

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Alexandra Brašeňová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Profílovanie vybraných skupín látok voči transkripčnej
aktivite AhR v reportérovej línii AZ-AhR**

Bakalárska práca

Alexandra Brašeňová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: RNDr. Peter Illés Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Alexandra BRAŠEŇOVÁ**
Osobní číslo: **R20693**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Profílování vybraných skupin látek voči transkripční aktivitě AhR v reportérové linii AZ-AHR.**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
2. Osvojení si základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur.
3. Stanovení účinku vybraných látek na viabilitu buněk reportérové linie AZ-AHR pomocí metody MTT.
4. Určení vlivu vybraných látek na transkripční aktivitu AhR prostřednictvím "reporter gene assay" metody.
5. Zpracování a vyhodnocení výsledků, sepsání bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

1. Larigot L. et al. (2018) AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7: 1–9
2. Otarola G. et al. (2017) Aryl hydrocarbon receptor based bioassays for dioxin detection: thinking outside the box. *Journal of Applied Toxicology* 38: 437–449
3. Novotná A. et al. (2011) Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of AhR transcriptional activity: construction and characterization. *Environmental Science & Technology* 45: 10133–10139
4. Vondráček J. et al. (2017): Assessment of the aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-based reporter gene assay. *Environmental Pollution*, 220: 307–316

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Peter Illés, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 29. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. dubna 2022

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Alexandra Brašeňová
Názov práce	Profilovanie vybraných skupín látok voči transkripčnej aktivite AhR v reportérovej línii AZ-AhR
Typ práce	bakalárska
Pracovisko	Katedra buňčnej biológie a genetiky
Vedúci práce	RNDr. Peter Illés Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Kľúčové slová	aryl uhl'ovodíkový receptor, ligand, luciferázová reportérová esej, MTT test
Počet strán	68
Počet príloh	0
Jazyk	slovenský

Súhrn

Aryl uhl'ovodíkový receptor je ligandom aktivovaný transkripčný faktor. Neaktívny sa nachádza v cytoplazme a po aktivácii sa presúva do jadra. Zúčastňuje sa širokého spektra fyziologických procesov v ľudskom organizme, najznámejším z nich je metabolizmus xenobiotík.

Táto bakalárska práca je zameraná na štúdium transkripčnej aktivity AhR v bunkách reportérovej línie AZ-AhR po ich ovplyvnení vybranými skupinami látok. Pomocou luciferázovej reportérovej eseje sme zistili, že látky FICZ, PEL, BER, PCB126, TCDD, BaP, IAD, IPY výrazne indukovali transkripčnú aktivitu AhR. Na základe získaných výsledkov môžeme tvrdiť, že najvýraznejšími agonistickými účinkami na AhR sa prejavovali FICZ a TCDD. Praktická časť sa taktiež venovala sledovaniu životaschopnosti buniek po pôsobení jednotlivých skupín látok pomocou MTT testu. Experimenty ukázali, že žiadna z látok nemala výrazný cytotoxický účinok na testovanú bunkovú líniu AZ-AhR.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Alexandra Brašňová
Title	Profiling of selected groups of compounds toward transcriptional activity of AhR in reporter cell line AZ-AhR
Type of thesis	bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor	RNDr. Peter Illés Ph.D.
The year of presentation	2024
Keywords	aryl hydrocarbon receptor, ligand, luciferase reporter assay, MTT test
Number of pages	68
Number of appendices	0
Language	Slovak

Summary

The aryl hydrocarbon receptor is a ligand-activated transcription factor. The inactive AhR is located in the cytoplasm and after activation it is translocated into the nucleus. It participates in a wide range of physiological processes in the human body, the most known of which is metabolism of xenobiotics.

This bachelor's thesis is focused on the study of AhR transcriptional activity in cells of the reporter cell line AZ-AhR after application of selected groups of substances. Using a luciferase reporter assay, we found that the substances FICZ, PEL, BER, PCB126, TCDD, BaP, IAD, IPY significantly induced AhR transcriptional activity. Based on the obtained results, we can claim that FICZ and TCDD had the most intense agonist effects on the AhR. The practical part was also focused on monitoring the viability of cells after the exposure to selected groups of substances using a MTT test. The experiments showed that none of the substances had a significant cytotoxic effect on the tested AZ-AhR cell line.

Prehlásenie

Prehlasujem, že bakalársku prácu som vypracovala samostatne pod vedením RNDr. Petra Illésa Ph.D. a s použitím literárnych zdrojov, ktoré som uviedla do zoznamu literatúry.

V Olomouci, dňa.....

.....

Alexandra Brašeňová

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí hlavne vedúcemu mojej práce RNDr. Petrovi Illésovi Ph.D. za jeho čas, rady a trpezlivosť pri spracovávaní teoretickej časti a za jeho odborné vedenie experimentálnej časti. Taktiež by som sa chcela pod'akovať laboratóriu molekulárnej farmakológie a toxikológie za ich pomoc a rady pri práci. A v neposlednom rade mojej rodine a blízkym za podporu.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Ciele práce	2
3	Literárny prehľad.....	3
3.1	Aryl uhľovodíkový receptor (AhR)	3
3.1.1	História objavu AhR	3
3.1.2	Štruktúra AhR	4
3.1.3	Aktivácia AhR	5
3.1.4	Funkcie AhR	7
3.2	Ligandy AhR.....	9
3.2.1	Vybrané endogénne ligandy	9
3.2.2	Vybrané enviromentálne polutanty	11
3.2.3	Vybrané látky prírodného pôvodu	12
3.2.4	Vybrané metabolity črevnej mikrobioty	14
3.3	Bunková línia AZ-AhR (Hep-G2)	14
4	Materiál a metódy	16
4.1	Biologická materiál.....	16
4.2	Použité chemikálie a roztoky	16
4.3	Laboratórne pomôcky	17
4.4	Prístroje	18
4.5	Použité metódy.....	18
4.5.1	Kultivácia a pasážovanie buniek.....	18
4.5.2	Príprava buniek na experiment	19
4.5.3	Príprava a nanášanie látok pri luciferázovej reportérovej línii a teste cytotoxicity ..	19
4.5.4	Luciferázová reportérová esej.....	20

4.5.5	Test cytotoxicity (MTT test).....	21
5	Výsledky.....	22
5.1	Testovanie vplyvu vybraných skupín látok na transkripčnú aktivitu AhR pomocou luciferázovej eseje.....	22
5.1.1	Vplyv vybraných endogénnych ligandov na transkripčnú aktivitu AhR.....	22
5.1.2	Vplyv vybraných látok prírodného pôvodu na transkripčnú aktivitu AhR.....	25
5.1.3	Vplyv vybraných environmentálnych polutantov na transkripčnú aktivitu AhR.....	27
5.1.4	Vplyv vybraných metabolitov črevnej mikrobioty na transkripčnú aktivitu AhR.....	29
5.2	Stanovenie vplyvu vybraných látok na viabilitu buniek pomocou metódy MTT	31
5.2.1	Vplyv vybraných endogénnych ligandov na viabilitu buniek	31
5.2.2	Vplyv vybraných látok prírodného pôvodu na viabilitu buniek	32
5.2.3	Vplyv vybraných environmentálnych polutantov na viabilitu buniek.....	33
5.2.4	Vplyvu vybraných metabolitov črevnej mikrobioty na viabilitu buniek	35
6	Diskusia.....	37
7	Záver.....	41
8	Literatúra	43

ZOZNAM SKRATIEK

AHH	aryl uhl'ovodiková hydroláza
AhR	aryl uhl'ovodikový receptor
ARNT	AhR nuclear translocator
BaP	benzo[a]pyrén
bHLH	basic helix-loop-helix
BER	berberín
CAD	ochorenia koronárnych artérií
CoA	koenzým A
DBD	DNA viažuca doména (DNA binding domain)
DMSO	dimetylsulfoxid
DRE	dioxínový rezpozívny element (dioxin responsive element)
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
FBS	fetálne bovinné sérum
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]carbazole
HAHs	halogénované aromatické uhl'ovodíky
HB	hepatoblastóm
HCC	hepatocelulárny karcinóm
HLH	helix-loop-helix
HSP90	heat shock protein 90
IAD	indol-3-acetamid
IECs	črevné epitelové bunky
IPY	indol-3-pyruvát
kp23	kochaperón p23
KYNA	kyselina kynurénová (kynurenic acid)
LBD	ligand viažuca doména (ligand binding domain)
MTT	metyltetrazóliová soľ
PAHs	polycyklické aromatické uhl'ovodíky
PAS	period-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-single minded (Per/ARNT/Sim)

PBS	fosfátový pufor
PCB126	3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl
PEL	pelargonidín
RES	resveratrol
TA	tryptamín
TAD	transaktivačná doména (transcriptional activation domain)
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Triton X-100	oktylfenol etoxylát
TRP	tryptofán
XAP2	X-asociovaný proteín 2
XRE	xenobiotický rezpozívny element (xenobiotic response elements)

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok č. 1: Štruktúra aryl uhl'ovodíkového receptoru	5
Obrázok č. 2: Aktivácia aryl uhl'ovodíkového receptoru.....	7
Obrázok č. 3: Chemická štruktúra vybraných endogénnych ligandov	11
Obrázok č. 4: Chemická štruktúra vybraných enviromentálnych polutantov.....	12
Obrázok č. 5: Chemická štruktúra vybraných látok prírodného pôvodu	13
Obrázok č. 6: Chemická štruktúra vybraných metabolitov črevnej mikrobioty	14
Obrázok č. 7: Indukcia transkripčnej aktivity AhR po 4h a 24h účinku vybraných endogénnych ligandov.....	24
Obrázok č. 8: Indukcia transkripčnej aktivity AhR po 4h a 24h účinku vybraných látok prírodného pôvodu.....	26
Obrázok č. 9: Indukcia transkripčnej aktivity AhR po 4h a 24h účinku vybraných environmentálnych polutantov.....	28
Obrázok č. 10: Indukcia transkripčnej aktivity AhR po 4h a 24h účinku vybraných metabolitov črevnej mikrobioty	30
Obrázok č. 11: Vplyv vybraných endogénnych ligandov na životaschopnosť bunkovej línie AZ-AhR	32
Obrázok č. 12: Vplyv vybraných látok prírodného pôvodu na životaschopnosť bunkovej línie AZ-AhR	33
Obrázok č. 13: Vplyv vybraných environmentálnych polutantov na životaschopnosť bunkovej línie AZ-AhR	34
Obrázok č. 14: Vplyv vybraných metabolitov črevnej mikrobioty na životaschopnosť bunkovej línie AZ-AhR	36

1 ÚVOD

Aryl uhľovodíkový receptor (AhR) je ligandom aktivovaný transkripčný faktor zohrávajúci dôležité úlohy v organizme už pri jeho vývoji, ale taktiež pri metabolizme xenobiotík a látok endogénneho pôvodu. Zaujíma dôležitú úlohu pri udržiavaní homeostázy a je významnou súčasťou imunitnej odpovede hlavne v koži a gastrointestinálnom trakte. U človeka je AhR najviac zastúpený v pečeni, pľúcach a placente, ale je prítomný takisto v tráviacom trakte a srdci. Neaktívny sa nachádza v cytozole bunky. Po väzbe s ligandom je translokovaný do jadra, kde sa dimerizuje s jadrovým translokátorom AhR a spolu vytvoria komplex ligand/AhR/ARNT. Následne sa takto vzniknutý aktívny transkripčný komplex viaže na responzívny element v promótorovej oblasti cieľového génu a spúšťa jeho expresiu.

Je známych niekoľko skupín látok, ktoré aktivujú AhR. Sú to napríklad environmentálne polutanty, xenobiotiká ako sú dioxíny či polychlorované bifenyle, taktiež sem patria rôzne liečivá, endogénne látky či látky prírodného pôvodu. Najznámejším modelovým ligandom aryl uhľovodíkového receptora je TCDD. Medzi významné endogénne ligandy patrí FICZ, bilirubín a metabolity tryptofánu. Jedným z najviac preštudovaných environmentálnych polutantov patriacich do skupiny ligandov AhR je benzo[a]pyrén. V predkladanej bakalárskej práci bol stanovovaný vplyv štyroch vybraných skupín látok a to endogénnych ligandov, environmentálnych polutantov, látok prírodného pôvodu a metabolitov črevnej mikrobioty na transkripčnú aktivitu AhR.

