

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Studium vlivu derivátů tetrahydropyridinu
a tetrahydropyrimidinu na transkripční aktivitu
aryl uhlovodíkového receptoru
a glukokortikoidního receptoru**

Bakalářská práce

Šárka Kostková

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie pro víceoborové studium – Biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.

Olomouc 2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení: Šárka Kostková

Název práce: Studium vlivu derivátů tetrahydropyridinu a tetrahydropyrimidinu na transkripční aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru a glukokortikoidního receptoru

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.

Rok obhajoby: 2016

Abstrakt: Bakalářská práce je zaměřena na studium vlivu nově syntetizovaných derivátů tetrahydropyridinu IRCBM 1555 a tetrahydropyrimidinu IRCBM 1809 a IRCBM 1325 na transkripční aktivitu jaderných receptorů AhR a GR a jejich možné farmakologické účinky. Teoretická část práce zahrnuje mechanismus biotransformace a eliminace cizorodých látek, funkci jaderných receptorů, jejich roli v metabolismu člověka a přehled derivátů strukturně podobných testovaným látkám. V experimentální části práce bylo stanoveno pro buňku netoxické koncentrační rozmezí látek pomocí MTT testu. Vliv látek stanovených koncentrací na transkripční aktivitu receptorů byl sledován metodou Reporter gene assay v agonistickém a antagonistickém módu. K experimentům byly využity dvě buněčné linie, linie AZ-AHR odvozená z buněk lidského hepatocelulárního karcinomu a linie AZ-GR odvozená z buněk lidského karcinomu děložního čípku. Testované látky nevykazovaly agonistický vliv na receptory. Deriváty IRCBM 1809 a IRCBM 1325 obsahující tetrahydropyrimidinový skelet byly posouzeny jako antagonisté AhR i GR. Vlastností těchto látek by mohlo být využito v medicínské praxi.

Klíčová slova: AhR, GR, tetrahydropyridin, tetrahydropyrimidin, MTT assay, Gene reporter assay

Počet stran: 63

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's name and surname: Šárka Kostková

Title: Effect of tetrahydropyridine and tetrahydropyrimidine derivatives on transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

Supervisor: Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.

The presentation year: 2016

Abstract: The bachelor thesis is focused on the effect that newly synthesized tetrahydropyridine and tetrahydropyrimidine derivatives have on the transcriptional activity of the AhR and the GR, and the potential pharmacological effects of these derivatives. The theoretical part of this thesis contains the mechanism of biotransformation and elimination of xenobiotics, the function of nuclear receptors and their role in the human metabolism, and an overview of derivatives with a structure similar to the tested substances. In the experimental part of this thesis, a MTT test was used to determine a concentration nontoxic range of substances for a cell. The effect of the substances determined by the receptors' concentration on transcriptional activity was tested by the Reporter Gene Assay in the agonist and antagonist mode. Two cell lines were used for the experiments, the AZ-AHR cell line from a human hepatocellular carcinoma and the AZ-GR cell line from a human cervical carcinoma. The tested derivatives did not show the agonist effect. The IRCBM 1809 and IRCBM 1325 derivatives containing a tetrahydropyrimidic skeleton have shown an antagonist activity towards AhR and GR. The properties of these substances could be used in medical practice.

Keywords: AhR, GR, tetrahydropyridine, tetrahydropyrimidine, MTT assay, Gene reporter assay

Number of pages: 63

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem řádně citovala veškeré použité zdroje uvedené v seznamu citované literatury.

V Olomouci dne:

.....

Šárka Kostková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Anetě Grycové, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovana při řešení dané problematiky. Poděkování patří také kolektivu Katedry buněčné biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci za zpřístupnění laboratoře a jejího vybavení.

Obsah

Obsah	6
Seznam obrázků	8
Seznam grafů	9
Seznam tabulek	10
Seznam použitých zkratk.....	11
1 Úvod.....	14
2 Cíl práce.....	15
3 Biotransformace	16
3.1 Fáze I – redoxní a hydrolytická	17
3.1.1 Enzymy první fáze biotransformace	17
3.2 Fáze II – konjugální.....	19
3.2.1 Enzymy druhé fáze biotransformace	19
3.3 Fáze III – transportní.....	20
4 Jaderné receptory	22
4.1 Aryl uhlovodíkový receptor	24
4.2 Glukokortikoidní receptor	26
5 Deriváty pyrimidinu a pyridinu	28
5.1 Využití derivátů pyrimidinu	28
5.2 Využití derivátů pyridinu	31
5.3 Sruktury testovaných látek	33
6 Materiál a metodika.....	34
6.1 Materiál	34
6.1.1 Biologický materiál.....	34
6.1.2 Seznam použitých chemikálií a roztoků	34
6.1.3 Složení roztoků.....	35

6.1.4	Seznam laboratorních přístrojů.....	35
6.1.5	Seznam laboratorních pomůcek	36
6.2	Metodika	37
6.2.1	Kultivace	37
6.2.2	Pasážování buněk	37
6.2.3	Počítání buněk	37
6.2.4	Výsev buněk	38
6.2.5	Příprava zásobních roztoků testovaných látek	38
6.2.6	Aplikace testovaných látek.....	38
6.2.7	Stanovení cytotoxicity testovaných látek za použití testu MTT (MTT assay) ..	39
6.2.8	Reporter gene assay	40
7	Výsledky.....	43
7.1	Stanovení cytotoxicity testovaných látek.....	43
7.1.1	Testování účinku látek na životaschopnost buněk buněčné linie AZ-AHR	43
7.1.2	Testování účinku látek na životaschopnost buněk buněčné linie AZ-GR	44
7.2	Interakce testovaných látek s aryl uhlovodíkovým receptorem	45
7.3	Interakce testovaných látek s glukokortikoidním receptorem.....	47
7.4	Inhibice enzymu luciferázy	49
8	Diskuze	50
9	Závěr.....	52
10	Seznam použité literatury	53

Seznam obrázků

Obr. 1: Organizace jaderného receptoru	23
Obr. 2: Struktura TCDD: modelový exogenní ligand AhR	24
Obr. 3: Mechanismus aktivace AhR a regulace transkripce	25
Obr. 4: Struktura DEX: modelový exogenní ligand GR	26
Obr. 5: Mechanismus aktivace GR a regulace transkripce	27
Obr 6: Struktura thiaminu: hydrofilní vitamin B ₁	28
Obr 7: Obecná strutura barbiturátů	29
Obr. 8: Struktura deoxycytidinu a jeho analogů.....	29
Obr. 9: Struktura 5'-azapyrimidinových derivátů	30
Obr. 10: Struktura pyridinu a jeho přirozeně se vyskytujících derivátů	31
Obr 11: Struktura jednotlivých forem vitamínu B ₆	32
Obr. 12: Struktura IRCBM 1809	33
Obr. 13: Struktura IRCBM 1325	33
Obr. 14: Struktura IRCBM 1555	33
Obr. 15: Rovnice redukce MTT na formazan	40
Obr. 16: Sumární rovnice oxidace luciferinu na oxyluciferin katalyzované enzymem luciferázou	41

Seznam grafů

Graf 1: Závislost viability buněk linie AZ-AhR na koncentraci testované látky	43
Graf 2: Závislost životaschopnosti buněk linie AZ-GR na koncentraci testované látky	44
Graf 3: Závislost indukce luciferázové aktivity na koncentraci testované látky aplikované na buňky linie AZ-AhR.....	45
Graf 4: Závislost indukce luciferázové aktivity vyjádřené v procentech na koncentraci testované látky aplikované na buňky linie AZ-AhR v přítomnosti modelového ligandu TCDD.....	46
Graf 5: Závislost indukce luciferázové aktivity na koncentraci testované látky aplikované na buňky linie AZ-GR	47
Graf 6: Závislost indukce luciferázové aktivity vyjádřené v procentech na koncentraci testované látky aplikované na buňky linie AZ-GR v přítomnosti modelového ligandu DEX.	48
Graf 7: Indukce luciferázové aktivity po aplikaci látek v nejvyšších koncentracích na buňky linie AZ-AhR v přítomnosti TCDD.....	49

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příprava zásobních roztoků testovaných látek	38
Tabulka 2: Příprava roztoků testovaných látek určených k aplikaci na buňky	39
Tabulka 3: Příprava roztoků pro pozitivní a negativní kontrolu	39
Tabulka 4: Koncentrace testovaných látek použité při kontrole inhibice luciferázy	42

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP vazebná doména (<i>ATP binding cassette</i>)
ADH	alkoholdehydrogenáza
AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce 2
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
AhRR	represor aryl uhlovodíkového receptoru
AKR	aldo-ketoreduktáza
ALDH	aldehyddehydrogenáza
AO	aldehydoxidáza
AR	androgenový receptor
ARNT	nukleární translokátor aryl uhlovodíkového receptoru
ATB	penicilin-streptomycin
ATP	adenozin-5'-trifosfát
AZ-AHR	buněčná linie odvozená z buněk lidského hepatocelulárního karcinomu
AZ-GR	buněčná linie odvozená z lidských buněk rakoviny děložního čípku
bHLH	bazický helix-smyčka-helix
CoA	koenzym A
COX	cyklooxygenáza
CYP	cytochrom P450
DAO	diaminooxidázy
DBD	DNA vazebná doména
DEX	dexamethazon
DMEM	komerční médium (<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina

DRE	responzivní element aryl uhlovodíkového (dioxinového) receptoru
ER	estrogenový receptor
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální bovinní sérum
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GR	glukokortikoidní receptor
GRE	responzivní element glukokortikoidního receptoru
GST	glutathion-S-transferáza
Hsp70	protein teplotního šoku o velikosti 70 kDa (<i>heat shock protein</i>)
Hsp90	protein teplotního šoku o velikosti 90 kDa (<i>heat shock protein</i>)
HygB	hygromycin B
IRCBM 1325	Ethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate
IRCBM 1555	Ethyl 2,6-bis(4-chlorophenyl)-1-(3-fluorophenyl)-4-(3-fluorophenylamino)-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-carboxylate
IRCBM 1809	Ethyl 6-methyl-2-oxo-4-p-tolyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate
LBD	ligand vazebná doména
MAO	monoaminoxidáza
MEM NEAA	MEM neesenciální aminokyseliny
MNF	3'-metoxy-4'-nitroflavon
MR	mineralokortikoidní receptor
MTT	methyltetrazoliová sůl
NAT	N-acetyltransferáza
OAT	organické aniontové transportéry
OATP	transportní peptid organických aniontů
OCT	organické kationtové transportéry
P-gp	P-glykoprotein
p23	kochaperonový protein o velikosti 23 kDa

PAH	polycyklický aromatický uhlovodík
PAO	polyaminoxidáza
PAPS	3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát
PAS	Per-ARNT-Sim doména
PBS	fosfátový pufr s přísávkem chloridu sodného
PER	<i>Drosophila</i> period clock protein
PPAR	receptory aktivované peroxizomovými proliferáty
PR	progesteronový receptor
PXR	retinoidní X receptor
RAR	receptor kyseliny retinové
SIM	<i>Drosophila</i> single-minded protein
SULT	sulfotransferáza
TCDD	2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin
TR	thyroidní receptor
UGT	UDP-glukuronyltransferáza
VDR	receptor pro vitamin D
XAP2	X-asociovaný protein 2
XO	xanthinoxidáza
XRE	xenobiotický responzivní element

1 Úvod

Od nepaměti používají lidé různé látky k léčebným účelům. Na počátku byly využívány látky přírodního původu, ať už rostlinného, živočišného, či nerosty. Způsoby získávání a aplikace léčiv se během let značně vyvinuly. Postupně byly odhalovány struktury účinných látek a podstata jejich biologické aktivity. V současnosti jsou cíleně syntetizovány látky konkrétní struktury s předpokládaným účinkem.

Uvádí se, že za poslední dvě desetiletí je syntéza více než poloviny nových aktivních látek inspirována přírodními produkty, například alkaloidy. V moderní době je na alkaloidy nahlíženo jako na zásadité dusíkaté látky převážně rostlinného, ale i houbového či živočišného původu. Největší množství alkaloidů je produkováno vyššími rostlinami. Producentům slouží k ochraně před predátory, bakteriemi, viry a v boji s konkurenty, dále mají funkci signálních sloučenin, například k lákání opylovačů. První zmínky o účincích látek různých částí rostlin byly objeveny již ve starověkých písemnostech. V antickém období se poznání léčivého vlivu přírodních látek dále rozvíjelo. Stinnou stránkou bylo zneužívání toxicity některých z nich. Ve středověku bylo léčitelství omezeno vlivem církve, avšak rozvinula se alchymie, předchůdce dnešních přírodních věd, hlásající, že látky chemického původu mohou být rovnocenné látkám přírodním. Do 18. století byly poznatky získávány empiricky. Konec 18. století znamenal pokrok v oblasti experimentální chemie, která se rozvíjela během 19. století až do současnosti.

Potřeba nových farmaceutických produktů narůstá zejména vlivem vzniku nových chorob, například chorob civilizačních nebo rakoviny, a rozvoje rezistence. Látky testované v této práci jsou uměle syntetizované sloučeniny s pyrimidinovým nebo pyridinovým kruhem, jež jsou základem pro přírodní alkaloidy i mnoho dnes známých a používaných léčivých látek. Předpokládá se tedy, že by mohly, obdobně jako přírodní či již používané deriváty těchto heterocyklů, být farmakologicky aktivní a interagovat se signálními drahami v těle.

Živé organismy si v průběhu evoluce vytvořily komplexní obranný systém proti akumulaci cizorodých látek. Součástí systému jsou enzymy a transportní proteiny, jejichž exprese je regulována jadernými receptory. Jaderné receptory jsou transkripční faktory aktivované ligandy. Činnost receptorů souvisí s fyziologickými procesy i patologickými stavy. Porozumění interakci léčiv s receptory vede k odhalení účinku a je důležité pro podávání a kombinování léčiv v klinické praxi.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo stanovit, zda jsou deriváty tetrahydropyrimidinu IRCBM 1809 a IRCBM 1325 a derivát tetrahydropyridinu IRCBM 1555 schopny ovlivnit aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru a glukokortikoidního receptoru. K splnění cíle bylo třeba zpracovat literární rešerši zahrnující mechanismus biotransformace a eliminace cizorodých látek, funkci jaderných receptorů a jejich roli v metabolismu člověka a přehled derivátů strukturně podobných testovaným látkám. Prvním krokem experimentální části práce bylo stanovení pro buňku netoxického koncentračního rozmezí látek pomocí MTT testu. Roztoky látek v koncentracích netoxických pro buňku mohly být využity ke zkoumání vlivu látek na aktivitu receptorů. Vliv látek na transkripční aktivitu výše zmíněných receptorů byl sledován metodou Reporter gene assay v agonistickém a antagonistickém módu.

3 Biotransformace

Každý živý organismus je v neustálém kontaktu s xenobiotiky, cizorodými látkami, které mohou být jak přírodního, tak syntetického původu, toxické, či neškodné. Jako příklad lze uvést prach vznikající během přírodních pochodů a chemické látky včetně léčiv. Xenobiotika mohou být přijímána kůží, dýchacím traktem nebo trávicím traktem. Kůže tvoří neúčinnější bariéru, jež umožňuje průchod pouze výrazně lipofilním sloučeninám. Nejsnáze látky prostupují skrz epitel dýchacího traktu a to v těkavé formě nebo jako aerosol. Největší množství xenobiotik však lidské tělo přijímá přes trávicí ústrojí z potravy. Xenobiotika jsou z těla organismů vylučována v nezměněné nebo pozměněné formě. V nezměněné podobě jsou vylučovány vysoce polární látky. Ke změně struktury xenobiotika může dojít spontánně, nebo biotransformací (Dostálek *et al.*, 2006; Parkinson, 2001; Skálová *et al.*, 2011).

Biotransformace je souhrn biochemických reakcí, při nichž dochází ke změně struktury endogenních nebo exogenních látek vedoucí k jejich bioaktivaci, případně biodegradaci, za účasti biotransformačních enzymů. Bioaktivace je proces, během něhož se látka stává účinnou, případně toxickou, zatímco biodegradací svůj účinek ztrácí a stává se inaktivní (Dostálek *et al.*, 2006; Lüllmann *et al.*, 2004). Většina enzymů podílejících se na biotransformaci cizorodých látek katalyzuje také metabolické přeměny eobiotik, látek sloužících tělu jako zdroj energie nebo stavební materiál (Skálová *et al.*, 2011). Biotransformační reakce probíhají nejčastěji v játrech (Hodgson, 2010). Biotransformační enzymy je však možné identifikovat v ostatních orgánech trávicího traktu, dále v orgánech dýchací, vylučovací a reprodukční soustavy, v mozku, slezině a také v kůži, srdci, krvi, kostní dřeni a placentě (Farrell, 1987, cit. Parkinson, 2001; Gram *et al.*, 1986; Krishna *et al.*, 1994, cit. Parkinson, 2001). Charakter biotransformace je závislý na věku, pohlaví, genetické výbavě, výživě, fyzické kondici a podmínkách prostředí (Skálová *et al.*, 2011).

