergman, M.E., Davis, B., Phillips, M.A. (2019): Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules*, 24(21): 3961

Blumberg, B., Sabbagh, Jr., W., Juguilon, H., Bolado, Jr., J., van Meter, M.C., Ong, S.E., Evans, M.R. (1998): SXR, a novel steroid and xenobioticsensing nuclear receptor. *Genes & Development*, 12(20): 3195–3205

Buchman, C.D., Chai, S.C., Chen, T. (2018): A current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 14(6): 635–647

Cai, X., Young, G.M., Xie, W. (2021): The xenobiotic receptors PXR and CAR in liver physiology, an update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1867(6): 166101

- Chang, T.K., Yu, L., Maurel, P., Waxman, D.J. (1997): Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Research*, 57(10): 1946–1954
- Conde, I., Lobo, V.T.M., Zamora, J., Pérez, J., González, F.J., Alba, E., Fraile, B., Paniagua, R., Arenas, M.I. (2008): Human pregnane X receptor is expressed in breast carcinomas, potential heterodimers formation between hPXR and RXR-alpha. *BMC Cancer*, 8(1): 174
- Coughtrie, M.W.H. (2016): Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (SULT) family. *Chemico-Biological Interactions*, 259: 2–7
- Currie, G.M. (2018): Pharmacology, Part 1: Introduction to Pharmacology and Pharmacodynamics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46(2): 81–86
- Desai, P.B., Nallani, S.C., Sane, R.S., Moore, L.B., Goodwin, B.J., Buckley, D.J., Buckley, A.R. (2002): Induction of Cytochrome P450 3A4 in Primary Human Hepatocytes and Activation of the Human Pregnane X Receptor by Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(5): 608–612
- Dvořák, Z., Sokol, H., Mani, S. (2020): Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(12): 900–908
- Estudante, M., Morais, J.G., Soveral, G., Benet, L.Z. (2013): Intestinal drug transporters: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10): 1340–1356
- Falany, C.N. (1997): Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *The FASEB Journal*, 11(4): 206–216
- Fiorucci, S., Rizzo, G., Donini, A., Distrutti, E., Santucci, L. (2007): Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 13(7): 298–309
- Gao, J., Xie, W. (2010): Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor at the Crossroads of Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12): 2091–2095

Goodwin, B., Hodgson, E., Liddle, C. (1999): The Orphan Human Pregnane X Receptor Mediates the Transcriptional Activation of *CYP3A4* by Rifampicin through a Distal Enhancer Module. *Molecular Pharmacology*, 56(6): 1329–1339

Goulart, R. (2022): Can vitamin D induce remission in patients with inflammatory bowel disease?. *Annals of Gastroenterology*, 35: 1-10

Gupta, D., Venkatesh, M., Wang, H., Kim, S., Sinz, M., Goldberg, G.L., Whitney, K., Longley, C., Mani, S. (2008): Expanding the Roles for Pregnane X Receptor in Cancer: Proliferation and Drug Resistance in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(17): 5332–5340

Hall, A., Chanteux, H., Ménochet, K., Ledecq, M., Schulze, M.E.D. (2021): Designing Out PXR Activity on Drug Discovery Projects: A Review of Structure-Based Methods, Empirical and Computational Approaches. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(10): 6413–6522

Honkakoski, P., Sueyoshi, T., Negishi, M. (2003): Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR. *Annals of Medicine*, 35(3): 172–182

Hoshino, M., Ikarashi, N., Tsukui, M., Kurokawa, A., Naito, R., Suzuki, M., Yokobori, K., Ochiai, T., Ishii, M., Kusunoki, Y., Kon, R., Ochiai, W., Wakui, N., Machida, Y., Sugiyama, K. (2014): Menthol reduces the anticoagulant effect of warfarin by inducing cytochrome P450 2C expression. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56: 92–101

Huang, H., Wang, H., Sinz, M., Zoeckler, M., Staudinger, J., Redinbo, M.R., Teotico, D.G., Locker, J., Kalpana, G.V., Mani, S. (2007): Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketoconazole. *Oncogene*, 26(2): 258–268

Huijbers, M.M.E., Montersino, S., Westphal, A.H., Tischler, D., van Berkel, W.J.H. (2014): Flavin dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544: 2–17