Na štúdium transkripčnej aktivity AhR sa v súčasnej dobe využíva viacero experimentálnych metód. Jedným zo základných nástrojov vo výskume funkcií AhR sú luciferázové reportérové systémy. Táto *in vitro* metóda využíva stabilne transfekované bunkové línie pomocou reportérového plazmidu, nesúceho gén pre luciferázu. Po aktivácii AhR jeho ligandom dochádza k indukcii expresie génu pre luciferázu a tým k nárastu koncentrácie luciferázy v bunkách. Zvýšenie hladiny luciferázy je možné po pridaní substrátu veľmi jednoducho stanoviť spektrofotometricky, pričom intenzita luciferázovej aktivity koreluje s transkripčnou aktivitou AhR. V tejto bakalárskej práci bola použitá reportérová bunková línia AZ-AhR. Táto bunková línia bola vytvorená transfekciou bunkovej línie HepG2 luciferázovým reportérovým plazmidom responzívnym voči AhR.

2 CIELE PRÁCE

1. Vypracovanie literárnej rešerše na tému bakalárskej práce.
2. Osvojenie si základných techník práce v laboratóriu tkanivových kultúr.
3. Stanovenie účinku vybraných látok na viabilitu buniek reportérovej línie AZ-AhR pomocou metódy MTT.
4. Určenie vplyvu vybraných látok na transkripčnú aktivitu AhR prostredníctvom luciferázovej reportérovej eseje.
5. Spracovanie a vyhodnotenie výsledkov, spísanie bakalárskej práce.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Aryl uhľovodíkový receptor (AhR)

Aryl uhľovodíkový receptor (AhR) je ligandom aktivovaný transkripčný faktor. Gén pre AhR sa skladá z 11 exónov a má celkovú dĺžku 50 kilobáz genómovej DNA (Bennett *et al.*, 1996). Gén pre ľudský AhR bol lokalizovaný na krátkom ramene siedmeho chromozómu na lokuse 15 (7p15) (Le Beau *et al.*, 1994).

Podľa dostupných informácií sa predpokladá, že AhR proteín sa vyvinul približne pred 450 miliónmi rokov, na začiatku evolúcie stavovcov, ale ešte pred rozdelením kostnatých a chrupavkovitých rýb (Hahn *et al.*, 1994). Vďaka fylogenetickým analýzám bolo zistené, že AhR gén sa vyskytuje u všetkých skupín stavovcov (Hahn *et al.*, 1997).

3.1.1 História objavu AhR

Prvé poznatky o AhR sa objavujú od polovice 20. storočia, kedy sa skúmali toxické efekty dioxínu na ľuďoch. Dioxín je toxická látka, vznikajúca hlavne ako vedľajší produkt pri výrobe pesticídov, bielení papieroviny ale aj pri tavení. V 40. rokoch 20. storočia prepukla choroba, postihujúca hlavne pracovníkov tovární, ktorí boli vystavení pôsobeniu dioxínu. Táto choroba, neskôr pomenovaná chlorakné, bola charakteristická početnými léziami pokrývajúcimi rôzne časti tela. Prejavovali sa ako malé, svetlé, uzavreté, vystúpené vyrážky, ktoré sa po čase vyvinuli do tuhých podkožných cýst. Chlorakné bolo spájané aj s mnohými ďalšími zdravotnými komplikáciami ako pálenie očí, poruchy trávenia či neplodnosť (Schwartz, 1936; Meigs *et al.*, 1954).

Neskôr, pri štúdiu úlohy aryl uhľovodíkovej hydroxylázy (AHH) v myšiach došlo k objavu Ah lokusu. Táto štúdia načrtla, že Ah lokus by mohol byť súčasťou génového komplexu, ktorý je zapojený do regulácie imunologických odpovedí (Gielen *et al.*, 1972).

Skúmaním dioxínu spôsobujúceho chlorakné, bolo objavené, že táto látka sa dokáže viazať na špecifický proteín. V roku 1976 bol prvýkrát tento proteín popísaný ako receptor sprostredkujúci toxicitu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu (TCDD). V tejto štúdii bola pozornosť venovaná okrem TCDD aj iným halogénovaným aromatickým uhľovodíkom (HAHs). V priebehu výskumu bolo zistené, že študované látky sú vysoko toxické a majú spojitosť s negatívnymi vplyvmi na zdravie ľudí a zvierat ako je rakovina, imunotoxicita a taktiež

reprodukčná a vývinová toxicita. Pri štúdiu vplyvu týchto látok na organizmus, bol popísaný cytozolový receptor na ktorý sa viaže TCDD, a ktorý sa vyskytuje v rozličných typoch buniek vo viacerých tkanivách. Tento receptor bol pomenovaný AhR, pretože sa vyznačoval vysokou afinitou k aromatickým (aryl) uhľovodíkom. Spomínaná štúdia bola takisto venovaná molekulárnym mechanizmom, ktoré sú zodpovedné za toxické efekty TCDD a jemu podobných zlúčenín s dôrazom na úlohu AhR ako sprostredkovateľa týchto dejov. Bolo dokázané, že AhR hrá kľúčovú úlohu v regulácii génovej expresie zapojenej v metabolizme xenobiotík a taktiež v ich detoxifikácii. Autori pozorovali, že po vplyve dioxínov a HAHs došlo k aktivácii AhR, čo malo za následok zníženie toxicity týchto látok (Poland *et al.*, 1976; Poland *et al.*, 1982).

3.1.2 Štruktúra AhR

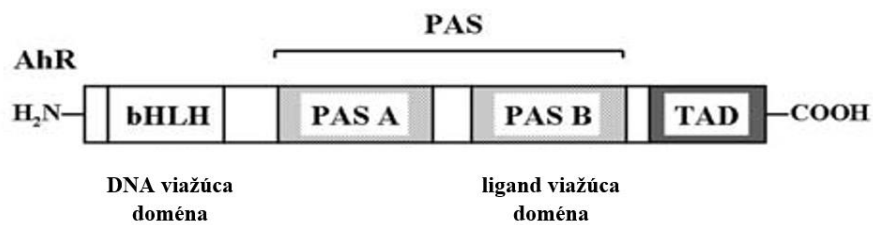
Ľudský AhR pozostáva z niekoľkých odlišných domén, z ktorých má každá svoju individuálnu funkciu (Obr. č. 1). Skladá sa z 848 aminokyselín a jeho veľkosť je 96 kDa. Patrí do superrodiny „basic helix-loop-helix“ (bHLH) a taktiež do superrodiny proteínov „Period-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Single minded“ (PAS) (Burbach *et al.*, 1992; Ema *et al.*, 1992). Proteíny patriace do týchto superrodín sú zapojené v regulácii veľkej škály fyziologických procesov (Crews, 1998). Samotná štruktúra AhR je vysoko flexibilná a umožňuje rôznorodé interakcie s mnohými ligandami, či regulačnými proteínmi (Burbach *et al.*, 1992).

Transkripčné faktory s motívom bHLH po vzájomnej interakcii s inými členmi rovnakej rodiny vytvárajú homo- a/alebo heterodiméry. To im umožňuje regulovať génovú expresiu cieľových génov v odpovedi na signály z vonkajšieho prostredia (Murre *et al.*, 1989). Členovia bHLH superrodiny sú tvorení dvomi funkčne odlišnými doménami, ktoré pozostávajú z približne 60 aminokyselinových zvyškov. Prvou z domén, nachádzajúcou sa na N konci je „basic region“ (b), ktorá sa viaže na DNA – DNA viažuca doména (DNA binding domain; DBD). Druhou doménou je „helix-loop-helix region“ (HLH). Tá sa nachádza na C konci a sprostredkováva interakciu proteínov, pomocou ktorej sa formujú homo- a heterodimérické štruktúry (Fairman *et al.*, 1993; Jones, 2004).

PAS doména sa nachádza vo viacerých signálnych proteínoch a transkripčných faktoroch. Táto doména sa skladá z dvoch častí PAS A a PAS B a pozostáva z 260 – 310 aminokyselín (Crews, 1998). Terciárna štruktúra PAS domény umožňuje jej väzbu s ligandami, alebo prenos signálov. Taktiež má za úlohu sprostredkovať alebo naopak obmedzovať vzájomné interakcie proteínov,

čím reguluje dimerizačnú schopnosť bHLH domény v AhR. Špecifickosť dimerizácie AhR určuje PAS A doména (Pongratz *et al.*, 1998; Bersten *et al.*, 2013). Naopak, PAS B doména je zodpovedná za naviazanie ligandu – ligand viažuca doména (ligand binding domain; LBD), ale aj interakciu s inými proteínmi a chaperónmi. Jej hlavná úloha spočíva v tom, že dokáže rozoznať environmentálne a metabolické signály v podobe naviazania malých molekúl (Bersten *et al.*, 2013).

Na C konci AhR sa nachádza transaktivačná doména (transcriptional activation domain; TAD), ktorá je zodpovedná za aktiváciu transkripcie cieľových génov (Ramadoss *et al.*, 2005). TAD je zložená z troch subdomén a to subdomény s vysokým obsahom kyslých aminokyselinových zvyškov, subdomény bohatej na glutamín a subdomény s hojným zastúpením prolínu, serínu a treonínu (Ma *et al.*, 1995).



Obrázok č. 1: Štruktúra aryl uhl'ovodíkového receptora (upravené podľa Monostory *et Pascussi*, 2008).

3.1.3 Aktivácia AhR

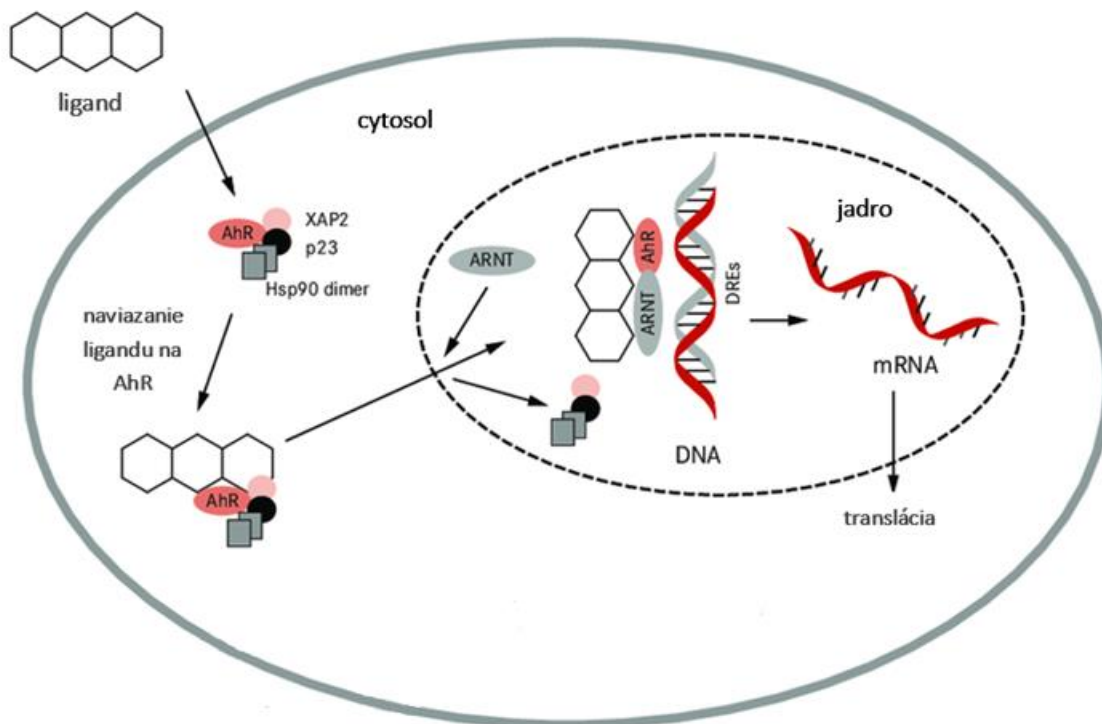
Neaktívny AhR sa nachádza v cytozole, kde interaguje s 2 molekulami heat shock proteínu (Hsp90), AhR-interagujúcim proteínom (XAP2), kochaperónom p23 (kp23) a proteínkinázami Src a vytvára tak proteínový komplex s celkovou veľkosťou približne 280 kDa (Obr. č. 2). Tento komplex je potrebný pre správne zloženie a stabilizáciu AhR (Perdew, 1988; Ikuta *et al.*, 1997; Ma *et Whitlock*, 1997). V neprítomnosti ligandu umožňuje Hsp90 zachovať AhR v neaktívnom stave. Okrem toho potláča väzbu AhR na DNA a napomáha udržiavať konformáciu AhR pri naviazaní ligandu (Pongratz *et al.*, 1992; Soshilov *et Denison*, 2011). Prítomnosť XAP2 stabilizuje väzbu Hsp90 (Bell *et Poland*, 2000).