Biotransformace xenobiotik je sestavena ze tří fází, redoxní a hydrolytické, konjugační a transportní (Vrzal *et al.*, 2004). Cílem je zvýšení hydrofility a urychlení vyloučení cizorodé látky z těla (Parkinson, 2001). V rostlinné říši je průběh biotransformace obdobný jako u živočichů. Výsledné metabolity však nejsou vylučovány, ale uskladňovány (Skálová *et al.*, 2011). Některá léčiva nejsou v organismu transformována a jsou vylučována v původní podobě (například peniciliny). Existují i léčiva, jež se účastní pouze jedné části biotransformace. Například lokální anestetikum prokain podléhá hydrolyze v první fázi, zatímco paracetamol pouze fázi konjugační (Skálová *et al.*, 2011). Nejvyšší aktivitu v rámci

eliminace produktů biotransformace cizorodých látek vykazují játra a ledviny (Hodson, 2010). Biotransformační enzymy jsou regulovány jadernými receptory (Vrzal *et al.*, 2004).

3.1 Fáze I – redoxní a hydrolytická

V první fázi biotransformace dochází k přeměně funkčních skupin xenobiotika na skupiny polárnějšího charakteru redoxními a hydrolytickými reakcemi. Cílem je vytvořit sloučeninu schopnou reagovat s endogenními sloučeninami ve druhé fázi. Uplatňují se reakce oxidační, redukční a hydrolytické. Z oxidačních reakcí se jedná o oxidace alkoholů a aldehydů, oxidační deaminace, dealkylace, dehalogenace, N-oxidace a S-oxidace. Z reakcí redukčních pak o redukce nitrosloučenin a azosloučenin, redukce N-oxidů a S-oxidů a redukce karbonylových sloučenin a chinonů. Z reakcí hydrolytických o hydrolyzu amidů, epoxidů, esterů, hydrazidů a karbamátů (Dostálek *et al.*, 2006; Skálová *et al.*, 2011).

3.1.1 Enzymy první fáze biotransformace

Reakce první fáze biotransformace jsou katalyzovány redoxními a hydrolytickými enzymy (Skálová *et al.*, 2011). Cytochromy P450 (CYP) jsou nadrodinou monoxygenáz hemoproteinů katalyzujících oxidační reakce (Lewis *et al.*, 1998; Vrzal *et al.*, 2004). Spadají do skupiny cytochromů b (Hodgson, 2010). Číselná hodnota označení P450 je rovna absorpčnímu maximu v oblasti viditelného záření komplexu oxidu uhelnatého a redukované formy CYP, tedy 450 nm (Parkinson, 2001). Výskyt enzymů této skupiny byl potvrzen u různých organismů – bakterií, hub, rostlin a živočichů včetně člověka (Anzenbacher *et al.*, 2011). Počet substrátů této skupiny enzymů je vyšší než 200 000 (Lewis *et al.*, 1998). CYP jsou důležitými enzymy metabolismu a bioaktive karcinogenních látek (Murray *et al.*, 2014). Jedná se o čtyři rodiny: CYP1, CYP2, CYP3 a CYP4 (Gonzales, 1998).

V lidském genomu je známo 57 genů kódujících CYP (Guengerich, 2007). Nejvyšší míra výskytu CYP v lidském těle byla detekována v mikrozomech jaterního endoplazmatického retikula. Mikrozomální CYP je společně s mitochondriálním významnou součástí metabolismu steroidních hormonů, žlučových kyselin, lipofilních vitaminů, mastných kyselin, kyseliny arachidonové a jejích derivátů a xenobiotik. CYP se v menší míře vyskytují i v dalších tkáních v různých izoformách, od nichž je odvozena jejich funkce (Parkinson, 2001; Skálová *et al.*, 2011). Strukturně jsou CYP tvořeny polypeptidovým řetězcem a protoporfyrinem IX obsahujícím železo (Skálová *et al.*, 2011).

Dalšími enzymy katalyzujícími oxidační reakce v první fázi biotransformace jsou flavinové monooxygenázy (FMO). Jedná se o proteiny membrány hladkého endoplazmatického retikula, jejichž substrátem jsou sloučeniny obsahující nukleofilní heteroatom (Parkinson, 2001). Z hlediska struktury jsou FMO monomery s jednou molekulou flavinadeninukleotidu (FAD) (Skálová *et al.*, 2011). V lidském těle bylo objeveno šest izoform FMO – FMO1, FMO2, FMO3, FMO4, FMO5 a FMO6. Obdobně jako v případě CYP se FMO vyskytují nejvíce v játrech, ale i v jiných tkáních. V hepatocytech dospělého člověka je nejčastější FMO3, zatímco u plodu, novorozenců a jiných živočišných druhů FMO1 (Hodgson, 2010; Parkinson, 2001; Skálová *et al.*, 2011).

Cizorodé látky mohou soutěžit o vazebné místo s endogenními substráty a ovlivnit tak fyziologické procesy v buňce. Následující enzymy jsou primárně využívány k oxidaci přirozených produktů metabolismu. Mohou však katalyzovat oxidační reakce první fáze biotransformace xenobiotik (Skálová *et al.*, 2011). Vyskytují se v mitochondriích a v cytoplasmě (Hodgson, 2010). Oxidace primárních a sekundárních alkoholů se účastní alkoholdehydrogenázy (ADH). Produktem reakce jsou karbonylové sloučeniny, jež jsou následně oxidovány na karboxylové kyseliny. Katalyzátory reakce jsou aldehyddehydrogenázy (ALDH), aldehydoxidázy (AO) nebo xanthinoxidázy (XO). Oxidace aminů jsou katalyzovány monoaminoxidázami (MAO), diaminoxidázami (DAO) a polyaminoxidázami (PAO). Některé cizorodé látky mohou být oxidovány za účasti peroxidáz, enzymových antioxidantů, jejichž hlavní funkcí je redukce peroxidu vodíku (Hodgson, 2010; Skálová *et al.*, 2011).

Redukční reakce jsou využívány ke zvýšení polaritě karbonylů, disulfidů, sulfoxidů, N-oxidů, chinonů a dalších funkčních skupin. Příkladem redukčních enzymů jsou monomerní aldo-ketoreduktázy (AKR), které se vyskytují v cytozolu a podílejí se na redukci aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy. Dále karbonylreduktáza 1 a karbonylreduktáza 3, monomerní enzymy exprimované ve všech tkáních lidského těla. Na redukci xenobiotik se může podílet řada enzymů, které katalyzují oxidační reakce, například CYP (Parkinson, 2001; Skálová *et al.*, 2011).

Xenobiotika ve formě esterů, thioesterů a amidů jsou štěpena pomocí vody. Katalyzátory hydrolytických reakcí jsou například esterázy (cholinesterázy, karboxylesterázy a paraoxonáza), amidázy a peptidázy. Značné množství hydrolytických enzymů se nachází v játrech (Skálová *et al.*, 2011).

3.2 Fáze II – konjugační

Ve druhé fázi biotransformace reaguje produkt první fáze s konjugačním činidlem (endogenní organickou látkou). Výsledný konjugát je snáze vyloučen z organismu. Reakce uplatňující se v této fázi jsou glukuronidace, sulfonace, konjugace s glutationem, konjugace s aminokyselinami, acetylace a metylace. S výjimkou konjugace s glutathionem, jež probíhá spontánně, se jedná o reakce endergonické (Dostálek *et al.*, 2006; Skálová *et al.*, 2011).

3.2.1 Enzymy druhé fáze biotransformace

Reakce druhé fáze biotransformace jsou katalyzovány konjugačními enzymy, jež jsou situovány v cytozolu, jádře a na mikrozomech tělních tkání. Glukuronidace, konjugace látky s kyselinou glukuronovou je považována za nejvýznamnější proces druhé fáze biotransformace v lidském těle. Reakce je katalyzována UDP-glukuronosyltransferázami (UGT), polymorfními enzymy umístěnými v blízkosti CYP v jádře a na mikrozomech buněk jater, ledvin a střevní sliznice (Dostálek *et al.*, 2006; Skálová *et al.*, 2011). UGT jsou děleny na dvě rodiny – UGT1 a UGT2. Substráty této skupiny enzymů jsou sloučeniny obsahující nukleofilní heteroatom. Produkty glukuronidace jsou N-glukuronidy, S-glukuronidy a O-glukuronidy (Dostálek *et al.*, 2006; Skálová *et al.*, 2011).

Sulfotransferázy (SULT) jsou skupinou cytozolických enzymů katalyzujících sulfonaci, konjugaci s 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfátem (PAPS). V lidském těle se nachází tři významné rodiny – SULT1, SULT2, SULT3. Substrátem jsou jednoduché molekuly, v jejichž struktuře je zabudován kyslík. Produkty sulfonace jsou polární organické sulfáty (Dostálek *et al.*, 2006; Skálová *et al.*, 2011).

Glutathion-S-transferázy (GST) jsou enzymy katalyzující konjugaci xenobiotik s glutationem, endogenním tripeptidem syntetizovaným z aminokyselin. V lidském těle jsou rozlišovány dvě nadrodiny – cytozolické GST a mikrozomální GST. Substrátem GST jsou nukleofilní molekuly (Dostálek *et al.*, 2006; Skálová *et al.*, 2011).

Konjugace s aminokyselinami je katalyzována dvěma skupinami enzymů. Nejprve dochází k aktivaci xenobiotika za katalýzy acyl-CoA-syntetázou. Další reakcí je samotná konjugace s aminokyselinou katalyzovaná N-acyltransferázou (Dostálek *et al.*, 2006). Je-li ve struktuře cizorodé látky zabudována aminoskupina, dochází k její vazbě na acetylový zbytek acetylkoenzymu A. Reakce je katalyzována cytozolickým enzymem N-acetyltransferázou (NAT), jež se v organismu člověka vyskytuje ve dvou formách – NAT1

a NAT2. Nejvyšší aktivita NAT byla zaznamenána v hepatocytech a v buňkách gastrointestinálního traktu (Dostálek *et al.*, 2006).

Xenobiotika s hydroxylovými, sulfhydrylovými skupinami a aminoskupinami jsou ve druhé fázi biotransformace metylovány za katalýzy cytozolických methyltransferáz. Příkladem těchto enzymů jsou katechol-O-methyltransferáza, histamin-N-methyltransferáza a thiopurin-S-transferáza (Dostálek *et al.*, 2006).

3.3 Fáze III – transportní

Transport cizorodých látek přes biologické membrány je nejčastěji umožněn dvěma mechanismy, prostou difúzí nebo přenosem zprostředkovaným proteinovými přenašeči. Prostou difúzí je umožněn transport malých lipofilních molekul po koncentračním spádu. Přenos polárních produktů biotransformace přes hydrofóbní cytoplazmatickou membránu buňky je zajištěn proteinovými přenašeči (transportéry) třetí fáze biotransformace (Rang, 2003; Vrzal *et al.*, 2004). Velká část transportérů zprostředkovává přenos endogenních látek. Na transportu xenobiotik se podílí jen nízké procento přenašečů. Ty jsou označovány jako lékové transportéry (Skálová *et al.*, 2011).

Transportéry jsou děleny do dvou hlavních skupin, na ABC transportéry a SLC transportéry (Lin *et al.*, 2015). ABC transportéry (ATP binding cassette) jsou skupinou přenašečů zajišťujících transport z intracelulárního do extracelulárního prostředí buňky (effluxní transportéry) za spotřeby ATP. Obsahují proteinové domény (ATP binding cassette), které ji zajišťují ATPázovou enzymatickou aktivitu. Nejčastěji přenáší hydrofóbní látky, jsou však schopny transportovat ionty, peptidy a cukry (Dean *et al.*, 2001; Lullmann *et al.*, 2004). V epiteliálních buňkách jsou lokalizovány jak apikálně, tak bazolaterálně (Skálová *et al.*, 2011). Jsou přítomny u prokaryot i eukaryot. V lidském genomu bylo nalezeno 49 ABC transportérů (Vasiliou *et al.*, 2009). Přenašeče další skupiny, SLC transportéry (solute carrier), zajišťují převážně transport malých molekul z extracelulárního do intracelulárního prostředí (uptake transportéry). Substrát je přenášen po i proti směru gradientu substrátu (Lin *et al.*, 2015; Skálová *et al.*, 2011).

Za nejvýznamnější transportér je považován P-glykoprotein (P-gp) řazený do skupiny ABC transportérů. V lidském těle se jako lékové transportéry se uplatňují P-gp rodiny MDR1 (Lin *et al.*, 2003). Na transportu konjugátů druhé fáze biotransformace se hojně podílí přenašeče OATP, OAT a OCT. OATP přenašeče (organic anion transporting polypeptides) se podílí na transportu hydrofóbních aniontů, OAT (organic anion transporters) zajišťují přenos

hydrofilních aniontů a OCT (organic cation transporters) hydrofilních kationtů (Hagenbuch *et Meier*, 2003; Vrzal *et al.*, 2004).

Důležitou roli v regulaci biotransformace zastávají jaderné receptory. Podílí se na indukci a modulaci aktivity enzymů první fáze i druhé fáze a transportérů (Dostálek *et al.*, 2006).

4 Jaderné receptory

K udržení integrity organismu a komunikaci s vnějším prostředím využívají buňky buněčné signalizace. Každá buňka je vybavena systémem receptorových proteinů (dále receptorů) schopných selektivně vázat signální molekuly a vytvořit specifickou buněčnou odpověď. Receptory jsou přítomny jak v plazmatické membráně, kde zajišťují vazbu hydrofilních molekul, tak uvnitř buňky, v cytozolu nebo v jádře. Intracelulární receptory jsou selektivní pro menší hydrofobní molekuly (Alberts *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2002).

Jaderné receptory jsou třídou transkripčních faktorů významných pro regulaci metabolismu, vývoje a rozmnožování živočichů (Kostrouchová *et al.*, 2015; Laudet *et al.*, 2002). Pro ilustraci u zástupce hlístic háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) bylo doposud nalezeno 289 variant jaderných receptorů (Kostrouchová *et al.*, 2015), u člověka 48 (Pawlak *et al.*, 2015), u octomilky (*Drosophila melanogaster*) 21 (Adam *et al.*, 2000). Mohou se chovat jako aktivátory nebo represory transkripce a mají tak vliv na syntézu proteinů. Výsledky studií o jaderných receptorech slouží při farmakologických výzkumech, například léčby rakoviny, osteoporózy, diabetu, a také při studiu fylogeneze druhů (Escriva *et al.*, 2004; Robinson-Rechavi *et al.*, 2001; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003).

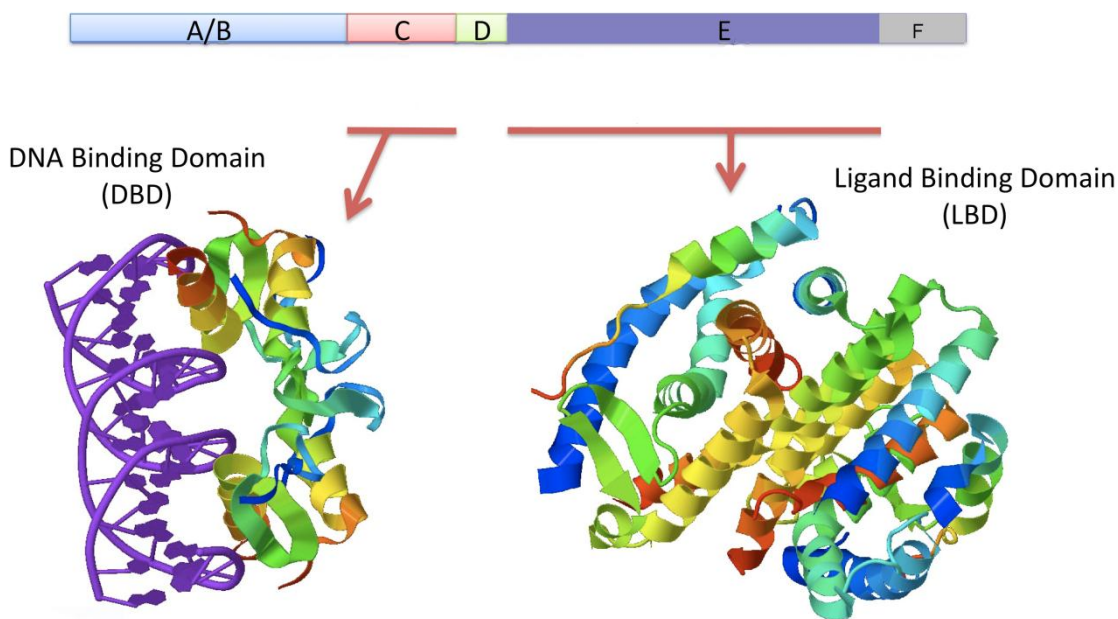
Jaderné receptory jsou rozděleny do tří podtříd (Jacobs *et al.*, 2003; Janošek *et al.*, 2006):

1. Typ I – steroidní receptory; zahrnuje receptor androgenový (AR), estrogenový (ER), glukokortikoidní (GR), mineralokortikoidní (MR), progesteronový (PR) a thyroïdní (TR).
2. Typ II – nesteroidní receptory; zahrnuje receptor aryl uhlovodíkový (AhR), retinoidní receptory (RAR, RXR), receptory aktivované peroxizomovými proliferáty (PPAR), receptor pro vitamin D (VDR) a další.
3. Typ III – sirotčí receptory; například konstitutivní androstanový receptor (CAR) a retinoidní receptor (PXR).