Ihunnah, C.A., Jiang, M., Xie, W. (2011): Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(8): 956–963

Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E. (2010): PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES. *Biomedical Papers*, 154(2): 103–116

Johnson, D.R., Li, C.W., Chen, L.Y., Ghosh, J.C., Chen, J.D. (2006): Regulation and Binding of Pregnane X Receptor by Nuclear Receptor Corepressor Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptors (SMRT). *Molecular Pharmacology*, 69(1): 99–108

Jones, S.A., Moore, L.B., Shenk, J.L., Wisely, G.B., Hamilton, G.A., McKee, D.D., Tomkinson, N.C.O., LeCluyse, E.L., Lambert, M.H., Willson, T.M., Kliewer, S.A., Moore, J.T. (2000): The Pregnane X Receptor: A Promiscuous Xenobiotic Receptor That Has Diverged during Evolution. *Molecular Endocrinology*, 14(1): 27–39

Katzung, B.G. (2018): *Basic & clinical pharmacology*. Fourteenth edition. New York, Chicago, San Francisco, Athens, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, Singapore, Sydney, Toronto: McGraw-Hill Education

Kenakin, T. (2008): Receptor Theory. *Current Protocols in Pharmacology*, 41(1)

Kliewer, S.A., Moore, T.J., Wade, L., Staudinger, J.L., Watson, M.A., Jones, S.A., McKnee, D.D., Oliver, B.B., Willson, T.M., Zetterstrom, R.H., Perlmann, T., Lehmann, J.M. (1998): An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a Novel Steroid Signaling Pathway. *Cell*, 92(1): 73–82

Klyushova, L.S., Perepechaeva, M.L., Grishanova, A.Y. (2022): The Role of CYP3A in Health and Disease. *Biomedicines*, 10(11): 2686

Lee, S.H., Kwon, J.E., Cho, M.-L. (2018): Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, 16(1): 26

Lehmann, J.M., McKnee, D.D., Watson, M.A., Willson, T.M., Moore, J.T., Kliewer, S.A. (1998): The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *Journal of Clinical Investigation*, 102(5): 1016–1023

Lin, J.H., Yamazaki, M. (2003): Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics: Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(1): 59–98

Lin, L., Yee, S.W., Kim, R.B., Giacomini, K.M. (2015): SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(8): 543–560

Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W., Melchart, D. (1996): St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ*, 313(7052): 253–258

Lv, Y., Luo, Y., Ren, H., Li, Ch., Xiang, Z., Luan, Z. (2022): The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 13: 959902

Mackenzie, P.I., Walter, B.K., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Miners, J.O., Owens, I.S., Nebert, D.W. (2005): Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and Genomics*, 15(10): 677–685

Matias, J.N., Lima, V.M., Nutels, G.S., Laurindo, L.F., Barbalho, S.M., Goulart, R.A., Araújo, A.C., Suzuki, R.B., Guiguer, E.L. (2024): The use of vitamin D for patients with inflammatory bowel diseases: A systematic review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 94(1): 54–70

Michalíková, K., Linhartová, L., Ezechiáš, M., Cajthaml, T. (2019): Assessment of agonistic and antagonistic properties of widely used oral care antimicrobial substances toward steroid estrogenic and androgenic receptors. *Chemosphere*, 217: 534–541

Moore, L.B., Goodwin, B., Jones, S.A., Wisely, G.B., Serabjit-Singh, C.J., Willson, T.M., Collins, J.L., Kliewer, S.A. (2000): St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13): 7500–7502

Moss, G.P., Smith, P.A.S., Tavernier, D. (1995): Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry*, 67(8–9): 1307–1375

Na, J.E., Kim, T.J., Lee, Y.C., Kim, J.E., Kim, E.R., Hong, S.N., Chang, D.K., Kim, Y. (2022): Risk of prostate cancer in patients with inflammatory bowel disease: a nationwide cohort study in South Korea. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 15

Nakamura, K., Moore, R., Negishi, M., Sueyoshi, T. (2007): Nuclear Pregnane X Receptor Cross-talk with FoxA2 to Mediate Drug-induced Regulation of Lipid Metabolism in Fasting Mouse Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13): 9768–9776