AhR môže aktivovať niekoľko signálnych dráh. Najlepšie preskúmaná je takzvaná genomická dráha (Obr. č. 2).

Prvým krokom pri aktivácii je väzba ligandu. Pasívnou difúziou sa ligand dostane cez cytoplazmatickú membránu do cytozolu, kde sa následne naviaže na PAS B doménu AhR (Hankinson, 1995). V dôsledku tejto interakcie je komplex ligand/receptor translokovaný do jadra. V jadre dochádza k disociácii Hsp90, rozpadu proteínového komplexu a následnej väzbe AhR Nuclear Translocator (ARNT) a tvorbe aktívneho heterodiméru (Poland *et al.*, 1976; Hankinson, 1995). Vzniknutý komplex AhR/ARNT/ligand rozpoznáva sekvenciu DNA v promótorovej oblasti cieľových génov, na ktorú sa špecificky naviaže. Táto oblasť sa nazýva dioxínový (dioxin responsive element, DRE)/xenobiotický (xenobiotic responsive element, XRE) responzívny element (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2014). Po nasadení aktívneho komplexu AhR/ARNT/ligand dochádza k spusteniu transkripcie cieľových génov (Panteleyev *et Bickers*, 2006).

Jedným z kľúčových cieľových génov, ktoré sú aktivované pomocou AhR je represor AhR (AhRR). AhRR má podobnú štruktúru ako AhR, neobsahuje však PAS B doménu a z toho dôvodu nemôže dôjsť k naviazaniu ligandu (Korkalainen *et al.*, 2004). Taktiež sa líši od AhR a ARNT tým, že jeho C-koncová doména je transrepresorovou doménou, zatiaľ čo pri AhR a ARNT sa jedná o transaktivačnú doménu. AhRR preto funguje ako kompetitívny represor AhR a umožňuje väzbu korepresorov, ktoré sa podieľajú na negatívnej regulácii transkripčnej aktivity AhR. Princíp potlačenia aktivity AhR spočíva v tom, že AhRR vytvára heterodimér s ARNT (komplex AhRR/ARNT) (Mimura *et al.*, 1999).

Nadbytočné AhR je v cytoplazme degradované proteázou. K degradácii AhR dochádza v proteozóme v dôsledku väzby s ubiquitínom. Takáto degradácia AhR iniciovaná naviazaním ubiquitínu je špecifická tým, že kontroluje množstvo ligandom aktivovaného AhR, tak aby bola transkripcia cieľových génov udržiavaná na určitej hladine. Degradácia je špecifická, pretože, aby došlo k ubiquitinácii proteínu, je potrebný špecifický štruktúrny element (degron). Predpokladá sa, že v AhR zastáva úlohu degronu transaktivačná doména (Ma *et Baldwin*, 2000). Na úrovni aktivity AhR sa môžu podieľať aj iné post-translačné modifikácie, ako je napríklad SUMOylácia. Pri tomto type modifikácie dochádza k zvýšeniu stability AhR. To však môže mať za následok potlačenie jeho transkripčnej aktivity (Xing *et al.*, 2012). Post-translačné modifikácie proteínov zohrávajú dôležitú úlohu v mnohých bunkových procesoch. Dôležitou z nich je modifikácia transkripčných faktorov, ktorá má za následok aktiváciu alebo represiu expresie cieľových génov (Wang *et al.*, 2007).



Obrázok č. 2: Aktivácia aryl uhl'ovodíkového receptora (upravené podľa Haedrich *et al.*, 2018).

Medzi nengenomické dráhy aktivované AhR môžeme zaradiť napríklad rýchle zvýšenie koncentrácie vápnika, alebo aktivity Src kinázy po pôsobení TCDD. To sa môže podieľať na aktivácii iných signálnych dráh, ako sú napríklad MAPK, či na zmene funkčných vlastností buniek a ovplyvniť tak ich migráciu, alebo schopnosť adhézie (Tomkiewicz *et al.*, 2012).

3.1.4 Funkcie AhR

AhR má v organizme rozličné úlohy v závislosti na jeho lokalizácii. Jeho funkcie boli študované na rôznych zvieracích ale aj ľudských modeloch.

U človeka je AhR najviac zastúpený v pečeni, pľúcach a placentе, ale aj v tráviacom trakte a srdci. V obličkách a mozgu sa vyskytuje v menšej miere (Dolwick *et al.*, 1993).

Hlavnou funkciou AhR je metabolizmus xenobiotík. Jednou z jeho kľúčových úloh je regulácia expresie enzýmov, ktoré sú zodpovedné za degradáciu (metabolizmus) liekov a iných xenobiotických zlúčenín. Metabolizmus xenobiotík je rozdelený do 3 fáz a pre každú fázu je charakteristická špecifická skupina enzýmov. Medzi enzýmy I. fázy patrí hlavne rodina cytochrómov P450 (CYP). CYP enzýmy sú zodpovedné za katalytické reakcie hlavne oxidácie, redukcie ale aj za detoxifikáciu mnohých liekov (Ramadoss *et al.*, 2005). Polycyklické aromatické

uhl'ovodíky (PAHs) sú metabolizované niekoľkými cytochrómami P450 na elektrofilné deriváty. V rámci I. fázy môžu vzniknúť toxické efekty, ktoré majú za následok mutácie v DNA, čím môžu aktivovať protoonkogény alebo spôsobiť inaktiváciu tumor supresorových génov. CYP1A1 je aktivovaný mnohými ligandami PAHs po naviazaní na AhR. Ligandy pre AhR taktiež aktivujú aj niektoré enzýmy II. fázy, ako sú napríklad UDP-glukuronosyl transferáza a glutation S-transferáza, ktoré dokážu konjugovať elektrofilné deriváty s malými molekulami, čím ich inaktivujú. Taktiež zvyšujú rozpustnosť xenobiotík, čo uľahčuje ich vylúčenie. Zvyšné látky sú enzýmami III. fázy (napr. ABCG2) transportované z organizmu (Hankinson, 1995).

AhR ďalej zohráva podstatnú úlohu v imunitnom systéme. Vysiela podnety lymfocytom, ktoré následne spúšťajú príslušnú reakciu imunitného systému nevyhnutnú na udržanie potrebnej homeostázy (Wang *et al.*, 2015). Napríklad po vystavení organizmu environmentálnym polutantom, ktoré často vedú k infekciám, sa AhR po jeho aktivácii podieľa na zvýšení a regulácii odpovede T-buniek (Boule *et al.*, 2015). Má taktiež podstatnú úlohu pri kontrole diferenciacie, rastu a funkcií mastocytov. Aj najmenšia odchýlka z homeostázy môže viesť k zmenám fungovania mitochondrií, čo môže spôsobiť apoptózu, deficit mastocytov a následnú dysreguláciu v mastocytovovej odpovedi (Zhou *et al.*, 2013).

AhR taktiež koordinuje komplexnú regulačnú sieť zodpovednú za udržiavanie kardiovaskulárnej homeostázy a to už pri samotnom vývine organizmu (Wang *et al.*, 2013).

Svoju úlohu zohráva AhR aj pri imunitnej odpovedi v koži, hlavne pri kožných infekciách a zápaloch. Je zodpovedný za detoxikačné procesy a má dôležitú úlohu pri bunkovej homeostáze. Je dokázané, že po vystavení kože UVB žiareniu je odpoveďou tela aktivácia AhR v keratinocytoch, čo má za následok zvýšenú expresiu CYP1A1 a CYP1B1. Tento proces je ale v úzkom spojení s fotokarcinogénou (Esser *et al.*, 2013). Vďaka tomu, že AhR hrá dôležitú úlohu pri regenerácii kože sa premýšľa o využití netoxických ligandov AhR ako potencionalnej liečby kožných patológií ako je chlorakné, psoriáza a ďalšie (Rico-Leo *et al.*, 2021).

Gastrointestrálny trakt je denne vystavovaný mnohým xenobiotikám prijatým do organizmu v potrave, ale aj produktom metabolizmu mikroorganizmov prítomných v črevnom prostredí. AhR sa podieľa práve na udržaní homeostázy čreva a taktiež je súčasťou procesu regenerácie črevných epitelových buniek (IECs). Bolo pozorované, že deficit AhR súvisí so zníženým počtom TCR $\gamma\delta$ buniek v tenkom čreve, čo má za následok zníženú obnovu črevného epitelu, čo vedie k zvýšenej bakteriálnej záťaži (Li *et al.*, 2011). AhR pomáha bojovať proti rôznym chorobám súvisiacim zo

zažívacím traktom ako je napríklad Kronova choroba, pri ktorej je v postihnutom tkanive znížená expresia AhR. Práve preto sa na liečbu rozšírilo používanie látok, ktoré aktivujú AhR a tým regulujú imunitnú odpoveď organizmu. Aktiváciou AhR dokážu AhR ligandy v črevnom prostredí regulovať zápalové procesy a poškodenie črevného epitelu (Pinto *et al.*, 2023).

3.2 Ligandy AhR

Ligandy sú malé molekuly, ktoré sú schopné viazať sa na receptory a následne ich aktivovať. AhR ligandy boli klasifikované do niekoľkých rôznych kategórií na základe podobností v ich štruktúre, toxicite, pôvode (prirodzene sa vyskytujúce a syntetické). Taktiež na ich interakcii s AhR, rýchlosti ich metabolizmu, stálosti a afinite (Poland *et al.*, 1976; Poland *et al.* Knutson, 1982). Podľa biologickej odpovede vyvolanej AhR sa delia na agonisty a antagonisty. Agonista je ligand, ktorý aktivuje receptor a tým vyvoláva biologickú odpoveď. Naopak antagonist je ligand, ktorý blokuje väzbu agonistu a preto žiadnu biologickú odpoveď nevyvoláva.

3.2.1 Vybrané endogénne ligandy

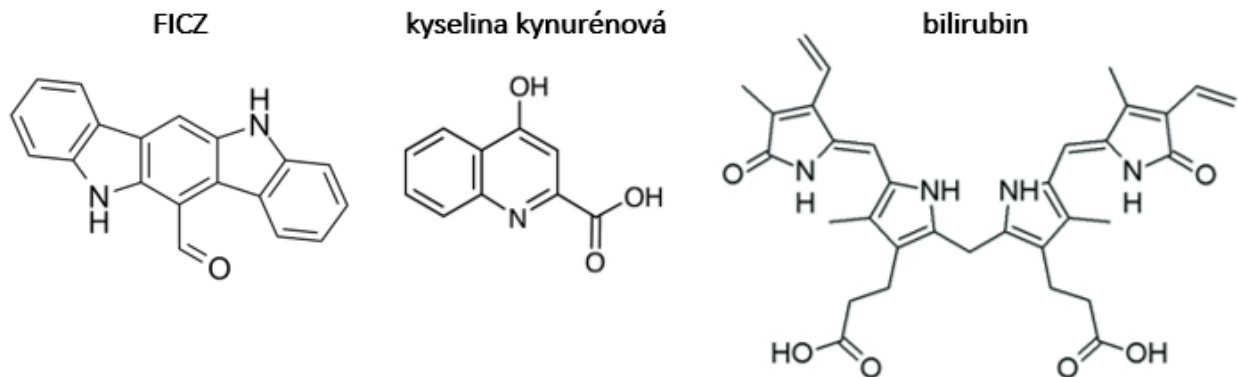
Endogénne ligandy sú prirodzene sa vyskytujúce malé molekuly (Obr. č. 3). Až na niektoré výnimky, sa vyznačujú nižšou schopnosťou vyvolať intenzívnu fyziologickú odpoveď (Schupp *et al.* Lazar, 2010).

6-Formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) je dôležitým fotoproduktom metabolizmu tryptofánu (TRP) po jeho vystavení UV svetlu. Dôkaz o tom, že sa vytvára v ľudskom tele po vystavení slnku je tvorba CYP enzýmov (napr. CYP1A1), ako dôsledok aktivácie AhR (Bergander *et al.*, 2004). FICZ bol prvýkrát vyizolovaný ako ligand pre AhR s vysokou afinitou. Výskumy dokazujú, že FICZ sa vyznačuje dokonca silnejšiu väzbu s AhR ako TCDD. Po aktivácii AhR je však expresia CYP1A1 indukovaná iba po relatívne kratšiu dobu. To je zapríčinené tým, že FICZ je intenzívne metabolizovaný práve enzýmom CYP1A1, čím jeho účinok rýchlo klesá (Rannug *et al.*, 1995; Wincent *et al.*, 2009). Predpokladá sa, že FICZ aktivovaním AhR a indukciou CYP1A1 spúšťa fyziologické reakcie, ktoré sú odpoveďou na UV svetlo. Tým sa reguluje homeostáza kože a ďalších orgánov. Komplex FICZ/AhR je teda súčasťou obrannej odpovedi organizmu na UV poškodenie (Ma, 2011).