Jaderné receptory jsou aktivovány ligandy, jimiž mohou být endogenní i exogenní látky. U početné skupiny receptorů jsou aktivační ligandy známy. Receptory, jejichž přirozené ligandy doposud nebyly objeveny, jsou označovány jako sirotčí (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003). Jedná se o nejpočetnější skupinu jaderných receptorů (Lapčík, 2003). Ligandy jsou agonisty daných receptorů. Látky, které jsou schopny vazby na receptor, aniž by jej aktivovaly, jsou označovány jako kompetitivní antagonisté. Existují však i substráty, jež

mají vzhledem k podmínkám agonistický nebo antagonistický vliv na receptor. Jedná se o parciální agonisty, látky, které mají poloviční maximální účinek než agonisté (Lüllmann *et al.*, 2004).

Jaderné receptory mají charakteristickou strukturu (Obr. 1). Receptor je sestaven z pěti až šesti oblastí označených A–F. Oblasti A/B odpovídá N-koncová doména tvořená alespoň jednou aktivní transaktivační oblastí AF-1 a autonomními transaktivačními oblastmi AD. Počet aminokyselin domény se u jednotlivých receptorů liší. Oblast C představuje DNA-vazebnou doménu (DBD). Jedná se o nejvíce evolučně konzervovanou oblast, která se váže na specifické části řetězce DNA zvané responzivní elementy. Oblast D slouží jako spojovací doména mezi oblastmi C a E. Je méně konzervovaná. Oblast E, ligand-vazebná doména (LBD), je místem vazby ligandu na receptor. Obsahuje transaktivační oblast AF-2 a dimerizační oblast zprostředkávající vazbu na partnerskou LBD. Oblast F, C-koncová doména, je taktéž méně evolučně konzervovaná, její délka se u různých receptorů liší (Laudet *et Gronemeyer*, 2002; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003).

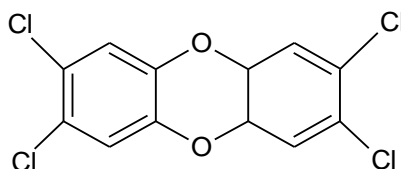


Obr. 1: Organizace jaderného receptoru (upraveno dle Vanden Heuvel, 2009)

4.1 Aryl uhlovodíkový receptor

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR), neboli dioxinový receptor, je cytozolický protein, který je řazen do skupiny bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM) transkripčních faktorů, které řídí expresi cytochromu P450 v první fázi biotransformace (Bersten *et al.*, 2013; Vrzal *et al.*, 2004). Zkratka PER značí *Drosophila* period clock protein, ARNT aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator a SIM *Drosophila* single-minded protein (Burbach *et al.*, 1992). Strukturní motiv bHLH se nachází na N-koncové doméně receptoru. Vyvinul se přibližně před 450 miliony lety. Zprostředkovává dvě interakce, protein/DNA a protein/protein (Hankinson, 1995; Mimura *et Fujii-Kuriyama*, 2003).

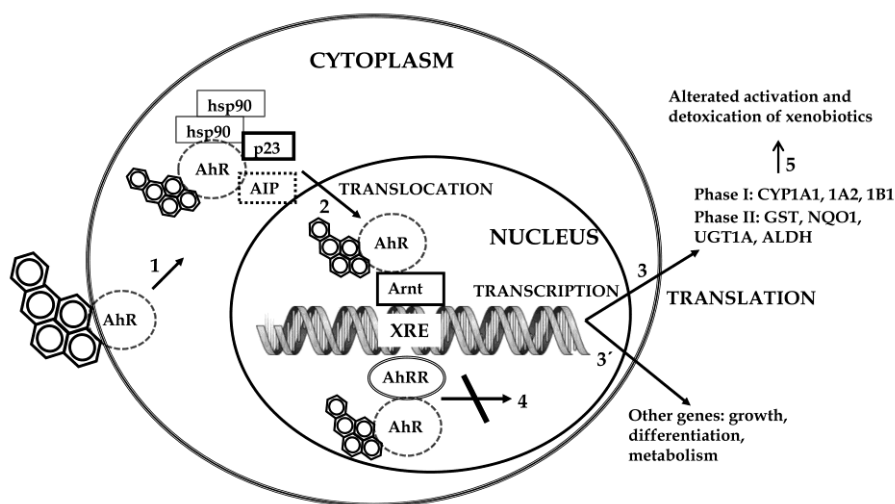
AhR byl považován za sirotčí receptor, v současné době jsou však známy jeho endogenní i exogenní ligandy s agonistickým i antagonistickým účinkem. Endogenními ligandy jsou například deriváty arachidonové kyseliny, tetrapyrolů a tryptofanu (Denison *et Nagy*, 2003). Je známo více než 400 exogenních ligandů AhR, mimo jiné se jedná o polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), například 3-metylcholantren, benzo[a]pyren, a halogenderiváty aromatických uhlovodíků (HAHs), například dioxiny, zvláště výrazně toxický 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, Obr. 2) (Denison *et Nagy*, 2003; Dietrich *et Kaina*, 2010; Hankinson, 1995). Lidské tělo je s PAHs i HAHs v neustálém kontaktu, neboť vznikají během spalování uhlí, benzínu, oleje, tabáku a při grilování masa (Murray *et al.*, 2014). Aromatické uhlovodíky jsou málo reaktivní. Po vstupu do organismu jsou však metabolicky aktivovány na karcinogenní intermediáty. Příčinou je jejich interakce s AhR, zvýšení exprese CYP a enzymů druhé fáze biotransformace. Oxidativní metabolismus aromatických uhlovodíků vede k tvorbě genotoxických intermediátů, které po navázání na DNA způsobují mutace zahajující nádorové bujení (Burczynski *et Penning*, 2010; Dybing *et al.*, 2013).



Obr. 2: Struktura TCDD: modelový exogenní ligand AhR

AhR se vyskytuje téměř ve všech tkáních lidského těla (výjimkou je kosterní svalovina). Ovlivňuje důležité fyziologické děje, například apoptózu, buněčný cyklus, diferenciaci, imunitní odpověď a rozmnožování. (Fujii-Kuriyama *et Kawajiri*, 2010; Murray

et al., 2014). Gen pro AhR je u člověka lokalizován na chromozomu 7. Je tvořen 12 exony kódujícími protein složený z 848 aminokyselin, jehož teoretická hmotnost je rovna 96,147 kDa (Hahn, 2002; Harper *et al.*, 2002). V inaktivním stavu je AhR součástí multiproteinového komplexu s teoretickou hmotností 300 kDa, jež se nachází v cytozolu. Komplex je sestaven z jednoho AhR, dvou proteinů teplotního šoku hsp90, které udržují konformaci AhR vhodnou k navázání ligandu, jednoho X-asociovaného proteinu XAP2 a jednoho kochaperonu p23 (Perdew, 1988; Petrusis *et al.*, 2000). Po navázání ligandu je multiproteinový komplex translokován do buněčného jádra, kde dojde k disociaci hsp90 a navázání jaderného translokátoru aryl uhlovodíkového receptoru (ARNT) za vzniku komplexu AhR/ARNT, heterodimeru s teoretickou hmotností 200 kDa (Lees *et al.*, 1999; McGuire *et al.*, 1994). Heterodimer AhR/ARNT se váže na DNA v místě zvaném xenobiotický nebo také dioxinový responzivní element (XRE, neboli DRE), část DNA charakterizovanou sekvencí 5'-TNGCGTG-3', čímž aktivuje genovou expresi (Mimura *et al.*, 2003; Safe, 2001). Mechanismus aktivace AhR je zobrazen na obr. 3. AhR také reguluje expresi represoru aryl uhlovodíkového receptoru (AhRR). Degradace AhR je provedena 26S proteazomem v cytoplazmě, kam je AhR přemístěn po navázání AhRR na ARNT (Pollenz, 2002).

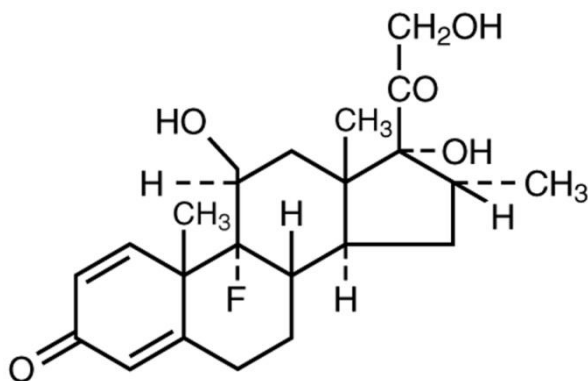


Obr. 3: Mechanismus aktivace AhR a regulace transkripce (Arenas-Huertero *et al.*, 2001)

4.2 Glukokortikoidní receptor

Glukokortikoidní receptor (GR) je ligandy aktivovaný transkripční faktor řazený do skupiny hormonálních jaderných receptorů (Yudt *et Cidlowski*, 2001). V lidském těle byly identifikovány dvě izoformy GR – GR α , GR β . Vyskytují se ve všech tkáních. Forma GR α je tvořena 777 aminokyselinami. Forma GR β tvořená 742 aminokyselinami není schopna vázat ligandy, podílí se pouze na modulaci aktivity předchozí formy (Dostálek *et al.*, 2006).

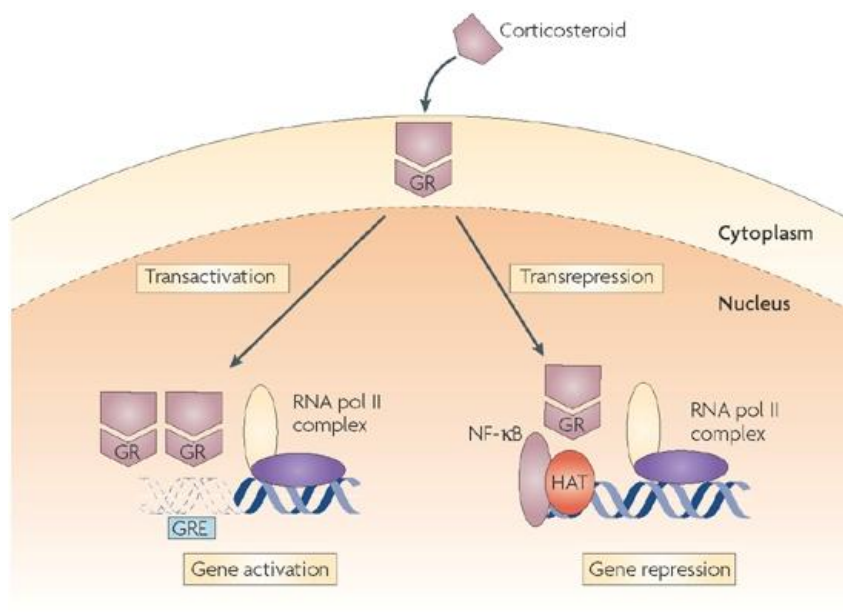
Endogenními ligandy GR jsou glukokortikoidy, steroidní hormony produkované kůrou nadledvin, jež mají vliv na metabolismus lipidů, proteinů a sacharidů. Příkladem je kortizol, hormon stimulující glukoneogenezi, který je životně důležitý v zátěžových situacích. V dávkách vyšších, než jsou fyziologické, mají glukokortikoidy protizánětlivé, antialergické a imunosupresivní účinky. Na organismus člověka však mohou mít i negativní vliv v podobě indukce očních chorob, nemocí kardiovaskulárního systému, hypertenze a diabetu. Nejdéle studovaným exogenním ligandem GR je syntetický steroidní hormon dexametazon (DEX, obr. 4). Dalšími exogenními ligandy jsou například beclometazon, betametazon a triamcinolon (Dobson *et al.*, 2001; Dostálek *et al.*, 2006; Lüllmann *et al.*, 2004; Novotná *et al.*, 2012).



Obr. 4: Struktura DEX: modelový exogenní ligand GR

Gen pro GR je u člověka lokalizován na chromozomu 5. Je tvořen 9 exony (Hollenberg *et al.*, 1985; McMaster *et Ray*, 2007). V inaktivním stavu se GR nachází v cytoplasmě jako součást chaperonového komplexu, jenž je sestaven z dvou molekul proteinu teplotního šoku hsp90, jedné molekuly hsp70 a imunofilinů. Po navázání ligandu dochází k disociaci proteinů komplexu od GR. Následuje dimerizace. Výsledný homodimer GR/GR je translokován do jádra, kde se váže na DNA v místě zvaném glukokortikoidní

responzivní element (GRE). GRE je charakterizován genovou sekvencí 5'-GGTACAnnTGTCT-3', kde „n“ je náhodný nukleotid. Transkripce je indukována vazbou na pozitivní GRE promotor (pGRE), zatímco vazba na negativní GRE promotor (nGRE) transkripci blokuje (Schoneveld *et al.*, 2004). Mechanismus aktivace receptoru je ilustrován obrázkem (Obr. 5). Degradace GR je provedena ubikvitin-proteazomovým systémem v cytoplazmě buňky (Wallace *et al.*, 2001).



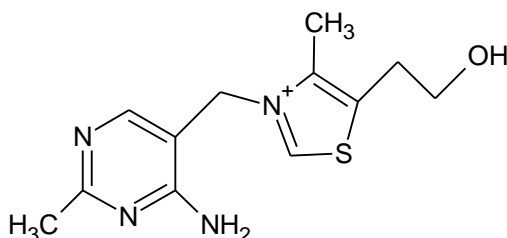
Obr. 5: Mechanismus aktivace a represe GR (převzato z Holgate *et al.*, 2008)

5 Deriváty pyrimidinu a pyridinu

Deriváty pyrimidinu a pyridinu a jejich analogy jsou součástí přírodních i farmaceutických produktů (Movassaghi *et al.*, 2007). Mají široký farmakologický účinek a jsou po dlouhou dobu využívány v medicínské praxi. Dané heterocykly jsou obsaženy ve struktuře testovaných látek. Předpokládá se tedy, že by testované látky mohly mít farmakologické účinky s dalším možným využitím.

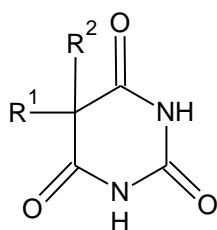
5.1 Využití derivátů pyrimidinu

Pyrimidin je stabilní heterocyklická sloučenina tvořena šestičlenným kruhem s dvěma atomy dusíku na pozicích 1 a 3. Pyrimidinový kruh byl nalezen ve struktuře vitamínu B₁. Vitamin B₁, thiamin (Obr. 6) se vyskytuje v obilných klíčcích, droždí, vaječném žloutku, játrech, srdci a ledvinách savců a v červeném víně (Liddicoat *et al.*, 2015; Hampl *et al.*, 2002). Je součástí enzymu karboxylázy (Lüllmann *et al.*, 2004). Důsledkem deficitu vitamínu jsou neurologická onemocnění, například Beri-beri, Wernickeho syndrom a Korsakovova psychóza (Homewood *et Bond*, 1999). Pyrimidin je základem nukleových bází, cytosinu, thyminu a uracilu. Syntetické deriváty nukleových bází jsou studovány zejména kvůli protinádorovým účinkům. Pyrimidiny lze synteticky připravit kondenzací β -diketosloučenin se sloučeninou obsahující heteroatomy (Albert, 1968; Červinka *et al.*, 1980).