Nebert, D.W., Russell, D.W. (2002): Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, 360(9340): 1155–1162

Negus, S.S. (2006): Some implications of receptor theory for in vivo assessment of agonists, antagonists and inverse agonists. *Biochemical Pharmacology*, 71(12): 1663–1670

Neubig, R.R., Spedding, M., Kenakin, T., Christopoulos, A. (2003): International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 55(4): 597–606

Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., Zeng, H. (2021): Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11): 5710

Nogoceke, F.P., Barcaro, I.M.R., Sousa, D.P., Andreatini, R. (2016): Antimanic-like effects of (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone in mice. *Neuroscience Letters*, 619: 43–48

Novotna, A., Pavek, P., Dvorak, Z. (2011): Novel Stably Transfected Gene Reporter Human Hepatoma Cell Line for Assessment of Aryl Hydrocarbon Receptor Transcriptional Activity: Construction and Characterization. *Environmental Science & Technology*, 45(23): 10133–10139

Nowack, R. (2008): Review Article: Cytochrome P450 enzyme, and transport protein mediated herb–drug interactions in renal transplant patients: Grapefruit juice, St John’s Wort – and beyond! (Review Article). *Nephrology*, 13(4): 337–347

Oda, S., Fukami, T., Yokoi, T., Nakajima, M. (2015): A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 30(1): 30–51

Oeckinghaus, A., Ghosh, S. (2009): The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4)

Ondrová, K., Zůvalová, I., Vyhlídalová, B., Krasulová, K., Miková, E., Vrzal, R., Nádvorník, P., Nepal, B., Kortagere, S., Kopečná, M., Kopečný, D., Šebela, M., Rastinejad, F., Pu, H., Soural, M., Rolfes, K.M., Haarmann-Stemmann, T., Li, H., Mani, S., Dvořák, Z. (2023):

Monoterpenoid aryl hydrocarbon receptor allosteric antagonists protect against ultraviolet skin damage in female mice. *Nature Communications*, 14(1): 2728

Page, S.W., Maddison, J.E. (2008): Principles of clinical pharmacology. *Small Animal Clinical Pharmacology*, 1-26

Pavek, P. (2016): Pregnane X Receptor (PXR)-Mediated Gene Repression and Cross-Talk of PXR with Other Nuclear Receptors via Coactivator Interactions. *Frontiers in Pharmacology*, 7:456

Pavek, P., Dvorak, Z. (2008): Xenobiotic-Induced Transcriptional Regulation of Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues. *Current Drug Metabolism*, 9(2): 129–143

Persson, K.P., Ekehed, S., Otter, C., Lutz, E.S.M., McPheat, J., Masimirembwa, C.M., Andersson, T.B. (2006): Evaluation of Human Liver Slices and Reporter Gene Assays as Systems for Predicting the Cytochrome P450 Induction Potential of Drugs in Vivo in Humans. *Pharmaceutical Research*, 23(1): 56–69

Phang-Lyn, S., Llerena, V.A. (2024): Biochemistry, Biotransformation. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [navštíveno 11. 4. 2024]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544353/>

Pleuvry, B.J. (2004): Receptors, agonists and antagonists. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 5(10): 350–352

Pondugula, S.R., Mani, S. (2013): Pregnane xenobiotic receptor in cancer pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Letters*, 328(1): 1–9

Poulos, T.L. (2005): STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY IN HEME MONOOXYGENASES. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(1): 10–18

Qiao, E., Ji, M., Wu, J., Ma, R., Zhang, X., He, Y., Zha, Q., Song, X., Zhu, L., Tang, J. (2013): Expression of the PXR gene in various types of cancer and drug resistance. *Oncology Letters*, 5(4): 1093–1100