Bilirubín (BIL) je dôležitým metabolitom hemu. Až 80 % bilirubínu je získavaných rozpadom hemoglobínu v starnúcich červených krvinkách a predčasne rozpadajúcich sa erytroidných

bunkách v kostnej dreni. Zvyšok pochádza z premeny rôznych proteínov obsahujúcich hem, ktoré sa nachádzajú predovšetkým v pečeni a svaloch. Má antioxidantné, protizápalové a vazodilatačné účinky (Gupta *et al.*, 2016; Ngashangva *et al.*, 2019). Je to potencionálne toxická látka. Telo si ale vyvinulo mechanizmus, pomocou ktorého dokáže bilirubín detoxikovať a transportovať z organizmu. Je nepravdepodobné, že za normálnych fyziologických podmienok by bilirubín vyvolal intenzívnu AhR-dependentnú expresiu špecifických génov. Avšak, hladina bilirubínu pri niektorých patologických stavoch, ako napríklad pri žltacke, stúpa a koncentrácia môže byť zvýšená dostatočne na to, aby aktivoval AhR v pečeni. Táto aktivácia vedie ku zvýšeniu metabolizmu bilirubínu, čo môže viesť až k jeho úplnej eliminácii z tela (Phelan *et al.*, 1998; Togawa *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2019). Bilirubín vznikajúci enzymatickou degradáciou aktivuje génovú expresiu CYP1A1 a iných génov regulovaných AhR (Sinal *et Bend*, 1997). Bilirubín tak prostredníctvom AhR indukuje aj expresiu UGT1A1 génu. Táto expresia je kľúčová hlavne pri narodení. U embrií chýba enzým UGT, preto sa predpokladá, že načasovanie zvýšenej produkcie bilirubínu a následnej expresie UGT hneď po pôrode, je mechanizmom na prevenciu/odstránenie novorodeneckej žltacky (Togawa *et al.*, 2008). Uvažuje sa aj o využití bilirubínu pri liečbe ochorenia koronárnych artérií (CAD) (Schwertner *et al.*, 1994).

Kyselina kynurénová (kynurenin acid; KYNA) je derivátom tryptofánu. Slúži ako účinný ligand ľudského AhR. K aktivácii AhR prostredníctvom KYNA dochádza prevažne v tkanivách výstelky hrubého čreva, ale aj v dendritických bunkách. Zvýšená aktivácia AhR pomocou KYNA je často pozorovaná u pacientov s ochorením obličiek. Kyselina kynurénová bola identifikovaná ako primárny metabolit, ktorý dokáže selektívne aktivovať AhR v imunitnom systéme. Je taktiež dokázané, že táto látka je schopná spustiť génovú expresiu CYP1A1 a CYP1A2. Na indukciu expresie týchto génov je však potrebná vysoká koncentrácia kyseliny kynurénovej, čo má v zápätí za následok rýchly metabolizmus tejto látky. V spojení s aktiváciou AhR má KYNA taktiež významnú úlohu v produkcii IL6 v rámci imunitnej odpovede organizmu pri nádorových ochoreniach (DiNatale *et al.*, 2010).



Obrázok č. 3: Chemická štruktúra vybraných endogénnych ligandov (upravené podľa Dvořák *et al.*, 2021).

3.2.2 Vybrané enviromentálne polutanty

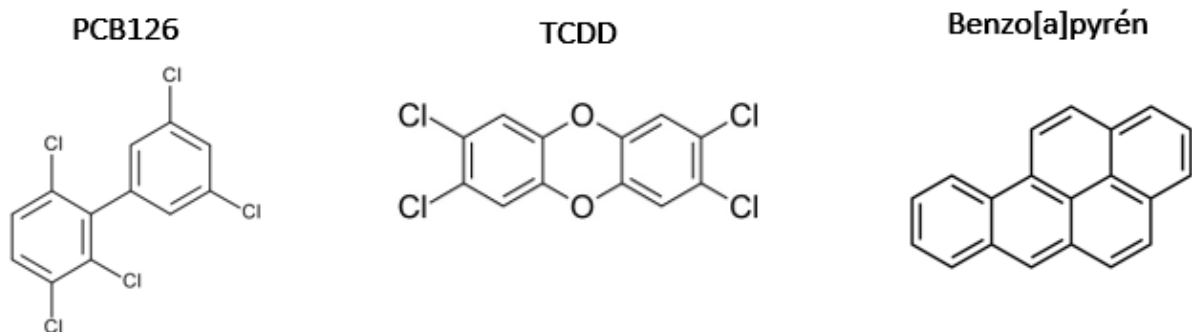
Enviromentálne polutanty sú zlúčeniny, ktoré sa nachádzajú v životnom prostredí ako dôsledok ľudskej činnosti a majú rôzne negatívne účinky na organizmus (Obr. č. 4). Na niektoré si vie telo vytvoriť toleranciu. Do tela sa dostávajú rôznymi cestami, či už priamym kontaktom s kožou, vdýchnutím, alebo potravou a môžu vyvolať celú škálu imunitných odpovedí organizmu (Fairbrother *et Hope*, 2005).

Benzo[a]pyrén (BaP) je cyklický aromatický uhl'ovodík, ktorý sa skladá z piatich benzénových jadier. Je veľmi rozšírený v zadymenom prostredí ako je grilovanie jedla, výfukové plyny z auta, či cigaretový dym. Vystavovanie sa benzo[a]pyrénu má za následok zníženie počtu leukocytov a taktiež zhoršenie fungovania mitochondrií, čo môže viesť až k chronickým ochoreniam (Wong *et al.*, 2017). BaP je rozpustný v tukoch, preto sa zvyčajne nachádza v tukových tkanivách, ale môžeme ho nájsť taktiež v pečňovom tkanive (Eskenazi *et al.*, 2018). Po naviazaní sa na AhR ako ligand, hrá dôležitú úlohu v metabolizme tukov (Bolsoni-Lopes *et Alonso-Vale*, 2015). Benzo[a]pyrén zvyšuje apoptózovú aktivitu buniek v pľúcach. Je to pravdepodobne fyziologická reakcia spôsobujúca odstránenie abnormálnych buniek s poškodenou DNA, ako dôsledok pôsobenia práve BaP (Revel *et al.*, 2003).

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) je vysoko toxická látka označovaná aj ako dioxín. Vzniká ako vedľajší produkt pri priemyselnej výrobe, čím sa dostáva do prostredia. TCDD je karcinogénna látka, ktorá poškodzuje imunitný systém. Pri kontakte s touto látkou sa u ľudí objavuje chlorakné. Je známym modelovým ligandom s vysokou afinitou k AhR. Tento receptor

bol vďaka výskumu účinkov TCDD aj objavený (Poland *et al.*, 1976; Panteleyev *et Bickers*, 2006). Je to perzistentná látka, takže si svoje vlastnosti zachováva po dlhú dobu (Young, 2014).

3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB126) je syntetická zlúčenina chlórovaného uhl'ovodíku. Látky zo skupiny PCB boli komerčne vyrábané od roku 1920 až do roku 1977. Boli používané pri výrobe kopírovacieho papiera alebo ako zmäkčovadlá do farieb. Takýmto priemyselným používaním sa dostali do životného prostredia, kde kontaminovali potravinové reťazce. Najviac zasiahnutou skupinou boli ryby (Kimbrough, 1995). Vystavovanie sa PCB zlúčeninám vyvoláva množstvo nepriaznivých vývojových, imunologických, metabolických, reprodukčných a neurologických účinkov v závislosti od dávky a dĺžky expozície (WHO, 2003). Toxický efekt PCB126 je vyvolávaný predovšetkým cez aktiváciu AhR. Predpokladaný mechanizmus toxicity vyvolanej PCB látkami je kombináciou vysokej špecificity väzby s AhR a perzistentnej aktivácie AhR, kvôli málo efektívnemu metabolizmu PCB prostredníctvom CYP, čo vedie k celej rade maladaptívnych reakcií (Zhang *et al.*, 2012).



Obrázok č. 4: Chemická štruktúra vybraných enviromentálnych polutantov (upravené podľa Hoffman *et al.*, 2019).

3.2.3 Vybrané látky prírodného pôvodu

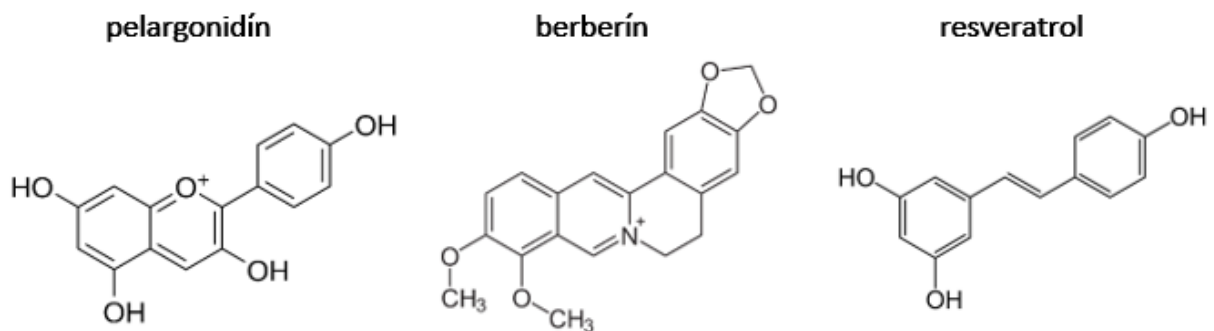
Ligandy prírodného pôvodu sa do organizmu dostávajú prevažne prostredníctvom konzumácie potravín v ktorých sa vyskytujú (Obr. č. 5).

Pelargonidín (PEL) je flavonoid nachádzajúci sa hlavne v červenom a oranžovom bobuľovitom zrelom ovocí ako sú maliny, jahody, čučoriedky, černice a brusnice. Nachádza sa ale aj v slivkách a grapefruitoch. Je to agonista, slabý ligand AhR, ktorý aktivuje génovú expresiu CYP1A1 (Kameničková *et al.*, 2013). V organizme účinkuje v niekoľkých biologických

funkciách. Hrá výraznú úlohu hlavne pre jeho antioxidačné účinky. Bolo potvrdené, že pelargonidín v spolupráci s AhR pôsobí v črevách protizápalovo. Regulačné účinky pelargonidínu na črevný enzým ACE2 boli taktiež potvrdené pri znižovaní zápalu pri infekcii SARS-CoV-2. Zvýšené hodnoty ACE2 sú spojované so zvýšeným rizikom zápalu v hrubom čreve spôsobeným vírusom SARS-CoV-2. Pelargonidín znižuje interakciu spike proteínu SARS-CoV-2 s ACE2, čím ovplyvňuje vychytávanie a následnú replikáciu tohto vírusu (Biagioli *et al.*, 2021).

Berberín (BER) je alkaloid isochinolínu nachádzajúci sa v stonkách a koreňoch rastlín rodu berberis. Berberín aktivuje génovú expresiu CYP1A1 (Lo *et al.*, 2017). Tým, že aktivuje AhR podporuje bariérnu funkciu čriev a má protizápalové účinky (Jing *et al.*, 2020). Bolo taktiež preukázané, že sa podieľa na zvyšovaní hladiny inzulínu, čím napomáha pri cukrovke 2. typu (Ye *et al.*, 2021). Dokonca znemožňuje rast a reprodukciu niektorých baktérií, čo dokazuje jeho antibakteriálne účinky (Peng *et al.*, 2015).

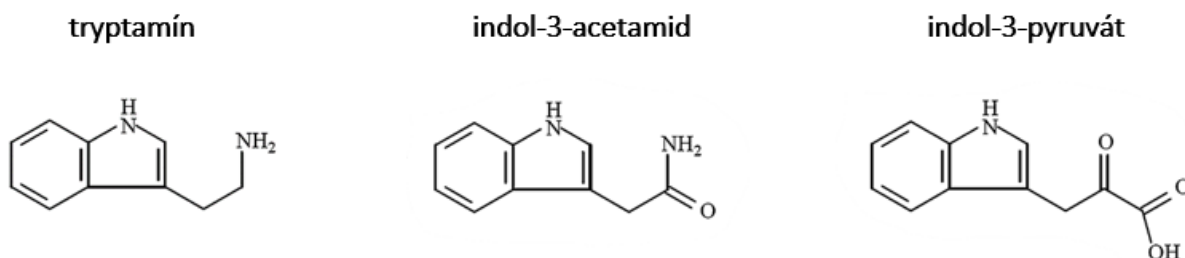
Resveratrol (RES) je bioflavonoid, ktorý sa nachádza v hroznových šupkách, bobuľovitom ovocí, grapefruitoch a arašidoch. Bol klasifikovaný aj ako fytoestrogén, pretože sa dokáže viazať s estrogénovými receptormi. Resveratrol má protizápalové a protikarcinogénne účinky. Taktiež funguje ako liečivo, ktoré zastavuje zhukovanie krvných buniek a tvorbu krvných zrazenín (Gehm *et al.*, 1997; Jang *et al.*, 1997). Bolo dokázané, že resveratrol dokáže zamedziť aktivácii génovej expresie CYP1A1 spôsobenej benzo[a]pyrénom, čím odvracia apoptózu buniek v pľúcach (Revel *et al.*, 2003). Resveratrol taktiež aktivuje AhR, tým potláča zápalové reakcie kože vyvolané polutantami nachádzajúcimi sa vo vzduchu. Predpokladá sa, že taktiež spĺňa dôležitú úlohu v prevencii starnutia pokožky a minimalizovania kožných problémov spôsobovaných znečisteným ovzduším (Shin *et al.*, 2020).