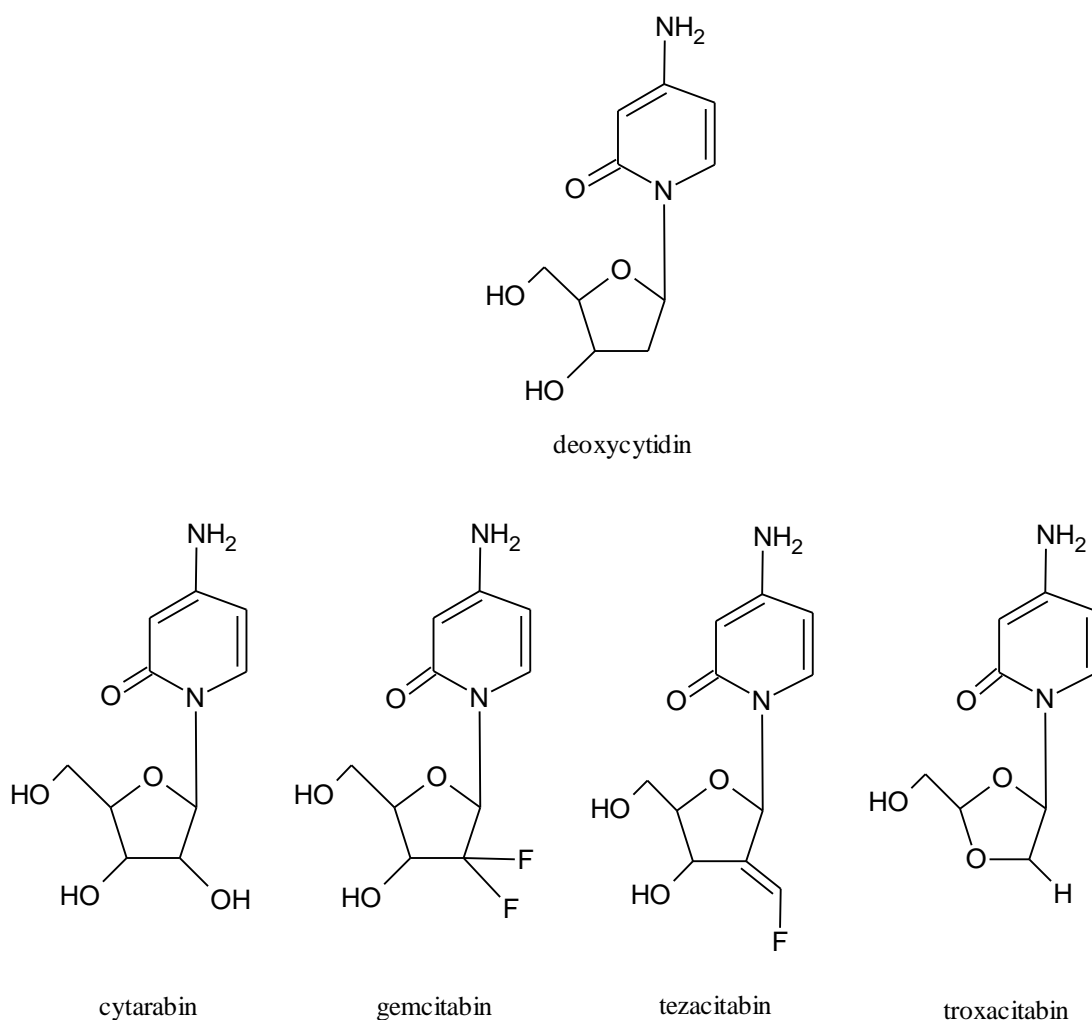
Obr 6: Struktura thiaminu: hydrofilní vitamin B₁

Kyselina barbiturová je derivátem pyrimidinu, jejíž soli, barbituráty (Obr. 7) a thiobarbituráty, jsou po desetiletí využívány v medicínské praxi jako intravenózní anestetika, sedativa a antiepileptika. Fungují na principu amplifikace účinku neurotransmiteru kyseliny γ -aminomáselné (GABA). V současnosti jsou používány v omezené míře. Vysoké dávkování může navodit kóma, v extrémních případech i smrt (Lüllmann *et al.*, 2004). Mohou také snižovat účinek léčiv biotransformovaných enzymem CYP3A4 (Kousalová *et al.*, 2003).



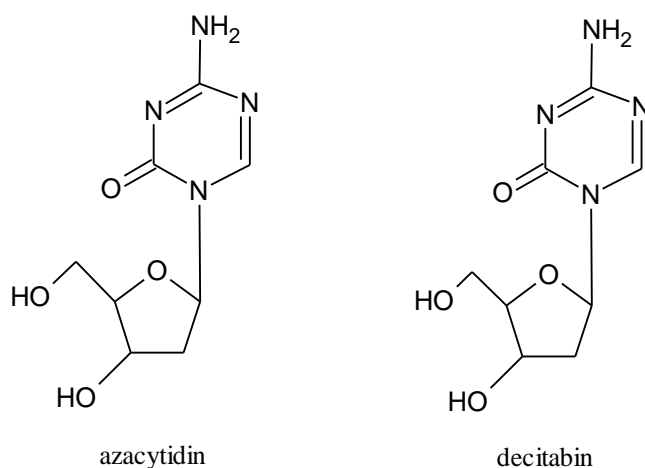
Obr 7: Obecná struktura barbiturátů

Deriváty pyrimidinových bází, cytosinu, thyminu a uracilu, jsou syntetizovány za účelem léčby nádorových onemocnění, především leukémie. Fungují na principu inhibice syntézy DNA. První skupinu takových látek představují analogy deoxycytidinu – cytarabin, gemcitabin, tezacitabin a troxacitabin (Obr. 8), jež jsou biologicky aktivní vůči hematologickým malignitám i pevným nádorům (Galmarini *et al.*, 2003).



Obr. 8: Struktura deoxycytidinu a jeho analogů (Galmarini *et al.*, 2003)

Další skupinu látek tvoří 5'-azapyrimidinové deriváty (Obr. 9), látky schopné inhibovat methyltransferázy a zabránit tak metylaci DNA. (Creusot *et al.*, 1982). Azacytidin je podáván pacientům s myelodysplastickým syndromem (MDS, porucha krvetvorby) (Raj *et al.*, 2006). Schopnost látky ovlivnit produkci T lymfocytů může snížit riziko odmítnutí tkáně při allogenické transplantaci (Sánchez-Abarca *et al.*, 2010). Léčivo decitabin je taktéž efektivní při léčbě MDS, dále pak při akutní myeloidní leukémii (Kantarjian *et al.*, 2003; Kantarjian *et al.*, 2006). Při léčbě leukémie se uplatňují i další pyrimidinové deriváty, například derivát fenylaminopyrimidinu imatinib, známý pod firmním názvem Gleevec, a derivát aminopyrimidinu nilotinib. Oba léky fungují na principu inhibice tyrozinových kináz (Szakács *et al.*, 2005).



Obr. 9: Struktura 5'-azapyrimidinových derivátů (Galmarini *et al.*, 2003)

Ve farmakologii jsou využívány i fluorované deriváty pyrimidinu, flucytosin jako antimykotikum a fluorouracil jako cytostatikum (Lüllmann *et al.*, 2004). Pyrazolopyrimidinové deriváty jsou využívány jako sedativa a k léčbě tuberkulózy (Holla *et al.*, 2006). Příkladem látek s antioxidačním účinkem jsou thieno[2,3-d]pyrimidinové deriváty a dihydropyrimidin-(2H)-ony (Kotaiah *et al.*, 2012; Stefani *et al.*, 2006). Pyrimidinový kruh je také součástí sildenafilu známého pod názvem Viagra (Goldstein *et al.*, 1998).

PP2, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin, látka používaná jako inhibitor Src kináz, je agonistou AhR (Frauenstein *et al.*, 2015). Src je rodinou preceptorových kináz, které regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci a přežití. Inhibice Src je využívána v terapii sarkomů (Roskoski, 2004). Aktivace AhR po podání PP2 může mít za následek nepříznivé vedlejší účinky, například alergické reakce (Frauenstein *et al.*, 2015).

5.2 Využití derivátů pyridinu

Pyridin (Obr. 10) je stabilní heterocyklická sloučenina tvořená šestičlenným kruhem s jedním atomem dusíku. Pyridinový kruh tvoří strukturu přirozeně se vyskytujících sloučenin, konkrétně kyseliny nikotinové, nikotinu a vitamínu B₆. První syntézu pyridinu provedl britský organický chemik William Ramsay v roce 1876. Struktura jeho derivátů byla odhalena již v roce 1840 chemikem Thomasem Andersonem, který izoloval 2-metylpyridin, neboli α -pikolin, v chemicky čisté formě (Murugan *et* Scriven, 2013). Syntetické deriváty se v současnosti připravují Hantzchovou syntézou pyridinů (Clayden *et al.*, 2012). Další možností je syntéza z dikarbonylových nebo dikarboxylových sloučenin (Čumakov *et* Lugovskaya, 1964, cit. Hradil, 2007; Shibuya *et al.*, 1989, cit. Hradil, 2007).

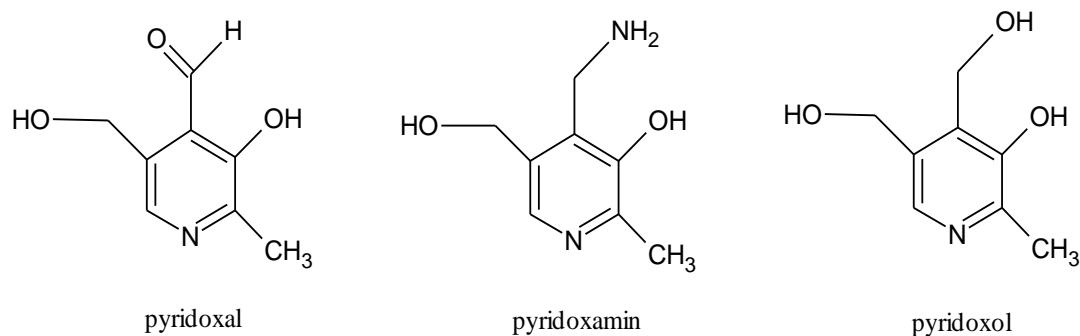
Kyselina nikotinová (Obr. 10), látka s jednoduchou strukturou, je syntetizována všemi organismy (Hampl *et al.*, 2002). Ve fyziologických dávkách plní v organismu funkci vitamínu. V kombinaci s dalšími farmaky je využívána při léčbě dyslipidémie. Inhibuje receptory v adipocytech, čímž zabraňuje lipolýze a uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně (Hernandez, 2010; Vaverková, 2010). Estery kyseliny nikotinové, například pyridylmetanol, způsobují vazokonstrikci kožních cév (Lüllmann *et al.*, 2004).

Nikotin (Obr. 10) je alkaloid obsažený v listech tabáku (Hampl *et al.*, 2002). Jedná se o nažloutlou toxickou látku tabákového zápachu. Letální dávka pro člověka je rovna 60 mg. V organismu se váže na nikotinové acetylcholinové receptory umístěné ve svalch, mozku a periferních nervech. Návyk je způsobem aktivací receptorů v neuronech limbického systému. Nikotin je nástrojem pro vývoj nových léků (Strunecká *et* Patočka, 2000). I přes jeho toxicitu se současné studie zabývají potenciálním využitím nikotinu v prevenci a terapii neurologických onemocnění (například jako antidepresiva), neboť je schopen regulovat hladinu dopaminu a acetylcholinu v lidském těle (Faillace *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2015). Poukazuje se také na pozitivní vliv nikotinu na pozornost a paměť (Strunecká *et* Patočka, 2000).



Obr. 10: Struktura pyridinu a jeho přirozeně se vyskytujících derivátů

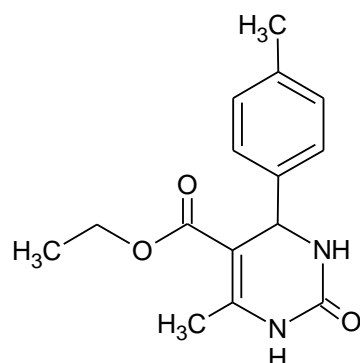
Vitamin B₆, pyridoxin, se vyskytuje ve třech formách (Obr. 11) – pyridoxal, pyridoxamin a pyridoxol, které se uplatňují jako kofaktory různých enzymů, například transamináz (HAMPL *et al.*, 2002; Vodrážka, 2002). Následkem nedostatku vitamínu B₆ jsou chronická žilní onemocnění, záněty a nervové poruchy (Kim *et Cho*, 2014; Vodrážka, 2002). U starší populace souvisí hypovitaminóza s Alzheimerovou chorobou (Spinneker, 2007). V rámci farmakologie je vitamin B₆ znám jako inhibitor dělení nádorových buněk (Pandey *et al.*, 2014).



Obr 11: Struktura jednotlivých forem vitamínu B₆

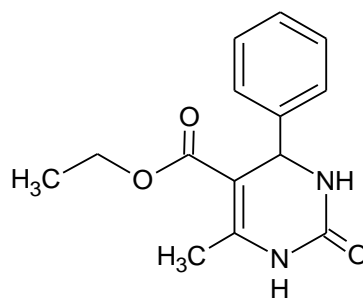
Syntetické deriváty pyridinu jsou hojně využívány ve farmakologii. Pyridiniové soli s dezinfekčním účinkem jsou přidávány do očních kapek. Cetylpyridiniové soli s antiseptickým účinkem jsou součástí zubních past a ústních vod. Mimo to snižují bakteriální kontaminaci potravin (Marek *et al.*, 2015; Pitten *et Kramer*, 2000). Ciklopirox, derivát pyridonu, je užíván jako lokální antimykotikum při léčbě mykóz kůže a nehtů. Reversibilní inhibitor cholinesterázy pyridostigmin je podáván při terapii myastenie, autoimunitního onemocnění omezujícího nervosvalový přenos (Lüllmann *et al.*, 2004). FPP-3, 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenon, je využíván jako chemopreventivní preparát proti genotoxicitě indukované GMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracen). FPP-3 je antagonistou AhR (Hwang *et al.*, 2008).

5.3 Sruktury testovaných látek



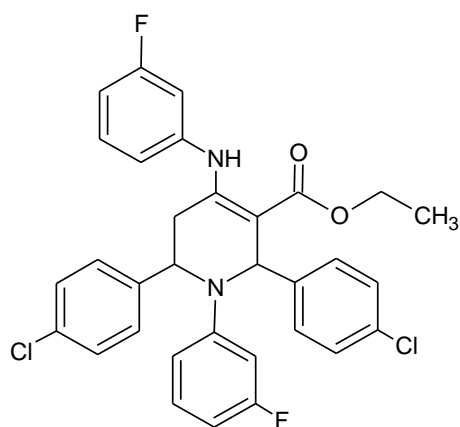
Obr. 12: Struktura IRCBM 1809

(ethyl 6-methyl-2-oxo-4-p-tolyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-karboxylát)



Obr. 13: Struktura IRCBM 1325

(ethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-karboxylát)



Obr. 14: Struktura IRCBM 1555

(ethyl 2,6-bis(4-chlorofenyl)-1-(3-fluorofenyl)-4-(3-fluorofenylamino)-1,2,5,6-tetrahydropyridin-3-larboxylát)

6 Materiál a metodika

6.1 Materiál

6.1.1 Biologický materiál

Pro studium transkripční aktivity AhR byla využita stabilně transfekovaná buněčná linie AZ-AHR. Linie HepG2 (No. 85011430), odvozená z buněk lidského hepatocelulárního karcinomu, byla stabilně transfekována reportérovým plazmidem pGL-4.27-DRE nesoucím 4 kopie DRE pro vazbu AhR (Novotná *et al.*, 2011).

Transkripční aktivita GR byla sledována pomocí stabilně transfekované reportérové linie AZ-GR. Parentní linie HeLa (No. 93021013) z buněk lidského karcinomu děložního čípku byla transfekována reportérovým plazmidem pGL-4.27-GRE, který obsahuje tři kopie GRE (Novotná *et al.*, 2012).

6.1.2 Seznam použitých chemikálií a roztoků

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), LGC Standards, Velká Británie.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT), Sigma-Aldrich, USA.

Dexametazon (DEX), Sigma-Aldrich, USA.

Dimethylsulfoxid (DMSO), Lach-Ner, Česká republika.

Dimethylformamid (DMF), Sigma -Aldrich, USA.

Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM), Sigma-Aldrich, USA.

Ethyl 2,6-bis(4-chlorophenyl)-1-(3-fluorophenyl)-4-(3-fluorophenylamino)-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-carboxylate (IRCBM 1555).

Ethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (IRCBM 1325).

Ethyl 6-methyl-2-oxo-4-p-tolyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (IRCBM 1809).

Fetální bovinní sérum (FBS), PAA, USA.

Hygromycin B, Sigma-Aldrich, USA.

Isorapid, OCC, Švýcarsko.

L-glutamin, Sigma-Aldrich, USA.

Neesenciální aminokyseliny (MEM NEAA), Sigma-Aldrich, USA.

Penicilin/streptomycin (P/S), Sigma-Aldrich, USA.

Phosphate puffered saline (PBS), Gibco, USA.

Substrát pro firefly luciferázu.

Trypsin-EDTA 0,25%, Sigma-Aldrich, USA.