- Qin, X., Pan, C., Cai, Q., Zhao, Y., He, D., Wei, W., Zhang, N., Shi, S., Chu, X., Zhang, F. (2022): Assessing the effect of interaction between gut microbiome and inflammatory bowel disease on the risks of depression. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 26: 100557
- Quattrochi, L.C., Guzelian, P.S. (2001): Cyp3A regulation: from pharmacology to nuclear receptors. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 29(5): 615–622
- Rang, H.P. (2006): The receptor concept: pharmacology's big idea. *British Journal of Pharmacology*, 147
- Riches, Z., Stanley, E.L., Bloomer, J.C., Coughtrie M.W.H. (2009): Quantitative Evaluation of the Expression and Activity of Five Major Sulfotransferases (SULTs) in Human Tissues: The SULT “Pie”. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(11): 2255–2261
- Rojas, M. (2004): High DNA damage by benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma. *Cancer Letters*, 207(2): 157–163
- Ryu, J., Lee, E., Kang, C., Lee, M., Kim, S., Park, S., Lee, D., Kwon, Y. (2021): Rapid Screening of Glucocorticoid Receptor (GR) Effectors Using Cortisol-Detecting Sensor Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9): 4747
- Sandanaraj, E., Lal, S., Selvarajan, V., Ooi, L.L., Wong, Z.W., Wong, N.S., Ang, P.C.S., Lee, E.J.D., Chowbay, B. (2008): *PXR* Pharmacogenetics: Association of Haplotypes with Hepatic *CYP3A4* and *ABCBI* Messenger RNA Expression and Doxorubicin Clearance in Asian Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 14(21): 7116–7126
- Sayaf, K., Zanutto, I., Russo, F.P., Gabbia, D., Martin, S.D. (2021): The Nuclear Receptor PXR in Chronic Liver Disease. *Cells*, 11(1): 61
- Schupp, M., Lazar, M.A. (2010): Endogenous Ligands for Nuclear Receptors: Digging Deeper. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52): 40409–40415
- Scott, E.E., Halpert, J.R. (2005): Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(1): 5–7

Shah, Y.M., Ma, X., Morimura, K., Kim, I., Gonzalez, F.J. (2007): Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF- κ B target gene expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(4): 1522-1547

Skandalaki, A., Sarantis, P., Theocharis, S. (2021): Pregnane X Receptor (PXR) Polymorphisms and Cancer Treatment. *Biomolecules*, 11(8): 1142

Smutny, T., Dusek, J., Hyrsova, L., Nekvindova, J., Horvatova, A., Micuda, S., Gerbal-Chaloin, S., Pavek, P. (2020): The 3'-untranslated region contributes to the pregnane X receptor (PXR) expression down-regulation by PXR ligands and up-regulation by glucocorticoids. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(1): 136–152

Sonoda, J., Xie, W., Rosenfeld, J.M., Barwick, J.L., Guzelian, P.S., Evans, R.M. (2002): Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21): 13801–13806

Souza, L.P.D., Zuim, V., Stinguel, P., Pinheiro, P.F., Zago, H.B. (2022): Toxicity of Essential Oil of *Mentha piperita* (Lamiaceae) and its Monoterpenoid Menthol Against *Tetranychus urticae* Kogan 1836 (Acari: Tetranychidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94(4)

Staudinger, J.L., Ding, X., Lichti, K. (2006): Pregnane X receptor and natural products: beyond drug–drug interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(6): 847–857

Susa, S.T., Hussain, A., Preuss, C.V. (2024): Drug Metabolism. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [navštívno 11. 4. 2024]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442023/>

Tongnuanchan, P., Benjakul, S. (2014): Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7)

Wang, H., Venkatesh, M., Li, H., Goetz, R., Mukherjee, S., Biswas, A., Zhu, L., Kaubisch, A., Wang, L., Pullman, J., Whitney, K., Kuro-o, M., Roig, A.I., Shay, J.W., Mohammadi, M., Mani, S. (2011): Pregnane X receptor activation induces FGF19-dependent tumor aggressiveness in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(8): 3220–3232

Wyde, M.E., Kirwan, S.E., Zhang, F., Laughter, A., Hoffman, H.B., Bartolucci-Page, E., Gaido, K.W., Yan, B., You, L. (2005): Di-n-Butyl Phthalate Activates Constitutive Androstane

Receptor and Pregnane X Receptor and Enhances the Expression of Steroid-Metabolizing Enzymes in the Liver of Rat Fetuses. *Toxicological Sciences*, 86(2): 281–290

Zanger, U.M., Schwab, M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1): 103–141

Zhang, Y.-Z. (2014): Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1): 91

Zhou, C. (2006): Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF- κ B signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 116(8): 2280–2289