Obrázok č. 5: Chemická štruktúra vybraných látok prírodného pôvodu (upravené podľa Lin *et al.*, 2002).

3.2.4 Vybrané metabolity črevnej mikrobioty

Črevná mikrobiota je tvorená množstvom mikroorganizmov, ktoré hrajú dôležitú úlohu v rôznych metabolických procesoch. Ovplyvňujú taktiež hladinu inzulínu, čo má pozitívny vplyv u ľudí trpiacich cukrovkou a rovnako bola dokázaná aj ich úloha pri kardiovaskulárnych ochoreniach (Tremaroli *et* Bäckhed, 2012). Tryptofán (TRP) je esenciálna aminokyselina, ktorá je do tela prijímaná hlavne potravou. Zúčastňuje sa mnohých fyziologických a patologických procesov v tele, ako je regulácia rastu, metabolizmus a taktiež imunologické odpovede. Tryptofán je ligandom AhR a bolo dokázané, že aktivuje transkripciu niektorých génov ako je napríklad CYP1A1. Pomocou niekoľkých metabolických dráh sa TRP mení na množstvo ďalších medziproduktov, ktoré sú veľmi často ligandmi AhR, líšia sa však rôznou afinitou. Patria k nim napríklad tryptamín (TA), indol-3-pyruvát (IPY) a indol-3-acetamid (IAD) (Obr. č. 6). Všetky fungujú ako ligandy AhR a taktiež aktivujú génovú expresiu CYP1A1 (Heath-Pagliuso *et al.*, 1988). V črevnom mikrobióme sa nachádzajú niektoré druhy baktérií (*Escheria coli*, *Proteus Penneri* a i.), ktoré dokážu využiť tryptofán ako zdroj dusíku a metabolizovať ho na indol. Indol je špecifický typ signálnej molekuly, ktorá má protizápalové účinky a rovnako napomáha udržať črevnú homeostázu (Pinero-Fernander *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2020).



Obrázok č. 6: Chemická štruktúra vybraných metabolitov črevnej mikrobioty (upravené podľa Cassán *et al.*, 2013).

3.3 Bunková línia AZ-AhR (Hep-G2)

Ako *in vitro* modely sa pri výskume veľmi často využívajú bunkové systémy odvodené od rakovinových bunkových línií, kvôli ich dostupnosti, podobnosti s primárnym tkanivom, jednoduchému používaniu a nízkej cene. Takéto bunky dokážu poskytnúť neobmedzenú zásobu materiálu bez etických problémov spojených s používaním ľudských alebo zvieracích tkanív (Kaur *et* Dufour, 2012).

Pečeň má vysokú regeneračnú schopnosť a plní radu potrebných funkcií a kľúčových procesov v tele. Patrí medzi ne ukladanie a dopĺňanie energetických zásob organizmu vo forme glykogénu, metabolizmus živín, prijímanie produktov metabolizmu vo forme glukózy, aminokyselín, tukov a glycerolu. Zohráva nenahraditeľnú úlohu pri neutralizovaní a odstraňovaní toxických látok a metabolických produktov z tela (Wiśniewski *et al.*, 2016; Trefs *et al.*, 2017; Michalopoulos *et Bhusnan*, 2020).

V súčasnosti existuje približne 40 bunkových línií odvodených z rôznych druhov karcinómov pečene (Nikolic *et al.*, 2018). Jednou z najpoužívanejších pečeneňových bunkových línií je HepG2, kvôli možnosti jej širokého uplatnenia vo výskume. Bola izolovaná v roku 1975 z 15 ročného pacienta a pôvodne bola charakterizovaná ako hepatocelulárny karcinóm (HCC) (Aden *et al.*, 1979). Toto tvrdenie však bolo neskôr vyvrátené a bunky boli následne identifikované ako hepatoblastóm (HB) (López-Terrada *et al.*, 2009).

Transfekciou bunkovej línie HepG2 luciferázovým reportérovým plazmidom, ktorý je rezponzívny voči AhR, bola vytvorená stabilná reportérová bunková línia na stanovenie transkripčnej aktivity AhR, AZ-AhR (Novotná *et al.*, 2011). Po vystavení buniek AZ-AhR ligandom AhR dochádza k aktivácii expresie génu pre luciferázu a tým k nárastu luciferázovej aktivity. Indukcia luciferázovej aktivity je závislá na čase pôsobenia a koncentrácii ligandu a koreluje s transkripčnou aktivitou AhR. Bunková línia AZ-AhR je, okrem iného, vhodná aj na testovanie liečiv ako potencionálnych ligandov AhR. Vytvorenie takejto bunkovej línie je relatívne náročný proces, ktorý ale v konečnom dôsledku šetrí čas a taktiež finančné prostriedky, pretože pri ďalších experimentoch už nie je potrebné podstupovať opätovnú transfekciu buniek.

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologická materiál

- adherentná bunková línia AZ-AhR, odvodená z ľudského karcinómu pečene, pripravená transfekovaním bukovej línie HepG2 luciferázovým reportérovým plazmidom pGL-4.27-DRE (Novotná *et al.*, 2011)

4.2 Použité chemikálie a roztoky

- kultivačné médium Dubelcco's Modified Eagle's Medium
 - high glucose (DMEM) (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Gibco, kat. č. 11140-035), 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540) a 50 ml fetálneho bovinného séra (FBS; Fetal Bovine Serum)
- Fosfátový pufo (PBS, Gibco, kat. č. 10010031)
- dimetylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, kat. č. D8418)
- 0,25% trypsín-EDTA (Sigma-Aldrich, kat. č. T4049)
- 0,04% roztok trypanovej modrej v H₂O (Sigma-Aldrich, kat. č. T6146)
- oktylfenol etoxylát (Triton X-100, Serva, kat. č. 37240)
- metyltetrazóliová soľ (MTT, Sigma-Aldrich, kat. č. M2128)
- 5 × lyzačný pufo (Promega, kat. č. E3971)
- substrát pre luciferázu
 - 5 mg D-luciferín (Sigma-Aldrich, kat. č. L9504), 9,6 mg adenzín-5'-trifosfát (ATP, Sigma-Aldrich, kat. č. A6419), 6,83 mg koenzým A (CoA, Sigma-Aldrich, kat. č. C4282), 168 mg dithiotreitol (DTT, SigmaAldrich, kat. č. 43819), 1,32 ml trisacetát-EDTA pufo 1 mol·l⁻¹ (pH 7,8) (Sigma-Aldrich, kat. č. T8280), 1,23 mg kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA, Sigma-Aldrich, kat. č. E6511), 30,3 mg heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich, kat. č. M5921) doplnené do 30 ml destilovanou H₂O
- 2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-p-dioxín (TCDD, Ultra Scientific, kat. č. RPE-029-10MG)
- benzo[a]pyrén (BaP, Sigma-Aldrich, kat. č. B1760)
- PCB126 (PCB, Ehrenstorfer, kat. č. EHERC20012600)
- pelargonidín (PEL, Extrasynthese, kat. č. 0912S)

- berberín (BER, Sigma Aldrich, kat. č. B3251)
- resveratrol (RES, Sigma Aldrich, kat.č. R5010)
- 6- formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ, Sigma Aldrich, kat.č. SML1489)
- kyselina kynurénová (KYNA, Sigma Aldrich, kat.č. K3375)
- bilirubín (BIL, Sigma Aldrich, kat.č. B4126-1G)
- tryptamín (TA, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-206065)
- indol-3-pyruvát (IPY, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-218597)
- indol-3-acetamid (IAD, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-255213)

4.3 Laboratórne pomôcky

- 96 jamková biela doštička na meranie luminiscencie (NUNC)
- 96 jamkové kultivačné doštičky (TPP)
- automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5 μ l, 0,5 – 10 μ l, 2 – 20 μ l, 10 – 100 μ l, 20 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l (Eppendorf)
- buničina (Tork)
- Bürkerova komôrka (Assistant)
- krycia fólia (PARAFILM)
- krycie sklíčka 22 \times 22 mm (Menzel Gläser)
- liehový kahan
- mikroskúmavky v objemoch 0,5 ml a 1,5 ml (BIOplastics)
- multikanálové pipety v rozsahu 0,5 – 10 μ l, 30 – 300 μ l (Eppendorf)
- ochranné rukavice
- pipetor FastPette (Labnet)
- plastové kultivačné fľaše pre adherentné bunky 25 cm², 75 cm², 150 cm² (TPP)
- plastové Petriho misky s priemerom 60 mm a 90 mm (TPP)
- plastové skúmavky v objemoch 15 ml, 50 ml (TPP)
- plastové stojany na skúmavky a mikroskúmavky
- plastové špičky v rozsahu 0,1 – 10 μ l, 10 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l (Eppendorf)
- sérologické pipety v objemoch 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)

4.4 Prístroje

- hlbokomraziaci box V570 s (Sanyo)
- inkubátor (Biotek)
- inverzný mikroskop NIB100 (Novel Optics)
- laminárny box Labculture (ESCO)
- odsávačka FTA-1 (Biosan)
- spektrofotometer Infinite 200 (Tecan)
- vodný kúpeľ LCB11D (Daihan Labtech)
- vortex Reax top (Heildolph)

4.5 Použité metódy

4.5.1 Kultivácia a pasážovanie buniek

Bunky AZ-AhR boli kultivované v plastovej kultivačnej fľaši v kultivačnom médiu DMEM, do ktorého bolo pridané FBS, L-glutamín a neesenciálne aminokyseliny. Kultivácia prebiehala v sterilnom prostredí v inkubátore. Pre optimálny rast mal inkubátor kontrolovaný obsah CO₂ a to 5 %, vlhkosť 95 % a teplotu 37 °C.

Pasážovanie buniek prebiehalo v laminárnom boxe, do ktorého boli bunky prenesené. Pred začiatkom bolo médium a fosfátový pufr (PBS) zahriate na teplotu 37°C. Taktiež bol 0,25% trypsín-EDTA vytiahnutý z mraziaceho boxu aby sa zohrial na izbovú teplotu. Pred vložením do laminárneho boxu bolo všetko vydezinfikované a všetky hrdlá fliaš boli ešte vysterilizované kahanom, aby bolo v boxe zachované sterilné prostredie. Pasáž začínala opatrným odsatím média z kultivačnej fľaše pomocou sérologickej pipety a aspirátora. Po odsatí boli bunky opatrne premyté PBS. Objem PBS sa líšil podľa veľkosti kultivačnej fľaše. Pri strednej fľaši sa používalo na premývanie 8 ml a pri veľkej 13 ml. PBS bolo následne taktiež odsaté rovnakým spôsobom. Na bunky bol potom nanosený 0,25% trypsín-EDTA. Objem bol taktiež prispôsobený veľkosti fľaši a to na strednú fľašu bolo pridaných 1 ml a na veľkú fľašu 2 ml. Trypsín pôsobil v inkubátore 4 minúty. Kultivačná fľaša bola opätovne vložená do laminárneho boxu. Trypsinizácia sa ukončila pridaním kultivačného média. Pri strednej fľaši pridaním 9 ml a pri veľkej fľaši pridaním 18 ml. Následne boli bunky rozsuspendované pomocou pipetora. Z bunkovej suspenzie boli odobraté

3 ml a vrátené do kultivačnej fľaše. Tá bola ešte doplnená 35 ml média. Pasážovanie sa opakovalo každé 3 – 4 dni podľa potreby.