Triton, Sigma-Aldrich, USA.

Trypanová modř, Sigma-Aldrich, USA.

Zásobní roztok lyzačního pufru, Promega, USA.

6.1.3 Složení roztoků

Kultivační médium

500 ml DMEM obsahující:

10% FBS

P/S: 100 mg · ml⁻¹ penicilin, 100 mg · ml⁻¹ streptomycin

2mM L-glutamin

1% neesenciální aminokyseliny

MTT roztok (0,3 mg · ml⁻¹)

1 ml zásobního roztoku MTT (3 mg · ml⁻¹)

9 ml kultivačního média

1x Lyzační pufr (25 ml)

5 ml zásobního roztoku 5x lyzačního pufru

20 ml destilované vody

Substrát pro firefly luciferázu (30 ml)

5 mg D-luciferin

10 mg ATP

5 mg koenzym A

168 mg dithiothreitol (DTT)

1,32 ml Tris-acetát (1M; 7,8 pH)

1,23 mg EDTA

30,3 mg MgSO₄ · 7H₂O

6.1.4 Seznam laboratorních přístrojů

Chladnička kombinovaná, Whirpool, USA.

Incubátor Mitre 4000 Series, Contherm Scientific, Nový Zéland.

Laminární flowbox SafeFAST Top, Faster, Itálie.

Mikroskop HT-NIB-100, All Pro Corporation, Čína.

Multikanálová pipeta, Eppendorf, Německo.

Pipetor.

Pipety (0,1–2,5 μ l, 0,5–10 μ l, 2–20 μ l, 10–100 μ l, 50–200 μ l, 100–100 μ l), Eppendorf, Německo.

Skříňový mrazicí box, SANYO, Japonsko.

Spektrofotometr Infinite M200, Tecan Trading AG, Švýcarsko.

Ultrazvuková čistička Sonorex, Bandelin, Německo.

Vodní lázeň LCB 22 D, Labtech, Česká republika.

Vortex Reax top, Heidolph, Německo.

6.1.5 Seznam laboratorních pomůcek

Bürkerova komůrka.

Destička kultivační (96 jamková).

Destička pro měření fluorescence (96 jamková).

Kónické zkumavky se šroubujícím víčkem – falkony (25 ml, 50 ml).

Krycí sklo.

Lahev kultivační (75 cm²).

Lihový kahan.

Mikrozkumavky (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml).

Petriho misky.

Plastová deska s jamkami.

Plastový stojan.

Popisovač.

Sterilní sérologické pipety (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml).

Špičky epTIPS (0,1 – 10 μ l, 2 – 200 μ l, 50 – 1000 μ l).

Rukavice.

Zapalovač.

6.2 Metodika

6.2.1 Kultivace

Buněčné linie byly kultivovány v plastové láhvi (75 cm²) v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

6.2.2 Pasážování buněk

Používané chemikálie skladované v lednici byly nahřívány ve vodní lázni na teplotu 37 °C. Trypsin byl rozmražen při laboratorní teplotě. Práce probíhala ve sterilních podmínkách laminárního flowboxu. Pomůcky bylo nutné dezinfikovat. Před vložením kultivační láhve do flowboxu byl pod mikroskopem zkontrolován morfologický vzhled buněk. Z kultivační láhve bylo odsávacíkou odstraněno původní médium. Buňky byly promyty 5 ml PBS, které bylo poté odstraněno. Následovala trypsinizace sloužící k rozrušení vazeb mezi buňkami. Na stěnu kultivační láhve byl napietován 1 ml trypsinu. Po třech minutách inkubace byla láhev vyjmuta z inkubátoru. Poklepáním po stěně bylo dosaženo uvolnění buněk z podkladu. Poté bylo k buňkám přidáno 9 ml média. Vzniklá směs byla resuspendována opakovaným nasáváním do sérologické pipety a vložena do 50ml zkušavky. Část suspenze byla odebrána k další kultivaci a doplněna médiem na objem 15–16 ml, v případě poslední kultivace v týdnu na objem 20 ml. Pasážování bylo prováděno třikrát týdně. Jednou týdně bylo k suspenzi přidáno antibiotikum hygromycin B o finální koncentraci 0,3 mg · l⁻¹.

6.2.3 Počítání buněk

Ke stanovení koncentrace buněk byl využit test Trypan Blue Exclusion assay. Mrtvé buňky byly obarveny modří. Metabolicky aktivní neobarvené živé buňky bylo možné pozorovat na tmavém podkladě. K počítání buněk byla použita Bürkerova komůrka, speciální podložní sklo se dvěma sítěmi určenými k počítání. Každá síť je sestavena z 16 větších čtverců (1 mm²) a hran tvořených třemi čarami.

Do mikrozkušavky bylo napipetováno 10 µl buněčné suspenze a 90 µl trypanové modří. Suspenze byla nanášena na čistou Bürkerovu komůrku překrytou krycím sklem. Pod mikroskopem byly spočítány buňky vyskytující se v pěti čtvercích (deset čtverců ve dvou sítích) a na dvou hranách kolem každého čtverce. Průměr určený z výsledného počtu byl dosazen do vzorce:

počet buněk v 1 ml: $N = x \cdot 10^5$ buněk

x – aritmetický průměr

6.2.4 Výsev buněk

Do jedné jamky 96 jamkové desky bylo vyseto 25 tisíc buněk ve 200 μ l média. Práce probíhala ve sterilních podmínkách laminárního flowboxu. Připravené množství suspenze bylo napipetováno z Petriho misky do jamek kultivační desky, která byla poté po dobu 24 hodin uchována v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

6.2.5 Příprava zásobních roztoků testovaných látek

Postup je shodný pro všechny tři testované látky. Do mikrozkuvek bylo dle tabulky (Tab. 1) připraveno pět koncentrací roztoků každé testované látky. Mikrozkuvky byly popsány a uloženy do mrazicího boxu.

Původní zásobní roztok: $c = 100$ mM, $V = 100$ μ l

Výsledný objem roztoku: $V = 100$ μ l

Tabulka 1: Příprava zásobních roztoků testovaných látek

	Výsledná koncentrace látky (mM)	Objem původního roztoku (μ l)	Objem DMF (μ l)
1.	100	původní zásobní roztok	0
2.	50	50 μ l 100 mM roztoku	50
3.	10	10 μ l 100 mM roztoku	90
4.	1	10 μ l 10 mM roztoku	90
5.	0,1	10 μ l 1 mM roztoku	90

6.2.6 Aplikace testovaných látek

Do označených mikrozkuvek byly podle tabulky (Tab. 2) připraveny roztoky testovaných látek o výsledné koncentraci 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M a 100 μ M. Jako pozitivní kontrola pro metodu Reporter gene assay byl v případě linie AZ-AHR použit 5 nM TCDD a v případě AZ-GR 100 nM DEX (Tab. 3). Jako negativní kontrola sloužil pro obě linie DMF (0,1%, v/v). Jako pozitivní kontrola pro MTT test byl použit 2% roztok tritonu X-100 (Tab. 3), jako negativní kontrola byl použit DMF (0,1%, v/v). Každá koncentrace dané látky byla testována v pentaplikátu. Takto připravené roztoky byly

aplikovány na buňky vyšeté v 96 jamkové desce 24 hodin před aplikací a kultivovány v inkubátoru (37°C, 5% CO₂).

Tabulka 2: Příprava testovaných látek o finálních koncentracích

	Výsledná koncentrace (μM)	Objem zásobního roztoku (μl)	Objem kultivačního média (μl)
1.	0,1	1,1 μl 0,1 mM roztoku	1100
2.	1	1,1 μl 1 mM roztoku	
3.	10	1,1 μl 10 mM roztoku	
4.	50	1,1 μl 50 mM roztoku	
5.	100	1,1 μl 100 mM roztoku	

Tabulka 3: Příprava pozitivní a negativní kontroly pro MTT test a Reporter gene assay

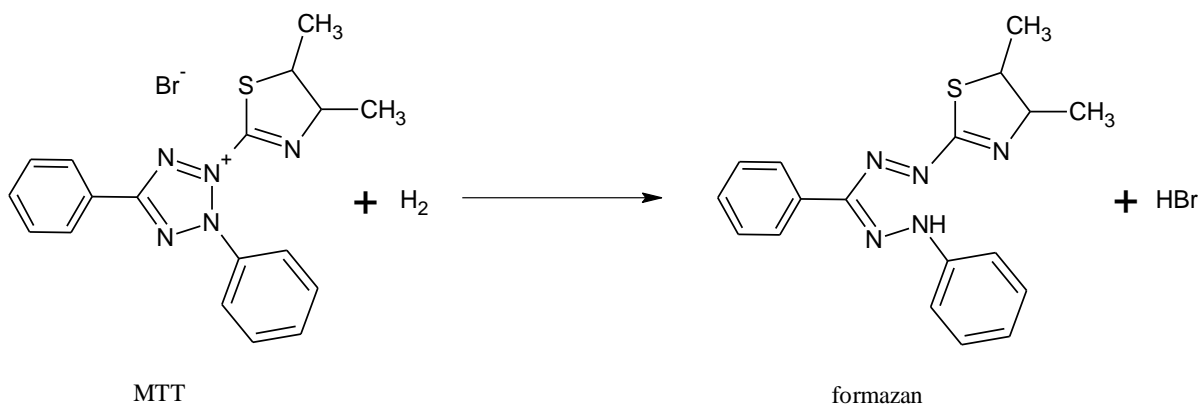
	Objem zásobního roztoku (μl)	Objem kultivačního média (μl)
UT	1,1 μl roztoku DMF	1100
TCDD	1,1 μl 5 μM roztoku TCDD	
DEX	1,1 μl 100 μM roztoku DEX	
TRITON	70 μl 20% roztoku tritonu X-100	630

6.2.7 Stanovení cytotoxicity testovaných látek za použití testu MTT (MTT assay)

6.2.7.1 Princip metody MTT assay

MTT assay je časově nenáročný test užívaný ke kolorimetrickému stanovení cytotoxicity a životaschopnosti buněk. Prvně byl popsán Mosmannem v roce 1983 (Mosmann, 1983; Stockert *et al.*, 2012). Je založen na sledování enzymové aktivity živých buněk (Scudiero *et al.*, 1988), které jsou schopny redukovat bezbarvou sloučeninu MTT na formazan (Obr. 15), tmavě fialovou lipofilní látku (Angius *et Floris*, 2014).

Reakce je katalyzována dehydrogenázami, enzymy s koenzymem NADH (redukováná forma nikotinamidnukleotidu), například sukcinátdehydrogenázou, které se vyskytují v mitochondriích (Stockert *et al.* 2012). Krystaly formazanu vysrážené v cytosolu jsou extrahovány do organického rozpouštědla. Koncentrace formazanu se stanovuje spektrofotometricky (Scherließ, 2011; Stockert *et al.*, 2012).



Obr. 15: Rovnice redukce MTT na formazan

6.2.7.2 Provedení metody MTT assay

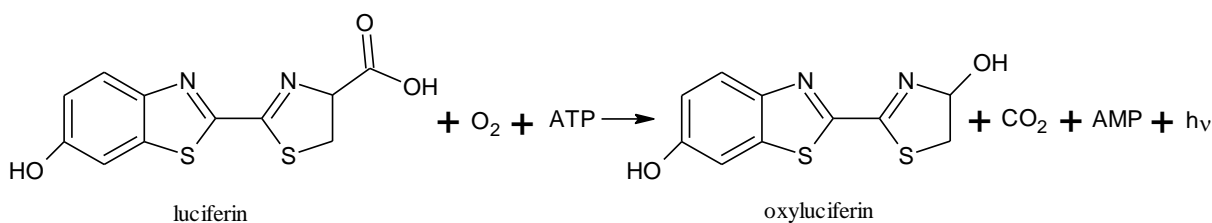
První den testování byly buňky pasážovány, spočítány a vysety. Druhý den byla provedena aplikace testovaných látek, negativní kontroly a pozitivní kontroly. Jako negativní kontrola bylo použito médium s DMF (0,1 %, v/v). Pozitivní kontrolou byl 2% roztok tritonu v médiu. Po 24 hodinové inkubaci byl proveden MTT test.

Roztok MTT o koncentraci $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ byl připraven desetinasobným naředěním zásobního roztoku MTT o koncentraci $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ kultivačním médiem. Z destičky bylo vyklepnuto médium s testovanými látkami a do každé jamky bylo aplikováno $100 \mu\text{l}$ připraveného roztoku MTT v médiu. Po inkubaci (20–30 minut) byl obsah destičky opět odstraněn vyklepnutím a jamky byly naplněny $100 \mu\text{l}$ roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO). Obsah byl jemně protřepán, následkem čehož byl formazan uvolněn z buněk do roztoku. Pomocí předem nastaveného programu byla spektrofotometricky změřena absorbance při vlnové délce 570 nm.

6.2.8 Reporter gene assay

6.2.8.1 Princip metody Reporter gene assay

Test Reporter gene assay je bioluminiscenční metodou, která byla využita k získání informací o aktivaci receptorů. Důsledkem případné aktivace receptoru je syntéza enzymu luciferázy, jež je katalyzátorem oxidace luciferinu na oxyluciferin za spotřeby energie ve formě ATP (Obr. 16) (Bocáková, 2009).



Obr. 16: Sumární rovnice oxidace luciferinu na oxyluciferin katalyzované enzymem luciferázou
(dle De Wet *et al.*, 1987)

6.2.8.2 Provedení metody Reporter gene assay

Metoda Reporter gene assay byla provedena ve dvou módech, agonistickém a antagonistickém. V případě agonistického módu byl sledován vliv látek na aktivitu daného receptoru. V případě antagonistického módu byl sledován inhibiční účinek látek na již aktivované receptory.

První den byly buňky pasážovány, spočítány a vysety do 96 jamkových destiček. Další den byla provedena aplikace látek. V rámci agonistického módu byly látky aplikovány s rostoucí koncentrací. V případě antagonistického módu byly testované látky aplikovány s rostoucí koncentrací v přítomnosti modelového ligandu (5nM TCDD pro sledování aktivity AhR, 100nM DEX pro sledování aktivity GR). Jako negativní kontrola sloužil roztok DMF v médiu (0,1%, v/v). Po 24 hodinové inkubaci bylo z desky vyklepnuto médium s testovanými látkami a jamky byly promyty 50 μ l PBS. Poté byl do jamek napipetován lyzační pufr (u linie AZ-AHR bylo přidáno 30 μ l, u AZ-GR 25 μ l) a desky byly inkubovány v mrazicím boxu při teplotě -80 $^{\circ}$ C po dobu 20 minut. Po rozmražení byla provedena homogenizace obsahu jamek. Buněčný lyzát byl přepipetován do černé destičky určené k měření luminiscence (u linie AZ-AHR byly přepipetovány 3 μ l, u AZ-GR 20 μ l). Za sníženého osvětlení byl k homogenátu přidán substrát pro firefly luciferázu (AZ-AHR – 30 μ l, AZ-GR – 100 μ l) rozmražený při teplotě 37 $^{\circ}$ C. Pomocí předem nastaveného programu byla spektrofotometriky změřena luminiscence při vlnové délce 560 nm.

6.2.9 Inhibice luciferázové aktivity

6.2.9.1 Princip inhibice luciferázové aktivity

Test inhibice luciferázové aktivity slouží k potvrzení, případně vyvrácení, antagonistického účinku látek vzhledem k receptorům a vyloučení inhibice luciferázy testovanou látkou. Výsledné hodnoty luciferázové aktivity se srovnávají s luciferázovou aktivitou indukovanou modelovým ligandem. Jelikož jsou linie AZ-AHR a AZ-GR stabilně

transfekovány reportérovým plasmidem obsahujícím stejný gen pro luciferázu, tento test stačilo provést pouze na jedné linii. Vzhledem k vyššímu signálu luciferázy byla zvolena linie AZ-AHR.

6.2.9.2 Provedení inhibice luciferázové aktivity

První den testování byly buňky pasážovány, spočítány a vysety. Po 24 hodinách inkubace bylo odsávačkou odstraněno použité médium. Na buňky byl aplikován roztok 200 μ l média s 0,2 μ l 5nM TCDD. Buňky byly znovu inkubovány. Třetí den bylo použité médium nahrazeno 100 μ l lyzačního pufrem. Petriho miska byla ponechána v mrazicím boxu při teplotě -80 °C po dobu 20 minut. Po rozmražení byl lyzát homogenizován, přenesen do mikozkumavky a 10x naředěn lyzačním pufrem. Naředěný buněčný lyzát byl po 1 ml napipetován do pěti mikrozumavek. K lyzátu byly dle tabulky (Tab. 4) přidány roztoky testovaných látek. Buněčný lyzát s přídavkem testovaných látek byl po 3 μ l napipetován do černé destičky určené k měření. Jamky byly doplněny substrátem pro firefly luciferázu (30 μ l). Každá koncentrace byla testována v tetraplikátu. Jako negativní kontrola byl použit buněčný lyzát bez přídavku testovaných látek. Pomocí předem nastaveného programu byla spektrofotometricky změřena luminiscence při vlnové délce 560 nm.