4.5.2 Príprava buniek na experiment

Príprava začínala rovnakým postupom ako pasážovanie buniek. Bunky v kultivačnej fľaši boli prenesené do laminárneho boxu, kde bolo odsaté médium. Ďalej boli prepláchnuté pomocou PBS, ktoré bolo taktiež odsaté. Následne bol pridaný 0,25% trypsín-EDTA a kultivačná fľaša bola premiestená do inkubátora na 4 minúty. Kultivačná fľaša bola znovu premiestená do laminárneho boxu, kde sa do nej pridalo 9 ml/18 ml kultivačného média. Po rozuspendovaní bolo odobratých 10 μ l bunkovej suspenzie do 0,5 ml mikroskúmavky. Mikroskúmavka bola prenesená k mikroskopu mimo laminárny box. Tam do nej bolo pridaných 90 μ l trypanovej modrej a suspenzia sa premiešala. 10 μ l zo suspenzie bolo pomocou pipety prenesených do Bürkerovej komôrky prikrytej krycím sklíčkom. Bürkerova komôrka bola rozdelená na niekoľko zhodných štvorcov, vďaka ktorým sa dali bunky pomocou mikroskopu spočítať. Bolo vybraných 10 štvorcov, z ktorých bola vypočítaná priemerná hodnota a bolo stanovené koľko buniek sa nachádzalo v 1 ml bunkovej suspenzie. Vďaka tejto hodnote sa dopočítalo koľko ml kultivačného média je potrebné pridať do bunkovej suspenzie, aby sa v každej jamke na kultivačnej doštičke nachádzalo 40 000 buniek. Posledným krokom bol prenos 200 μ l vzniknutej bunkovej suspenzie do jednotlivých jamiek kultivačnej doštičky pomocou multikanálovej pipety. Kultivačná doštička bola presunutá do inkubátora do nasledujúceho dňa, aby došlo k stabilizácii buniek.

4.5.3 Príprava a nanášanie látok pri luciferázovej reportérovej línii a teste cytotoxicity

Študované látky boli aplikované na bunky v nasledujúcich koncentráciách. Pre TCDD to boli koncentrácie 50,7 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 152,0 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 456,0 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,4 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 4,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 12,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 37,0 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 111,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 333,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pre BaP a PCB126 to boli koncentrácie 507,0 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 4,6 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 13,7 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 41,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 123,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 370,0 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 3,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, a 10,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pre PEL a BER 15,2 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 45,7 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 137,2 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 411,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 3,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 11,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 33,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 100,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pre RES to boli koncentrácie 507,0 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 4,6 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 13,7 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 41,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 123,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 370,0 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 3,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pre látky TA, IPY a IAD to boli tieto koncentrácie 15,2 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 45,7 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 137,2 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 411,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 3,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$,

11,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 33,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 100,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 200,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre 4 h a tieto koncentrácie 137,2 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 411,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 3,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 11,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 33,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 100,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 200,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre 24 h. Pre BIL to boli koncentrácie 1,4 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 4,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 12,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 37,0 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 111,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 333,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 2,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pre KYNA to boli koncentrácie 45,7 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 137,2 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 411,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 3,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 11,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 33,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 100,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. A pre FICZ to boli koncentrácie 0,7 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 2,1 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 6,3 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 18,8 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 56,3 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 169,0 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 507,0 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 4,6 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 13,7 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 41,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 123,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 370,0 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 3,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, a 10,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre 4 h a koncentrácie 507,0 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 4,6 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 13,7 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 41,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 123,3 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 370,0 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 3,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 20,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre 24 h. Látky potrebné na experiment boli riedené pomocou DMSO na výslednú koncentráciu, ktorá bola 1000-krát vyššia ako koncentrácia použitá pri experimentoch. Pred samotným nanosením boli látky vo všetkých koncentráciách ešte 1000-krát riedené v depletovanom médiu. Toto médium bolo pripravené tak, že v ňom boli kultivované bunky po dobu 48 hodín.

Najprv bola 96-jamková doštička s bunkami prenesená do laminárneho boxu. Tam bolo postupne odsaté médium z jednotlivých jamiek. Jednotlivé koncentrácie daných látok sa nanášali pomocou automatickej pipety v triplikátoch po 200 μl . Každá doštička obsahovala pozitívnu a taktiež negatívnu kontrolu. Pozitívnu kontrolou bol roztok TCDD v DMEM s koncentráciou 10 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD. TCDD bolo vybrané ako pozitívna kontrola preto, lebo je modelovým ligandom AhR a zároveň sa jedná o perzistentnú látku, ktorá si zachováva aktivitu aj po 24 hodinách, kvôli tomu, že nie je tak intenzívne metabolizovaná. Negatívnu kontrolou bolo DMSO (0,1%), taktiež riedené v DMEM. Do doštičiek kde bola testovaná cytotoxicita sa pridával taktiež 2% Triton X-100 zriedený v DMEM. Po napipetovaní všetkých látok bola doštička opäť premiestená do inkubátoru na 4/24 hodín podľa typu experimentu.

4.5.4 Luciferázová reportérová esej

Po inkubácii, ktorá trvala 4 a 24 hodín, bolo médium z kultivačnej doštičky odstránené a doštička bola osušená pomocou buničiny. Jamky, ktoré obsahovali jednotlivé látky boli prepláchnuté 100 μl PBS, ktoré bolo následne odstránené a osušené. Do jednotlivých jamiek bolo pomocou multikanálovej pipety pridaných 20 μl lyzačného pufru 5-krát zriedeného vo vode. 96-jamková kultivačná doštička bola následne prenesená do mraziaceho boxu (-80 °C) na dobu

minimálne jednej hodiny. Po vybratí z mraziaceho boxu bolo nutné nechať doštičku rozmraziť. Po rozmrazení bolo z jednotlivých jamiek odobratých 10 μ l lyzátu. Lyzát bol premiestený do bielej 96-jamkovej doštičky, kam bolo následne pridaných 40 μ l luciferázoveho substrátu. So substrátom sa muselo pracovať rýchlo pretože je termolabilný a citlivý na svetlo. Takže hneď po pridaní bola doštička vložená do spektrofotometru Infinite 200 (Tecan), kde sa merala luminiscencia. Výsledné hodnoty luciferázovej aktivity boli stanovené ako FOLD indukcia vztiahnutá na negatívnu kontrolu a to 0,1% DMSO.

4.5.5 Test cytotoxicity (MTT test)

Po inkubácii, ktorá taktiež trvala 24 hodín, bolo kultivačné médium z doštičky odstránené. Po premytí pomocou PBS a jeho následnom odstránení bola doštička vysušená buničinou. Do jednotlivých jamiek v doštičke bol pridaný 100 μ l MTT, ktorý bol riedený kultivačným médiom na koncentráciu 0,3 mg·ml⁻¹. Doštička bola následne umiestená do inkubátoru na 7 minút. Po uplynutí bol obsah doštičky veľmi jemne odstránený, tak aby nevypadol žiaden vzniknutý kryštál. Kryštály boli následne rozpustené v 100 μ l DMSO. Potom prebehlo meranie na spektrofotometri Infinite 200 (Tecan) pri vlnovej dĺžke 570 nm. Bola stanovená životnosť (viabilita) buniek, ktorá bola vyjadrená v percentách v porovnaní k negatívnej kontrole a to 0,01% DMSO. Negatívna kontrola predstavovala 100% viabilitu.

5 VÝSLEDKY

5.1 Testovanie vplyvu vybraných skupín látok na transkripčnú aktivitu AhR pomocou luciferázovej eseje

Na bunkovej línii AZ-AhR bola zisťovaná indukcia transkripčnej aktivity AhR pomocou luciferázovej reportérovej eseje. Výsledkom experimentov bol nárast luciferázovej aktivity prejavujúci sa zvýšením intenzity luminiscencie, ktorá bola meraná pomocou spektrofotometra. Bunky boli inkubované s vybranými látkami po dobu 4 a 24 hodín. Jednotlivé látky spolu s negatívnou a pozitívnou kontrolou boli aplikované v triplikátoch. Ako negatívna kontrola (UT) bolo použité 0,1% DMSO v DMEM a ako pozitívna kontrola slúžilo $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD v DMEM. Po 4 aj 24 hodinách bola zo zmeraných hodnôt vypočítaná FOLD indukcia luciferázovej aktivity, ktorá sa vzťahovala na negatívnu kontrolu. Po 24 hodinovom pôsobení boli hodnoty FOLD indukcie pre TCDD, v porovnaní so skúmanými látkami príliš vysoké, preto sa v grafoch udávajú len FOLD indukcie testovaných látok. Experimenty pre každú látku prebehli 3-krát a bola z nich vypočítaná priemerná hodnota, ktorá je uvedená v grafoch (Obr. č. 7, 8, 9 a 10).

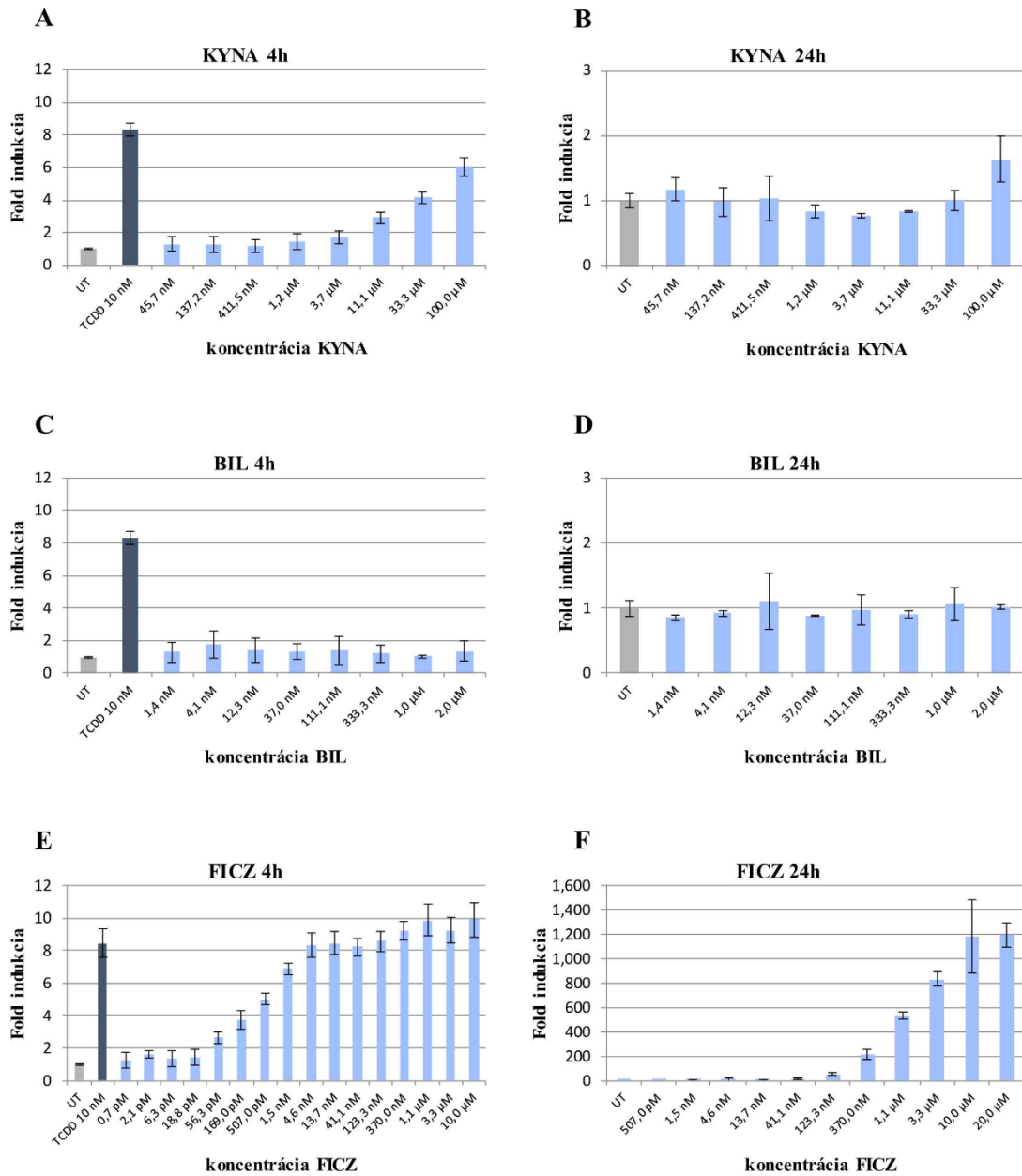
5.1.1 Vplyv vybraných endogénnych ligandov na transkripčnú aktivitu AhR

Kyselina kynurénová (KYNA) mala po 4 hodinovej inkubácii za následok nárast indukcie luciferázovej aktivity, ktorý bol závislý od koncentrácie (Obr. č. 7A). Vyšší nárast indukcie nastal pri koncentrácii $11,1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $2,92 \pm 0,34$ FOLD. Najvyššiu hodnotu dosiahla luciferázová aktivita pri najvyššej koncentrácii $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $6,03 \pm 0,56$ FOLD, čo predstavovalo 68,52 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD. Nárast luciferázovej aktivity u pozitívnej kontroly bol $8,33 \pm 0,42$ FOLD. Po 24 hodinách sa intenzita luciferázovej aktivity takmer vôbec nezvýšila (Obr. č. 7B). Najväčšia indukcia $1,64 \pm 0,35$ FOLD, bola zaznamenaná, pri najvyššej koncentrácii $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Indukcia luciferázovej aktivity pri tejto koncentrácii predstavovala iba 0,04 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorej hodnota dosahovala až $1528,71 \pm 241,26$ FOLD, čo bolo skoro 200 násobne viac ako po 4 hodinách.

Pôsobenie bilirubínu (BIL) po 4 hodinách malo skôr mierne klesajúcu tendenciu (Obr. č. 7C). Najvyššia hodnota luciferázovej aktivity bola zaznamenaná pri koncentrácii $4,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $1,76 \pm 0,81$ FOLD. To zodpovedalo 10,80 % $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, pri ktorom bola stanovená indukcia luciferázovej aktivity $8,33 \pm 0,42$ FOLD. Po 24 hodinách pôsobenia bilirubínu boli

pozorované podobné výsledky (Obr. č. 7D). Všetky hodnoty luciferázovej aktivity sa pohybovali približne na úrovni negatívnej kontroly (1 FOLD). Najvyššia hodnota indukcie bola dosiahnutá pri koncentrácii $12,3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $1,10 \pm 0,43$ FOLD, čo zodpovedalo $0,01 \%$ $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, po pôsobení ktorého bol zaznamenaný nárast luciferázovej aktivity na úroveň $1528,71 \pm 241,26$ FOLD.

Po štvorhodinovom pôsobení FICZ bolo pozorované, že so zvyšujúcou sa koncentráciou dochádzalo k postupnému nárastu indukcie luciferázovej aktivity v závislosti od koncentrácie (Obr. č. 7E). Preukázateľný nárast indukcie bol zaznamenaný už pri koncentrácii $56,3 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pri najvyššej použitej koncentrácii $10,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dosiahla hodnota luciferázovej aktivity $9,88 \pm 1,08$ FOLD. To predstavovalo $119,39 \%$ z luciferázovej aktivity pozitívnej kontroly ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD), ktorá bola $8,44 \pm 0,87$ FOLD. Po 24 hodinách pôsobenia FICZ došlo k výraznejšej indukcii luciferázovej aktivity až pri koncentrácii $370,0 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, kedy dosahovala hodnotu $211,20 \pm 41,50$ FOLD (Obr. č. 7F). Najintenzívnejšia indukcia bola zaznamenaná pri najvyšších koncentráciách $10,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $20,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $1182,02 \pm 298,46$ a $1194,81 \pm 100,84$ FOLD. To zodpovedalo $96,36 \%$ a $98,51 \%$ v porovnaní s pozitívnou kontrolou $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, pri ktorej dosahovala hodnota luciferázovej aktivity $1214,47 \pm 123,33$ FOLD.



UT = negatívna kontrola
 $1 \text{ pM} = 1 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$
 $1 \text{ nM} = 1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$
 $1 \text{ μM} = 1 \text{ μmol} \cdot \text{l}^{-1}$
 FOLD indukcia TCDD pre KYNA a BIL po 24 h = $1528,71 \pm 241,26$
 FOLD indukcia TCDD pre FICZ po 24 h = $1214,47 \pm 123,33$

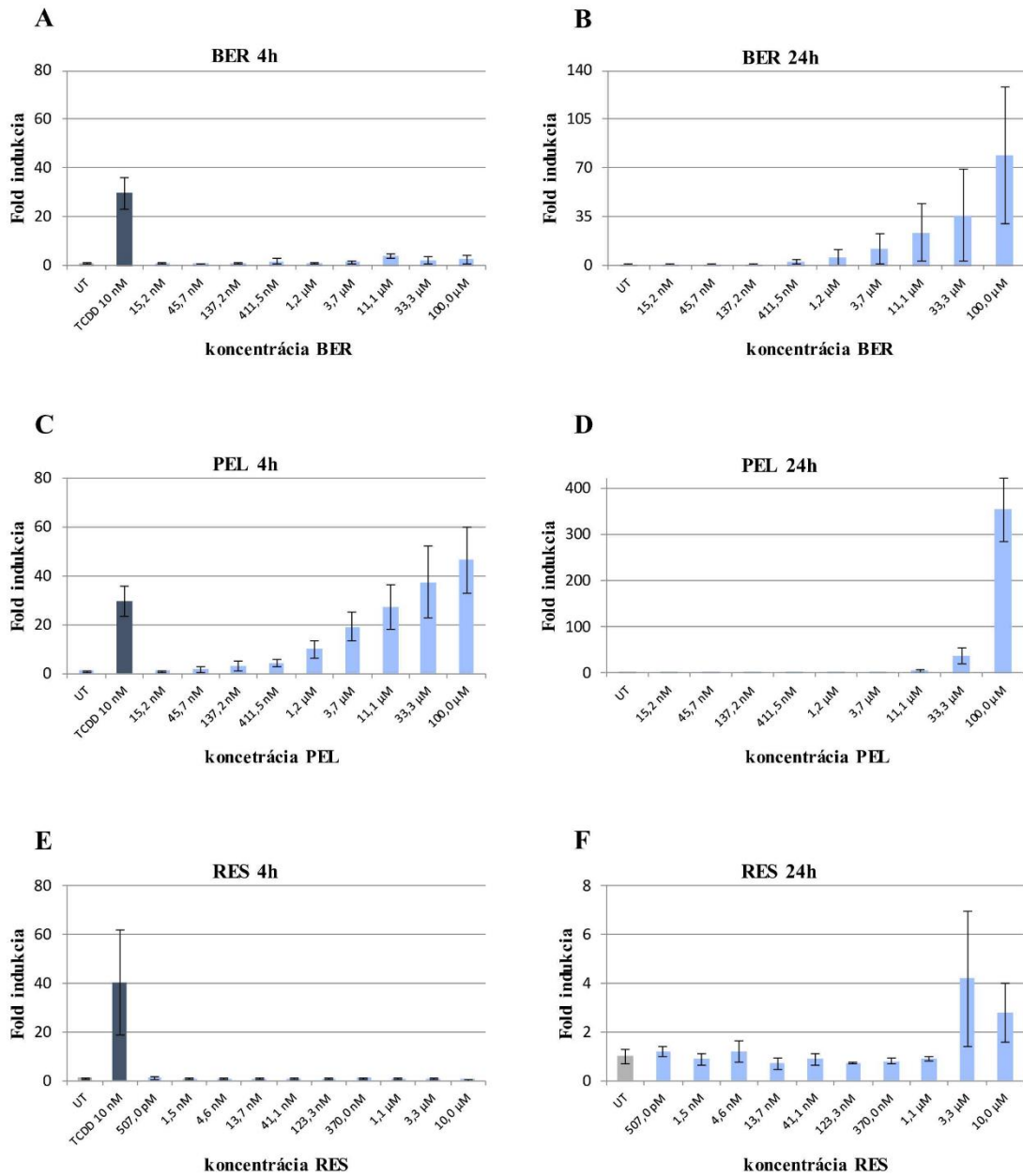
Obrázok č. 7: Indukcia transkripčnej aktivity AHR po 4h a 24h účinku vybraných endogénnych ligandov.

5.1.2 Vplyv vybraných látok prírodného pôvodu na transkripčnú aktivitu AhR

Berberín (BER) po 4 hodinách nevykazoval výraznú indukciu transkripčnej aktivity (Obr. č. 8A). Najvyššia hodnota luciferázovej aktivity bola dosiahnutá pri koncentrácii $11,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $3,96 \pm 0,94$ FOLD, čo predstavovalo 10,93 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorej hodnota predstavovala $29,69 \pm 6,32$ FOLD. Po 24 hodinách bol zaznamenaný vyšší nárast indukcie luciferázovej aktivity pri koncentrácii $1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kedy dosahovala hodnotu $5,76 \pm 5,70$ FOLD (Obr. č. 8B). Najintenzívnejšia indukcia bola zaznamenaná pri najvyššej koncentrácii $100,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $79,22 \pm 48,55$ FOLD. To zodpovedalo 1,23 % v porovnaní s pozitívnou kontrolou $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, pri ktorej bol zaznamenaný nárast luciferázovej aktivity na úroveň $6156,28 \pm 558,90$ FOLD.

Pelargonidín (PEL) mal po 4 hodinovej inkubácii za následok nárast indukcie luciferázovej aktivity, ktorý bol závislý od koncentrácie (Obr. č. 8C). Preukázaný nárast indukcie nastal pri koncentrácii $1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $9,90 \pm 3,35$ FOLD, čo predstavovalo 31,58 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorá bola $29,69 \pm 6,32$ FOLD. Najvyššia hodnota indukcie luciferázovej aktivity $46,49 \pm 13,71$ FOLD bola zaznamenaná pri najvyššej koncentrácii $100,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čo zodpovedalo 157,44 % z luciferázovej aktivity pozitívnej kontroly ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD). Po 24 hodinách bol zaznamenaný intenzívnejší nárast indukcie až pri koncentrácii $33,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $35,85 \pm 17,11$ FOLD (Obr. č. 8D). Najvyššia hodnota $353,92 \pm 68,81$ FOLD bola dosiahnutá pri najvyššej koncentrácii $100,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. To zodpovedalo 5,75 % v porovnaní s pozitívnou kontrolou $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, pri ktorej bol zaznamenaný nárast luciferázovej aktivity na úroveň $6156,28 \pm 558,90$ FOLD.

Resveratrol (RES) po 4 hodinách nijako výrazne neindukoval transkripčnú aktivitu (Obr. č. 8E). Všetky hodnoty luciferázovej aktivity sa pohybovali približne na úrovni negatívnej kontroly (1 FOLD). Pri najnižšej koncentrácii $507,0 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bola zaznamenaná najintenzívnejšia indukcia luciferázovej aktivity $1,14 \pm 0,48$ FOLD. To predstavovalo 0,81 % v porovnaní s luciferázovou aktivitou pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorá bola $40,17 \pm 21,57$ FOLD. Takisto po 24 hodinovom pôsobení resveratrolu nebol zaznamenaný preukázateľný nárast indukcie transkripčnej aktivity (Obr. č. 8F). Maximálna hodnota $4,18 \pm 2,79$ FOLD, bola dosiahnutá pri koncentrácii $3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. To zodpovedalo 0,04 % z $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, po pôsobení ktorého bola zaznamenaná luciferázová aktivita $7430,89 \pm 121,74$ FOLD.