Tabulka 4: Koncentrace testovaných látek použité při kontrole inhibice luciferázové aktivity

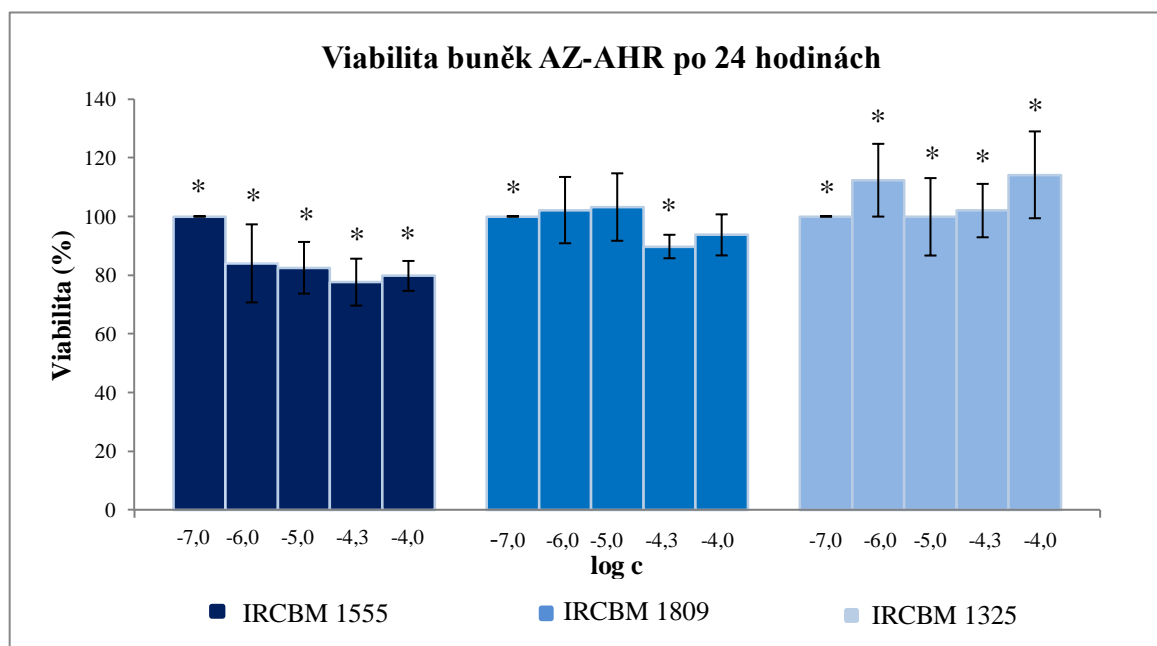
Testovaná látka	Koncentrace (μ M)	
1809	50,0	100,0
1555	50,0	100,0
1325	100,0	

7 Výsledky

7.1 Stanovení cytotoxicity testovaných látek

Cytotoxicita látek byla stanovena na základě testu MTT. Testován byl účinek látek na obě buněčné linie, linii AZ-AHR a AZ-GR.

7.1.1 Testování účinku látek na životaschopnost buněk buněčné linie AZ-AHR

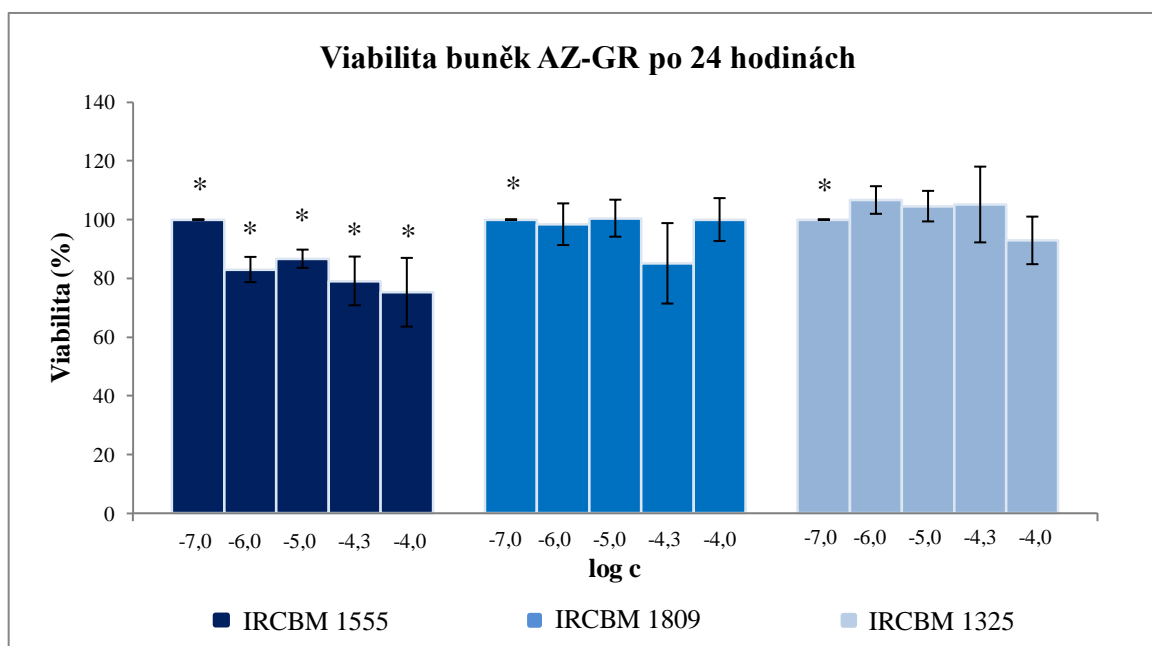


Graf 1: Závislost viability buněk linie AZ-AHR na koncentraci testovaných látek

Buňky linie AZ-AHR byly vysety do 96 jamkové destičky. Následující den byla provedena aplikace testovaných látek v koncentracích 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M a 100 μ M, pozitivní kontroly (2% triton) a negativní kontroly DMF (0,1%, v/v). Po 24 hodinové inkubaci bylo aplikováno MTT a spektrofotometricky změřena absorbance při vlnové délce 570 nm. Hodnota 100 % odpovídá absorbanci naměřené u 100 nM koncentrace látky. Uvedeny jsou průměrné výsledné hodnoty (IRCBM 1555 a IRCBM 1809 – průměr tří nezávislých experimentů, IRCBM 1325 – průměr čtyř nezávislých experimentů). * – hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

Látka IRCBM 1555 s rostoucí koncentrací snižovala viabilitu buněk AZ-AHR až na hodnotu 77,6 % (Graf 1). Pokles viability byl vyhodnocen jako statisticky významný. U látek IRCBM 1809 a IRCBM 1325 nebyl zaznamenán pokles životaschopnosti buněk. Na základě výsledků MTT testu byly pro stanovení vlivu látky IRCBM 1555 na aktivitu AhR použity pouze koncentrace 100 nM, 1 μ M a 10 μ M. Pro látky IRCBM 1809 a 1325 bylo k dalšímu testování vlivu na AhR využito celé koncentrační rozmezí 10 nM–100 μ M.

7.1.2 Testování účinku látek na životaschopnost buněk buněčné linie AZ-GR



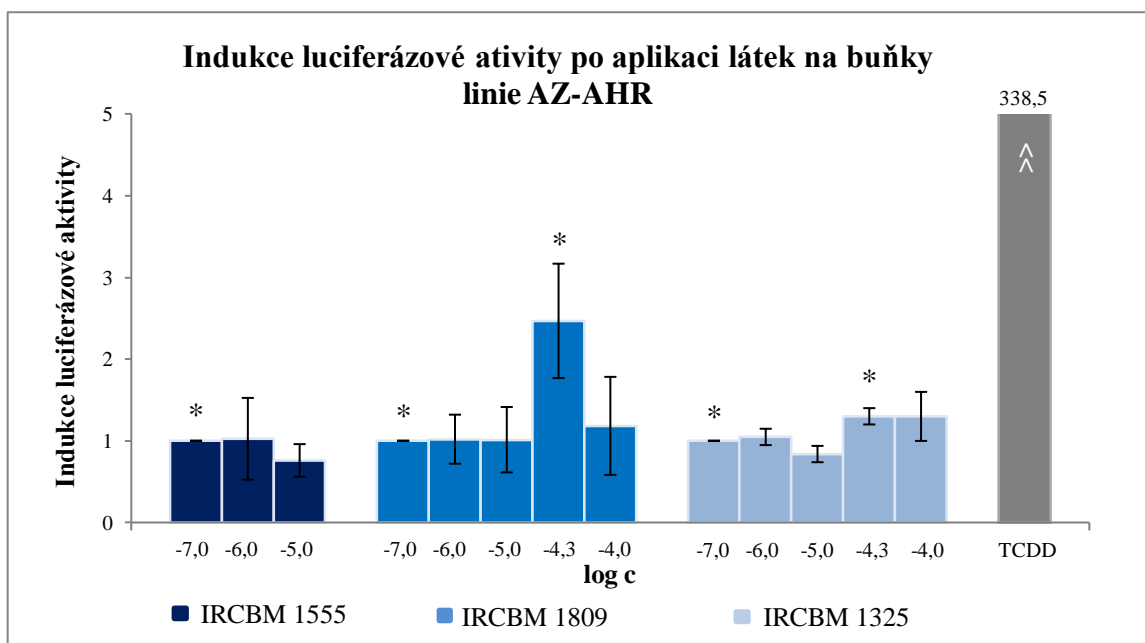
Graf 2: Závislost viability buněk linie AZ-GR na koncentraci testovaných látek

Buňky linie AZ-GR byly vysety do 96 jamkové destičky. Následující den byla provedena aplikace testovaných látek v koncentracích 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M a 100 μ M, pozitivní kontroly (2% triton) a negativní kontroly DMF (0,1%, v/v). Po 24 hodinové inkubaci bylo aplikováno MTT a spektrofotometricky změřena absorbance při vlnové délce 570 nm. Hodnota 100 % odpovídá absorbanci naměřené u 100 nM koncentrace látky. Uvedeny jsou průměrné výsledné hodnoty (průměrné hodnoty čtyř nezávislých experimentů u každé látky). * – hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

V buněčné linii AZ-GR bylo, podobně jako v předešlé linii AZ-AHR, pozorováno snížení viability buněk s rostoucí koncentrací látky IRCBM 1555 (Graf 2). Nejvýraznější signifikantní snížení životaschopnosti na 75 % bylo způsobeno v koncentraci 100 μ M (Graf 2). Látky IRCBM 1809 a IRCBM 1325 ve všech testovaných koncentracích nezpůsobily snížení životaschopnosti u buněk AZ-GR podobně jako v případě buněčné linie AZ-AHR, pro stanovení aktivity GR byly použity koncentrace 100 nM, 1 μ M a 10 μ M pro látku IRCBM 1555 a celé koncentrační rozmezí pro IRCBM 1809 a IRCBM 1325.

7.2 Interakce testovaných látek s aryl uhlovodíkovým receptorem

Pomocí metody Reporter gene assay v agonistickém módu byla testována schopnost látek aktivovat aryl uhlovodíkový receptor. Míra aktivace receptoru je dána poměrem luciferázové aktivity testované látky vztažené k negativní kontrole.

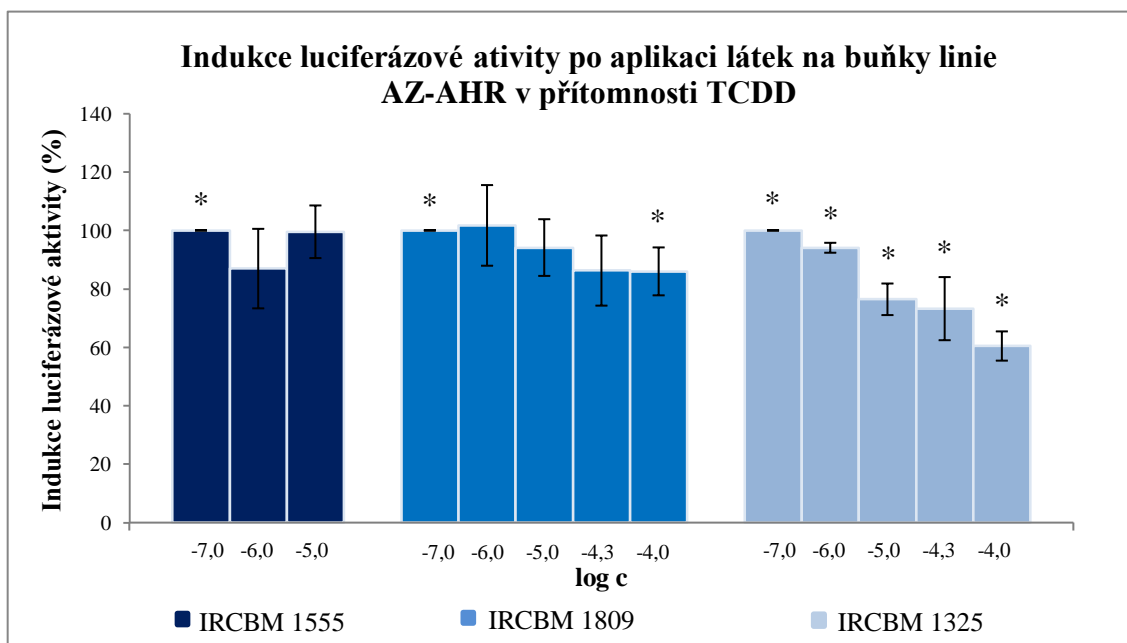


Graf 3: Závislost indukce luciferázové aktivity na koncentraci testovaných látek aplikovaných na buňky linie AZ-AHR

Buňky linie AZ-AHR byly vysety do 96 jamkové destičky. Následující den byla provedena aplikace testovaných látek v koncentracích 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M a 100 μ M, pozitivní kontroly TCDD (5 nM) a negativní kontroly DMF (0,1%, v/v). Po 24 hodinové inkubaci byla měřena luciferázová aktivita. Uvedeny jsou průměrné výsledné hodnoty vztažené ke koncentraci 100 nM (průměrné hodnoty tří nezávislých experimentů u každé látky). * – hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

Při sledování vlivu látek na transkripční aktivitu AhR způsobila látka IRCMB 1809 v koncentraci 50 μ M signifikantní 2,8 násobnou indukci, nicméně v koncentraci 100 μ M byl pozorován pokles luciferázové aktivity na hodnotu negativní kontroly. Modelový aktivátor TCDD v koncentraci 5 nM indukoval luciferázovou aktivitu 339 krát (Graf 3). Indukce způsobená IRCBM 1809 nedosahuje ani 1 % hodnoty indukce TCDD. Látky IRCBM 1555 a IRCBM 1325 neměly na aktivitu AhR žádný vliv (Graf 3).

Metodou Reporter gene assay v antagonistickém módu byla sledována schopnost látek inhibovat AhR v přítomnosti TCDD.



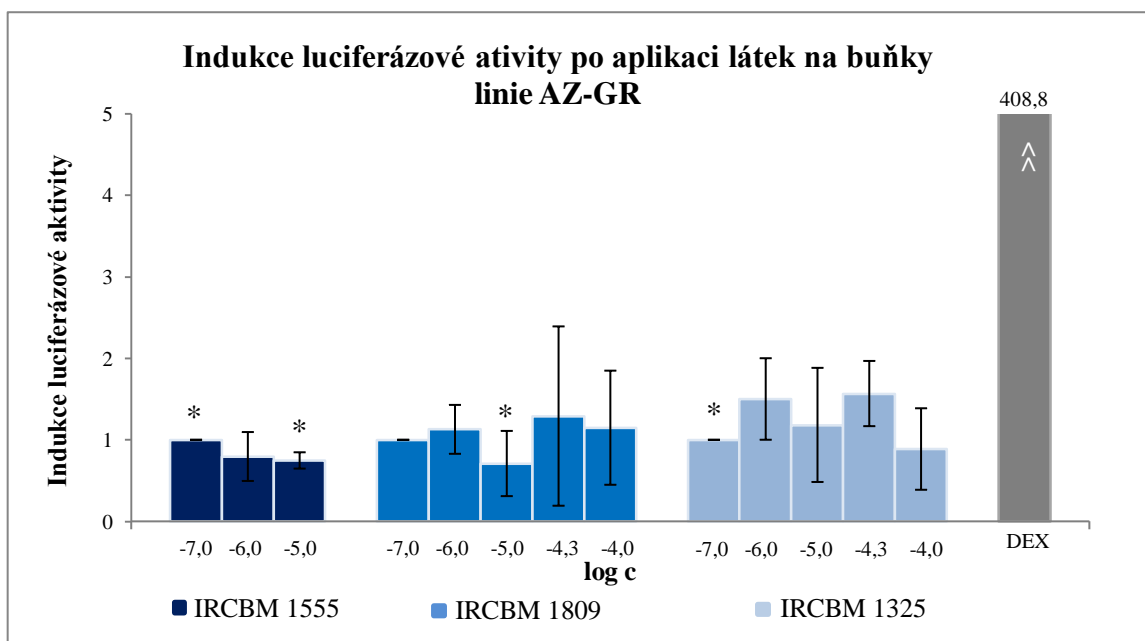
Graf 4: Závislost indukce luciferázové aktivity vyjádřené v procentech na koncentraci testovaných látek aplikovaných na buňky linie AZ-AHR v přítomnosti modelového ligandu TCDD

Buňky linie AZ-AHR byly vysety do 96 jamkové destičky. Následující den byla provedena aplikace testovaných látek v koncentracích 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M a 100 μ M s TCDD (5 nM), pozitivní kontroly TCDD (5 nM) a negativní kontroly DMF (0,1%, v/v). Po 24 hodinách inkubace byla měřena luciferázová aktivita. Uvedeny jsou průměrné výsledné hodnoty vztažené ke koncentraci 100 nM (průměr pěti nezávislých experimentů u každé látky). * – hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

Látky IRCBM 1809 a IRCBM 1325 s rostoucí koncentrací snižovaly luciferázovou aktivitu indukovanou TCDD. Nejvýrazněji byla luciferázová aktivita signifikantně snížena látkou IRCBM 1325 v koncentraci 100 μ M a to na 60,4 %. Látka IRCBM 1809 v koncentraci 100 μ M signifikantně snížila luciferázovou aktivitu na 86 % indukce TCDD (Graf 4). Látka IRCBM 1555 ve všech testovaných koncentracích neměla vliv na luciferázovou aktivitu indukovanou TCDD (Graf 4).

7.3 Interakce testovaných látek s glukokortikoidním receptorem

Pomocí metody Reporter gene assay v agonistickém módu byla testována schopnost látek aktivovat glukokortikoidní receptor. Míra aktivace receptoru je dána poměrem luciferázové aktivity testované látky vztažené k negativní kontrole.

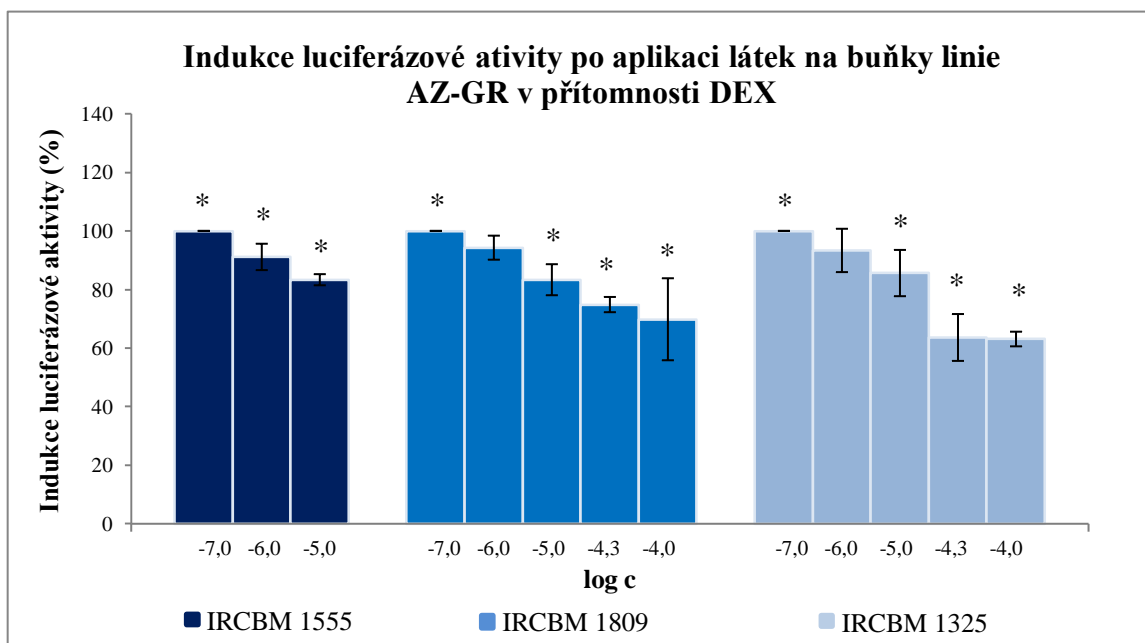


Graf 5: Závislost indukce luciferázové aktivity na koncentraci testovaných látek aplikovaných na buňky linie AZ-GR

Buňky linie AZ-GR byly vysety do 96 jamkové destičky. Následující den byla provedena aplikace testovaných látek v koncentracích 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M a 100 μ M, pozitivní kontroly DEX (100 nM) a negativní kontroly DMF (0,1%, v/v). Po 24 hodinové inkubaci byla měřena luciferázová aktivita. Uvedeny jsou reprezentativní výsledky vztažené ke koncentraci 100 nM (průměrné hodnoty čtyř nezávislých experimentů u každé látky). * – hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

Při sledování vlivu látek na transkripční aktivitu GR způsobila látka IRCBM 1325 v koncentraci 50 μ M nesignifikantní 1,6 násobnou indukci. V koncentraci 100 μ M byl však pozorován pokles luciferázové aktivity (Graf 5). Modelový aktivátor DEX v koncentraci 100 nM indukoval luciferázovou aktivitu 409 krát. Indukce způsobená testovanými látkami nedosahuje ani 1 % hodnoty indukce DEX (Graf 5). Testované látky neměly vliv na aktivitu GR.

Metodou Reporter gene assay v antagonistickém módu byla sledována schopnost látek inhibovat GR v přítomnosti DEX.



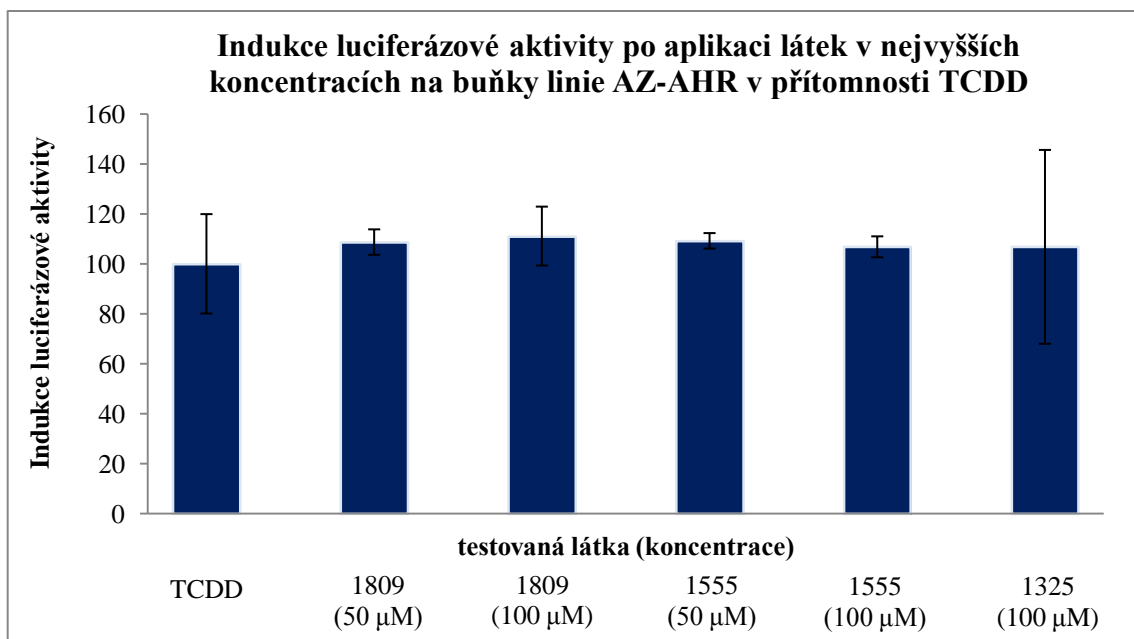
Graf 6: Závislost indukce luciferázové aktivity vyjádřené v procentech na koncentraci testovaných látek aplikovaných na buňky linie AZ-GR v přítomnosti modelového ligandu DEX

Buňky linie AZ-GR byly vysety do 96 jamkové destičky. Následující den byla provedena aplikace testovaných látek v koncentracích 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M a 100 μ M s DEX (100 nM), pozitivní kontroly DEX (100 nM) a negativní kontroly DMF (0,1%, v/v). Po 24 hodinách inkubace byla měřena luciferázová aktivita. Uvedeny jsou průměrné výsledné hodnoty vztažené ke koncentraci 100 nM (IRCBM 1809 – průměr tří nezávislých experimentů, IRCBM 1555 a IRCBM 1325 – průměr čtyř nezávislých experimentů). * – hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

Z grafu lze vyčíst, že oba testované pyrimidinové deriváty s rostoucí koncentrací snižovaly luciferázovou aktivitu indukovanou DEX. Látka IRCBM 1809 v koncentraci 100 μ M signifikantně snížila luciferázovou aktivitu indukovanou DEX na 69,8 %. Nejvýrazněji byla luciferázová aktivita indukovaná DEX signifikantně snížena látkou IRCBM 1325 v koncentraci 100 μ M a to na 63,1 % (Graf 6). Látka IRCBM 1555 neměla v testovaných koncentracích na luciferázovou aktivitu indukovanou DEX výrazný vliv.

7.4 Inhibice enzymu luciferázy

Test inhibice luciferázové aktivity byl proveden za účelem potvrzení antagonistického účinku látek vzhledem k AhR a vyloučení interakce testovaných látek s luciferázou.



Graf 7: Indukce luciferázové aktivity po aplikaci látek v nejvyšších koncentracích na buňky linie AZ-AHR v přítomnosti TCDD

Buňky linie AZ-AHR byly vysety do 96 jamkové destičky. Následující den byla provedena aplikace roztoku 200 μl média s 0,2 μl 5nM TCDD. Po 24 hodinách inkubace byl připraven buněčný lyzát. Buněčný lyzát 10x naředěný lyzačním pufrem byl po 1 ml napipetován do pěti mikrozkušavek. K lyzátu byly přidány roztoky testovaných látek (50μM a 100μM IRCBM 1809, 50μM a 100μM IRCBM 1555, 100μM IRCBM 1325) a byla změřena luciferázová aktivita. Hodnoty indukce luciferázové aktivity se vztahují k negativní kontrole (buněčný lyzát bez přídatku testovaných látek). Uvedeny jsou výsledky jednoho experimentu.

Z naměřených hodnot je patrné, že testované látky nezpůsobují snížení luciferázové aktivity v porovnání s TCDD indukovanou luciferázovou aktivitou (Graf 7) a pravděpodobně nemají vliv na luciferázovou aktivitu.

8 Diskuze

V této práci byla studována interakce derivátů tetrahydropyridinu a tetrahydropyrimidinu s jadernými receptory AhR a GR. Aktivace či inhibice jaderných receptorů koreluje se zvýšením či snížením exprese enzymů metabolizujících xenbiotika a ovlivňuje tak farmakokinetiku některých léčiv. Vliv derivátů na jaderné receptory byl testován u dvou buněčných linií – AZ-AHR a AZ-GR. Testovány byly deriváty pyrimidinu IRCBM 1809 a IRCBM 1325 a derivát pyridinu IRCBM 1555 v koncentracích 100 nM, 1 μM, 10 μM, 50 μM a 100 μM.

Látka IRCBM 1555 byla v koncentracích 50 μM a 100 μM cytotoxická pro buňky AZ-AHR a způsobila signifikantní snížení viability buněk o 22 % a 20 %. Při sledování vlivu IRCBM 1555 na aktivitu AhR nebyly z důvodu cytotoxicity tyto dvě nejvyšší koncentrace testovány. Nicméně, nebyla prokázána žádná agonistická či antagonistická aktivita výše zmíněné látky vzhledem k AhR. Zajímavější výsledky byly pozorovány při testování tetrahydropyrimidinových derivátů IRCBM 1809 a IRCBM 1325, které nevykazovaly cytotoxicitu vzhledem k buněčné linii AZ-AHR a nezpůsobily ani aktivaci AhR v žádné z testovaných koncentrací. U těchto dvou látek byl však pozorován antagonistický vliv na AhR, který byl výraznější u látky IRCBM 1325, jež s rostoucí koncentrací signifikantně snižovala aktivitu receptoru až na 60,4% v porovnání s modelovým aktivátorem TCDD. Látka IRCBM 1809 v koncentraci 100 μM inhibovala AhR aktivovaný TCDD o 14 %, i v tomto případě se jednalo o pokles signifikantní. Tyto výsledky by měly být brány v potaz v dalším výzkumu a látkám by měla být věnována náležitá pozornost. AhR je významným faktorem metabolismu karcinogenních látek. Antagonismus testovaných látek by mohl mít potenciál v protinádorové léčbě (Murray *et al.*, 2014). Obdobně jako antagonisté AhR resveratrol a MNF (3'-methoxy-4'-nitroflavon) by mohl být využíván k inhibici karcinogenního působení a snížení toxicity environmentálních polutantů (Casper *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2003). Dále je možné uvažovat nad uplatněním testovaných tetrahydropyrimidinových derivátů jako chemopreventivních preparátů, podobně jako je tomu v případě antagonisty AhR FPP-3 (viz 5.2) (Hwang *et al.*, 2008). Negativním následkem aktivace AhR inhibítorem Src kináz PP2 jsou alergické reakce (viz 5.1). Blokace receptoru testovanými látkami s antagonistickým vlivem by mohla zabránit vzniku těchto vedlejších účinků (Frauenstein *et al.*, 2015)

Při sledování vlivu látek IRCBM na GR byla, podobně jako v případě AhR, pozorována cytotoxicita látky 1555 u linie AZ-GR, životaschopnost buněk byla snížena

v koncentraci 50 μM o 21 % a v koncentraci 100 μM o 25 % oproti negativní kontrole. Tato látka nevykazovala v testovaných koncentracích agonistickou aktivitu vůči GR. V nejvyšší testované koncentraci 10 μM však signifikantně inhibovala aktivaci GR vyvolanou DEX o 15 %. Látky IRCBM 1809 a IRCBM 1325 nesnižovaly životaschopnost buněčné linie AZ-GR, ani nevykazovaly agonistickou aktivitu vůči GR, byly však prokázány jejich antagonistické účinky, díky nimž by mohly být využity jako případné antistresové látky. IRCBM 1809 signifikantně snížila aktivaci GR indukovanou DEX o 30 % a IRCBM 1325 způsobila inhibici aktivovaného GR prostřednictvím DEX v koncentraci 50 μM o 36 % a v koncentraci 100 μM o 37 %. Z tohoto pohledu se jedná o výrazné signifikantní inhibice aktivovaného GR. Antagonismu látek by bylo možné využít v medicínské praxi jakožto medikamentů snižujících účinek glukokortikoidů předepisovaných například při depresivních stavech (Eda *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Současné studie se zabývají blokací GR v rámci léčby endokrinologické poruchy Cushingova syndromu (Feelders et Hofland, 2013; Fleseriu *et al.*, 2012). Příčinou Cushingova syndromu je zvýšená sekrece kortizolu v lidském těle. Klinickými příznaky choroby jsou obezita, svalová slabost, diabetel mellitus, dyslipidémie, hypertenze a emoční labilita (Giraldi *et al.*, 2003; Newell-Price *et al.*, 1998; Newell-Price *et al.*, 2006). Významné výsledky v léčbě Cushingova syndromu vykazuje mifepriston, preparát blokující progesteronový receptor používaný k farmakologickému ukončení těhotenství, jenž je zároveň antagonistou GR (Trávník, 2015). Obdobné účinky lze předpokládat u testovaných tetrahydropyrimidinových derivátů.

9 Závěr

Bakalářská práce se věnovala testování vlivu nově syntetizovaných derivátů tetrahydropyridinu IRCBM 1555 a tetrahydropyrimidinu IRCBM 1809 a IRCBM 1325 na transkripční aktivitu jaderných receptorů AhR a GR. Literární rešerše pojednává o vybraných jaderných receptorech, jejich struktuře, funkci a mechanismu účinku v rámci procesu biotransformace xenbiotik. Zahrnuje přehled přírodních sloučenin, které ve své struktuře, obdobně jako testované látky, obsahují pyridin nebo pyrimidin. Zmíněno je také využití syntetických sloučenin této struktury.

Cílem experimentální části práce bylo stanovení cytotoxicity daného koncentračního rozmezí testovaných látek pomocí MTT testu a sledování interakcí s receptory AhR a GR metodou Gene reporter assay ve dvou módech, agonistickém a antagonistickém. Zajímavé výsledky byly získány při testování derivátů obsahující tetrahydropyrimidinový skelet IRCBM 1809 a IRCBM 1325. Tyto látky nebyly v testovaném koncentračním rozpětí toxické a nevykazovaly agonistickou aktivitu vůči AhR ani GR. Byla však zaznamenána jejich antagonistická aktivita vůči oběma výše zmíněným receptorům, která byla výraznější v případě GR. Z těchto důvodů by bylo dobré věnovat látkám další pozornost, jejich vlastností by mohlo být využito v medicínské praxi.

10 Seznam použité literatury

Vědecké publikace

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. *et al.* (2000): The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185–2195.

Angius, F., Floris, A. (2014): Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. *Toxicology in Vitro*, 29(2): 314–319.

Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(5-6): 737–747.

Arias, H. R., Targowska-Duda, K. M., Feuerbach D., Jozwiak K. (2015): The antidepressant-like activity of nicotine, but not of 3-furan-2-yl-*N*-p-tolyl-acrylamide, is regulated by the nicotinic receptor β 4 subunit. *Neurochemistry International*, 87: 110–116.

Bersten, D. C., Sullivan, A. E., Peet, D. J., Whitelaw, M. L. (2013): bHLH–PAS proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(12): 827–841.

Bocáková, M. (2009): Bioluminescence u brouků a její evoluce. *ŽIVA*, 5: 226–227.

Burbach, K. M., Poland, A., Bradfield, C. A. (1992): Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17): 8185–8189.

Burczynski, M. E., Penning, T. M. (2000): Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer research*, 60(4): 908–915.

Casper, R. F., Quesne, M., Rogers, I. M., Shirota, T., Jolivet, A., Milgrom, E., Savouret, J. F. (1999): Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Molecular pharmacology*, 56(4): 784–790.

Creusot, F., Acs, G. Christmang, J. K. (1982): Inhibition of DNA Methyltransferase and Induction of Friend Erythroleukemia Cell Differentiation by 5-Azacytidine and 5-Aza-2'-deoxycytidine. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(4): 2041–2048.

De Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., Subramani, S. (1987): Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular biology*, 7(2): 725–737.

Dean, M., Allikmets, R. (2001): Complete characterization of the human ABC gene family. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 33(6): 475–479.

Denison, M. S., Nagy, S. R. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43(1): 309–334.

Dietrich, C., Kaina, B. (2010): The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell–cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis*, 31(8): 1319–1328.

Dobson, M. G., Redfern, C. P., Unwin, N., Weaver, J. U. (2001): The N363S Polymorphism of the Glucocorticoid Receptor: Potential Contribution to Central Obesity in Men and Lack of Association with Other Risk Factors for Coronary Heart Disease and Diabetes Mellitus 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(5): 2270–2274.

Dybing, E., Schwarze, P. E., Nafstad, P., Victorin, K., Penning, T. M. (2013): Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air and cancer. *Air Pollution and Cancer*, 75: 75–94.

Escriva, H., Bertrand, S., Laudet, V. (2004): The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays in biochemistry*, 40: 1–16.

Faillace, M. P., Zwiller, J., Bernabeu R. O. (2015): Effects of combined nicotine and fluoxetine treatment on adult hippocampal neurogenesis and conditioned place preference. *Neuroscience*, 300: 104–115.

Feelders, R. A., Hofland, L. J. (2013): Medical treatment of Cushing's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(2): 425–438.

Fleseriu, M., Biller, B. M., Findling, J. W., Molitch, M. E., Schteingart, D. E., Gross, C. (2012): Mifepristone, a glucocorticoid receptor antagonist, produces clinical and metabolic benefits in patients with Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(6): 2039–2049.

Frauenstein, K., Tigges, J., Soshilov, A. A., Kado, S., Raab, N., Fritsche, E., Haendeler, J., Denison, M. S., Vogel, Ch. F. A., Haarmann-Stemmann, T. (2015): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by the widely used Src family kinase inhibitor 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl) pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine (PP2). *Archives of toxicology*, 89(8): 1329–1336.

Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K. (2010): Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 86(1): 40–53.

Galmarini, C. M., Jordheim, L., Dumontet, Ch. (2003): Pyrimidine nucleoside analogs in cancer treatment. *Expert review of anticancer therapy*, 3(5): 717–728.

Giraldi, F. P., Moro, M., Cavagnini, F. (2003): Gender-related differences in the presentation and course of Cushing's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(4): 1554–1558.

Goldstein, I., Lue, T. F., Padma-Nathan, H., Rosen, R. C., Steers, W. D., Wicker, P. A. (1998): Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *New England Journal of Medicine*, 338(20): 1397–1404.

Gonzalez, F. J. (1998): The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicology letters*, 102: 161–166.

Gram, T. E., Okine, L., Gram, R. A. (1986): The Metabolism of Xenobiotics by Certain Extrahepatic Organs and its Relation to Toxicity*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 26(1): 259–291.

Guengerich, F. P. (2007): Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology*, 21(1): 70–83.

Hagenbuch, B., Meier, P. J. (2003): The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1609(1): 1–18.

Hahn, M. E. (2002): Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-biological interactions*, 141(1): 131–160.

Hankinson, O. (1995): The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 35(1): 307–340.

Harper, P. A., Wong, J. M., Lam, M. S., Okey, A. B. (2002): Polymorphisms in the human AH receptor. *Chemico-biological interactions*, 141(1): 161–187.

Hernandez, C., Molusky, M., Li, Y., Li, S., Lin, J. D. (2010): Regulation of Hepati ApoC3 Expression by PGC-1 β Mediates Hypolipidemic Effect of Nicotonic Acid. *Cell Metabolism*, 12(4): 411–419.

Holla, B. S., Mahalinga, M., Karthikeyan, M. S., Akberali, P. M., Shetty, N. S. (2006): Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(6): 2040–2047.

Homewood, J, Bond, N. W. (1999): Thiamin Deficiency and Korsakoff's Syndrome: Failure to Find Memory Impairments Followig Nonalcoholic Werncke's Encephalopathy. *Alcohol*, 19(1): 75–84.

Hwang, Y. P., Han, E. H., Choi, J. H., Kim, H. G., Lee, K. J., Jeong, T. Ch., Lee, E. S., Jeong, H. G, Kolluri, S. K., Kerkvliet, N. I., Forsthuber, T., Yen, W., Zhi, L., Negro-Vilar, A., Miner, J. N. (2008): Chemopreventive effects of Furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone against 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-inducible genotoxicity. A New Class of Rapidly Metabolized Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligands that Induce AhR-Dependent Tregs and Prevent Murine Graft-Versus-Host Disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228(3): 343–350.

Jacobs, M. N., Dickins, M., Lewis, D. F. V. (2003): Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor β (hER β), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor α (hER α) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) ligand binding domain from the human PPAR γ crystal structure. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 84(2): 117–132.

Janošek, J., Hilscherová, K., Bláha, L., Holoubek, I. (2006): Environmental xenobiotics and nuclear receptors – Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro*, 20(1): 18–37.

Kantarjian, H. M., Issa, J. J., Rosenfeld, C. S., Bennett, J. M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., de Castro, C., Ravandi, F., Helmer, R., Shen, L., Nimer, S. D., Leavitt, R., Raza, A., Saba, H. (2006): Decitabine Improves Patient Outcomes in Myelodysplastic Syndromes: Results of a Phase III Randomized Study. *Cancer*, 106(8): 1794–1803.

Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F. J., Faerl, S., Issa, J., Garcia-Manero, G., Rios M. B., Shan, J., Andreeff, M., Keating, M., Talpaz, M. (2003): Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 98(3): 522–528.

Kim, Y., Cho, Y. (2014): Evaluation of vitamin B₆ intake and status of 20- to 64-year-old Koreans. *Nutrition Research and Practice*, 8(6): 688–694.

Kostrouchová, M., Kostrouch, Z. (2015): Nuclear receptors in nematode development: Natural experiments made by a fylum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849(2): 224–237.

Kousalová, L., Baranová, J., Anzenbacher, P. (2003): Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klinická farmakologie*, 17: 151–157.

Lapčík, O. (2003): O velké rodině a sirotcích. *Vesmír*, 82: 392–394.

Lees, M. J., Whitelaw, M. L. (1999): Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Molecular and cellular biology*, 19(8): 5811–5822.

Lewis, D. F. V., Watson, E., Lake, B.G. (1998): Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutation Research*, 410(3): 245–270.

Liddicoat, C., Huckler, B., Liang, H., Vriesekoop, F. (2015): Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC. *Food Chemistry*, 177: 325–329.

Lin, J. H., Yamazaki, M. (2003): Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics. *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.

Marek, J., Malinak, D., Dolezal, R., Soukup, O., Pasdiorova, M., Dolezal, M., Kuca, K. (2015): Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules*, 20(3): 3681–3696.

McGuire, J., Whitelaw, M. L., Pongratz, I., Gustafsson, J. A., Poellinger, L. (1994): A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Molecular and cellular biology*, 14(4): 2438–2446.

Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1619(3): 263–268.

Movassaghi, M., Hill, M. D., & Ahmad, O. K. (2007). Direct synthesis of pyridine derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 129(33): 10096–10097.

Mosmann, T. (1983): Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55–63.

Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A. B., Nieman, L. K. (2006): Cushing's syndrome. *The Lancet*, 367(9522): 1605–1617.

Newell-Price, J., Trainer, P., Besser, M., Grossman, A. (1998): The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocrine reviews*, 19(5): 647–672.

Novotná, A., Pávek, P., Dvořák, 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.

Novotná, A., Pávek P., Dvořák, Z. (2012): Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(5): 842–847.

Oakley, R. H., Cidlowski, J. A. (2013): The biology of the glucocorticoid receptor: new signalling mechanisms in health and disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5): 1033–1044.

Pandey, S., Garg, P., Lee, S., Choung H., Choung, Y., Choung, P., Chung, J. H. (2014): Nucleotide biosynthesis arrest silencing SHMT1 function via vitamin B₆-coupled vector and effects on tumor growth inhibition. *Biomaterials*, 35(34): 9332–9342.

Pawlak, A., Strzadala, L., Kalas, W. (2015): Non-genomic effects of the NR4A1/Nur77/TR3/NGFIB orphan nuclear receptor. *Steroids*, 95: 1–6.

Perdew, G. H. (1988): Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry*, 263(27): 13802–13805.

Petrulis, J. R., Hord, N. G., Perdew, G. H. (2000): Subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor is modulated by the immunophilin homolog hepatitis B virus X-associated protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48): 37448–37453.

Pitten, F. A., Kramer, A. (2000): Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittel-Forschung*, 51(7): 588–595.

Pollenz, R. S. (2002): The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chemico-biological interactions*, 141(1): 41–61.

Raj, K., Mufti, G. J. (2006): Azacytidine (Vidaza®) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2(4): 377–388.

Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A., Duffraisse, M., Laudet, V. (2001): How many nuclear hormone receptors are there in the human genome. *Trends in Genetic*, 17(10): 554–556.

Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., Laudet, V. (2003): The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*, 116(4): 585–586.

Roskoski, R. (2004): Src protein–tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(4): 1155–1164.

Saglio, G., Kim, D. W., Issaragrisil, S., Le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., ... Gallagher, N. (2010): Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 362(24): 2251–2259.

Sánchez-Abarca, L. I., Gutierrez-Cosio, S., Santamaría, C., Blanco, B., Herrero-Sánchez, C., García, J. L., Carrancio, S., Hernández-Campo, P., Gonzáles, F. J., Flores, T., Ciudad, L., Ballestar, E., del Cañizol, C., San Miguel, J. F., Pérez-Simon, J. A. (2010): Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood Journal*, 115(1): 107–121.

Scudiero, D. A., Schoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. (1988): Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, 48(17): 4827–4833.

Scherließ, R. (2011): The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 411(1): 98–105.

Schoneveld, O. J. L. M., Gaemers, I. C., Lamers, W. H. (2004): Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*, 1680(2): 114–128.

Spinneker, A., Sola, R., Lemmen, V., Castillo, M. J., Pietrzik, K., González-Gross, M. (2007): Vitamin B₆ status, deficiency and its consequences – an overview. *Nutrición hospitalaria*, 22: 7–24.

Stefani, H. A., Oliviera, C. B., Almeida, R. B., Pereira, C. M. P., Braga, R., C., Vella, R., Borges, V. C., Savegnago, L., Nogueira, C. W. (2006): Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(4): 513–518.

Stockert, J. C., Blázquez–Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., Villanueva Á. (2012): MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8): 785–796.

Strunecká, A., Patočka, J. (2000): Nikotin: jed nebo lék? *Vesmír*, 79: 204–208.

Szakács, Z., Béni, S., Varga, Z., Örfi, L., Kéri, G., Noszál, B. (2005): Acid-base profiling of imatinib (gleevec) and its fragments. *Journal of medicinal chemistry*, 48(1): 249–255.

Trávník, P. (2015): Principy farmakologického ukončení těhotenství a evakuace děložní dutiny. *Praktické lékařství*, 11(1): 6–7.

Vanden Heuvel, J. P. (2009): Nuclear hormone receptors: A brief overview. *Nuclear Receptor Resource*: 1–5.

Vasiliou, V., Vasiliou, K., Nebert, D. W. (2009): Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics*, 3(3): 281–290.

Vaverková, H. (2010): Fixní kombinace ER niacin/laropiprant. *Remedia*, 4: 214–222.

Vrzal, R., Ulrichová J., Dvořák, Z. (2004): Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomedical Papers*, 148(1): 3–10.

Wallace, A. D., Cidlowski, J. A. (2001): Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry*, 276(46): 42714–42721.

Knižní zdroje

Albert, A. (1968): *Heterocyclic Chemistry, an Introduction*. Athlone Press Londýn, 2. vydání, 547 s., ISBN 978-0485110920.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Walter, P. (2001): *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Ústí nad Labem, 1. svazek, 630 s., ISBN 80-902906-0-4.

Arenas-Huertero, F., Villeda-Cuevas, D., Apátiga-Vega, E., Miguel-Pérez, G., Trillo-Tinoco, J. (2011): Molecular markers associated with the biological response to aromatic hydrocarbons from urban air in humans. *Air Pollution - New Developments*. INTECH Open Access Publisher, s. 324, ISBN 978-953-307-527-3.

Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. (2012): *Organic chemistry*. Oxford University Press, 2. vydání, 1234 s., ISBN 978-0-19-927029-3.

Červinka, O., Dědek, V., Ferles, M., (1980): *Organická chemie*. Nakladatelství technické literatury Praha, 2. vydání, 791 s., ISBN 80-85427-03-6.

Dostálek M., Janošíková E, Juřica J., Zahradníková L. (2006): *Farmakokinetika*. Grada Publishing Praha, 1. vydání, 219 s., ISBN 80-247-1464-7.

Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J. (2007): *Farmakochemie*. Vydavatelství VŠCHT Praha, 3. vydání, 639 s., ISBN 978-80-7080-875-7.

Hradil, P. (2007): *Moderní metody organické syntézy v reakčních schématech*. Univerzita Palackého Olomouc, 1. vydání, 393 s., ISBN 978-80-244-1657-1.

Hodgson, E. (2010): A textbook of modern toxicology. John Wiley & Sons, New Jersey, 648 s., ISBN 978-0-470-46206-5.

Holgate, S. T., Polosa, R. (2008): Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 8(3): 218-230.

Laudet, V., Gronemeyer, H. (2002): The Nuclear Receptor FactsBook. Academic Press, Londýn, 461s., ISBN 0-12-437735-1.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. (2004): Farmakologie a toxikologie. Grada Publishing, 2. vydání, Praha, 728 s., ISBN 80-247-0836-1.

McMurray, J. (2007): Organická chemie. Vydavatelství VŠCHT Praha, 1. vydání, 1270 s., ISBN 978-80-7080-637-1.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (2002): Harperova Biochemie. Nakladatelství H + H Jinočany, 4. vydání, 872 s., ISBN 80-7319-013-3.

Murugan, R., Scriven, E. F. V. (2013): Pyridines: from lab to production. Elsevier, s. 1-14, ISBN: 978-0-12-385235-9.

Parkinson, A. (2001). Biotransformation of xenobiotics. McGraw-Hill, New York. Dostupné z: <http://www.farmasi.unud.ac.id/ind/wp-content/uploads/Bio-Transformation-of-Xenobiotics.pdf>

Safe, S. (2001): Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicology letters* 120(1): 1-7.

Skálová, L., Boušová, I., Machala, M., Pávek, P., Podlipná, R., Souček, P., Szotáková, B., Vondráček, J., Wsól, V. (2011): Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Karolinum, Praha. 162 s., ISBN 978-80-246-1917-0.

Vodrážka, Z. (2002): Biochemie. Academia, 2. vydání, Praha, 191 s., ISBN 80-200-0600-1.