UT = negatívna kontrola
 1 pM = 1 pmol·l⁻¹
 1 nM = 1 nmol·l⁻¹
 1 µM = 1 µmol·l⁻¹
 FOLD indukcia TCDD pre BER a PEL po 24 h = 6156,28 ± 558,90
 FOLD indukcia TCDD pre RES po 24 h = 7430,89 ± 121,74

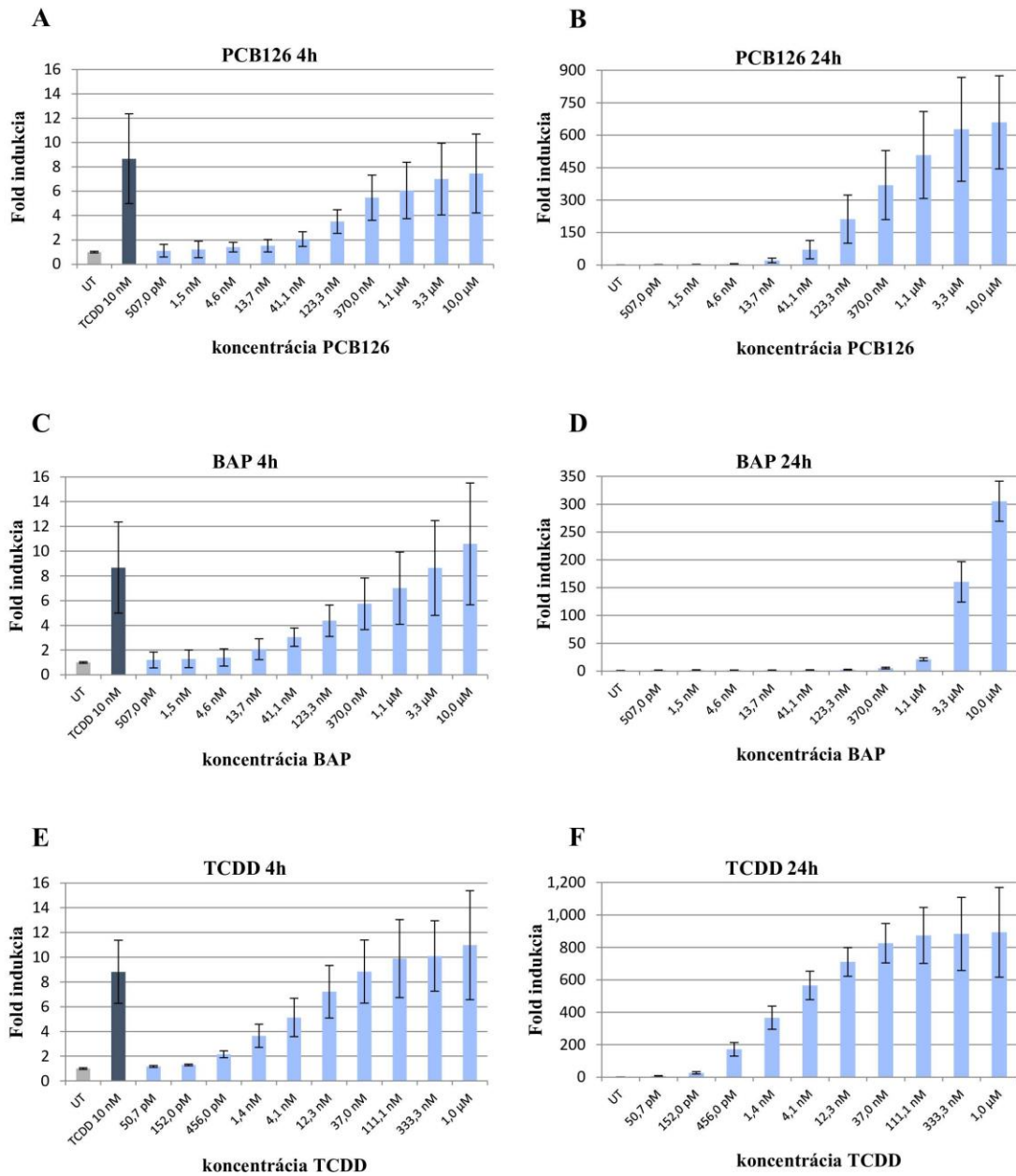
Obrázok č. 8: Indukcia transkripčnej aktivity AhR po 4h a 24h účinku vybraných látok prírodného pôvodu.

5.1.3 Vplyv vybraných environmentálnych polutantov na transkripčnú aktivitu AhR

Po 4 hodinovom pôsobení PCB126 bol zaznamenaný prvý nárast luciferázovej aktivity pri koncentrácii $41,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na hodnotu $2,07 \pm 0,61$ FOLD (Obr. č. 9A). Najvyššia indukcia $7,47 \pm 3,25$ FOLD bola dosiahnutá pri najvyššej koncentrácii $10,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. To zodpovedalo 83,48 % z luciferázovej aktivity pozitívnej kontroly $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorá bola $8,67 \pm 3,69$ FOLD. Po 24 hodinovom pôsobení PCB126 bol pozorovaný rovnaký trend ako po 4 hodinách (Obr. č. 9B). Výraznejší nárast indukcie $71,01 \pm 42,31$ FOLD bol zaznamenaný pri koncentrácii $41,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Maximálna hodnota indukcie $659,52 \pm 215,62$ FOLD bola dosiahnutá pri najvyššej koncentrácii $10,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Indukcia luciferázovej aktivity pri tejto koncentrácii predstavovala 67,73 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorej hodnota dosahovala $988,01 \pm 371,70$ FOLD.

Benzo[a]pyrén (BaP) mal po 4 hodinovej inkubácii za následok nárast indukcie luciferázovej aktivity, ktorý bol závislý od koncentrácie (Obr. č. 9C). K výraznejšej indukcii $2,08 \pm 0,85$ FOLD došlo pri koncentrácii $13,7 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, čo zodpovedalo 15,47 % z hodnoty pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, pri ktorej luciferázová aktivita dosahovala $8,67 \pm 3,69$ FOLD. Najvyššia indukcia bola zaznamenaná pri najvyššej koncentrácii $10,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $10,59 \pm 4,93$ FOLD. To zodpovedalo 123,64 % z luciferázovej aktivity pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD. Pri BaP bol po 24 hodinovej inkubácii zaznamenaný vyšší nárast indukcie pri koncentrácii $370,0 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $5,36 \pm 1,51$ FOLD (Obr. č. 9D). Pri koncentrácii $10,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bola dosiahnutá najvyššia indukcia $305,31 \pm 36,22$ FOLD. Indukcia luciferázovej aktivity pri tejto koncentrácii predstavovala 33,44 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorej hodnota dosahovala $988,01 \pm 371,70$ FOLD.

Po štvorhodinovom pôsobení TCDD bolo pozorované, že so zvyšujúcou sa koncentráciou dochádzalo k postupnému nárastu indukcie luciferázovej aktivity (Obr. č. 9E). Pri najvyššej koncentrácii $1,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bola zaznamenaná najvyššia hodnota indukcie $10,98 \pm 4,40$ FOLD, čo zodpovedalo 125,22 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorá bola $8,82 \pm 2,56$ FOLD. Po 24 hodinovom pôsobení TCDD bol pozorovaný nárast indukcie transkripčnej aktivity, ktorý bol závislý od zvyšujúcej sa koncentrácie (Obr. č. 9F). Najintenzívnejšia indukcia $893,13 \pm 276,85$ FOLD bola dosiahnutá pri najvyššej koncentrácii $1,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čo zodpovedalo 124,59 % v porovnaní s luciferázovou aktivitou kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorej hodnota predstavovala $708,13 \pm 64,43$ FOLD.



UT = negativna kontrola
 1 pM = 1 pmol·l⁻¹
 1 nM = 1 nmol·l⁻¹
 1 μM = 1 μmol·l⁻¹
 FOLD indukcia TCDD pri PCB a BAP po 24 h = 988,01 ± 371,70
 FOLD indukcia TCDD pri TCDD po 24 h = 708,13 ± 64,43

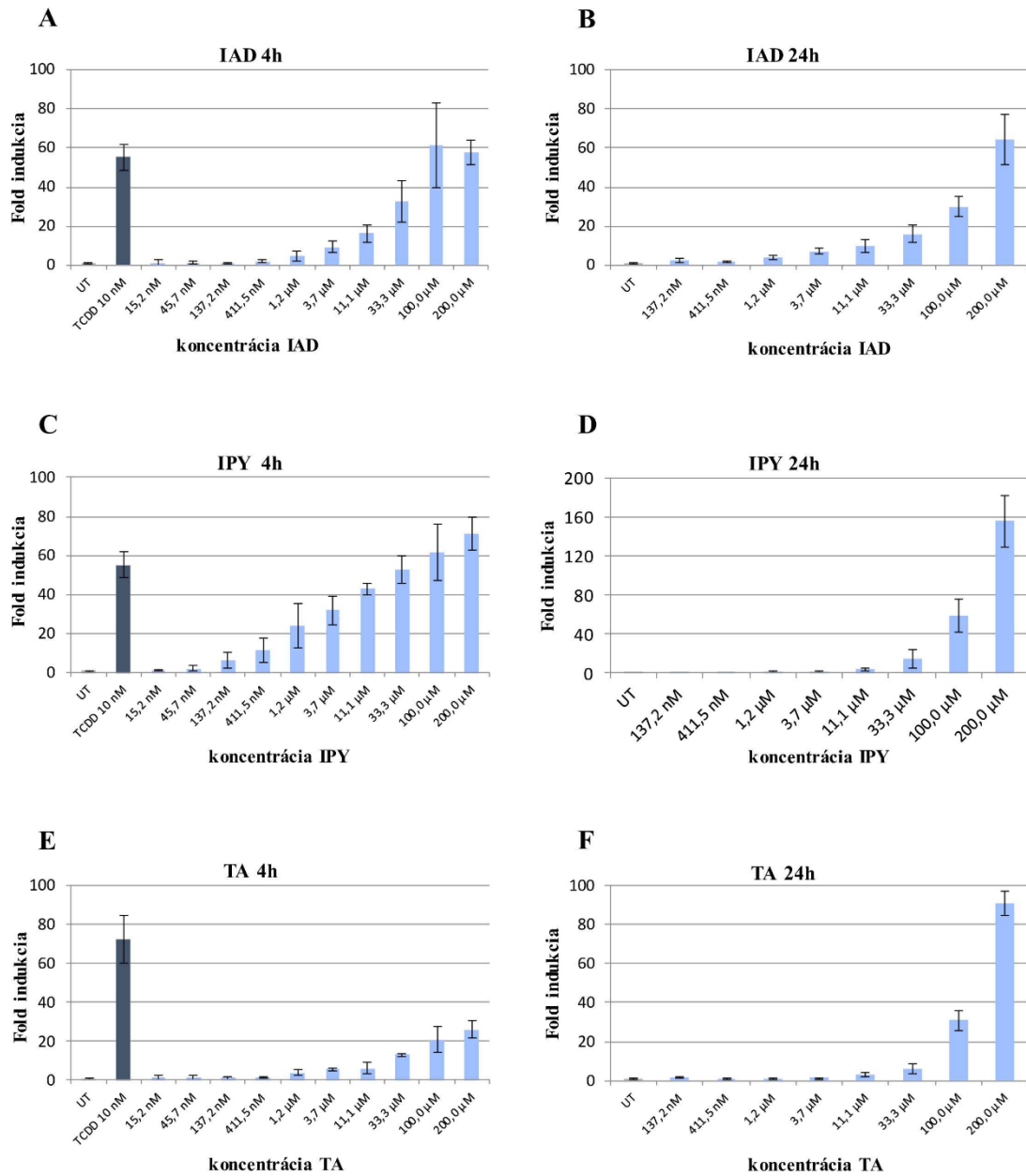
Obrázok č. 9: Indukcia transkripčnej aktivity AhR po 4h a 24h účinku vybraných environmentálnych polutantov.

5.1.4 Vplyv vybraných metabolitov črevnej mikrobioty na transkripčnú aktivitu AhR

Pri indol-3-acetamide (IAD) bolo po 4 hodinovej inkubácii zaznamenané zvýšenie indukcie luciferázovej aktivity pri koncentrácii $1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. č. 10A). Najvyššia hodnota bola dosiahnutá pri koncentrácii $100,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $61,59 \pm 21,51$ FOLD, čo zodpovedalo 112,48% z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD. Nárast luciferázovej aktivity pozitívnej kontroly predstavoval $55,21 \pm 6,67$ FOLD. Po 24 hodinách pôsobenia IAD bol zaznamenaný nárast indukcie luciferázovej aktivity závislý od koncentrácie (Obr. č. 10B). Maximálna indukcia transkripčnej aktivity bola dosiahnutá pri najvyššej koncentrácii $200,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $64,46 \pm 13,19$ FOLD. Táto hodnota zodpovedala 1,16 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, po ktorého pôsobení bol pozorovaný nárast indukcie luciferázovej aktivity na úroveň $5487,47 \pm 6,56$ FOLD.

Indol-3-pyruvát (IPY) mal po 4 hodinovej inkubácii za následok nárast transkripčnej aktivity, ktorý bol závislý od koncentrácie (Obr. č. 10C). Najvyššia hodnota luciferázovej aktivity bola zaznamenaná pri najvyššej koncentrácii $200,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $71,33 \pm 8,56$ FOLD. To zodpovedalo 131,28 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorej hodnota dosahovala $55,21 \pm 6,67$ FOLD. Po 24 hodinovom pôsobení IPY bol zaznamenaný výraznejší nárast pri koncentrácii $11,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a to $3,69 \pm 1,37$ FOLD (Obr. č. 10D). Najvyššia hodnota $155,80 \pm 26,22$ FOLD bola dosiahnutá pri najvyššej koncentrácii $200,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. To predstavovalo 2,82 % z luciferázovej aktivity kontroly ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD), pri ktorej bola zaznamenaná indukcia $5487,47 \pm 6,56$ FOLD.

Nárast luciferázovej aktivity po 4 hodinách pôsobenia tryptamínu (TA) bol zaznamenaný až pri koncentrácii $1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. č. 10E). Maximálna indukcia luciferázovej aktivity, a to $26,06 \pm 4,26$ FOLD, bola dosiahnutá pri najvyššej koncentrácii $200,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. To zodpovedalo 36,23 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, ktorej hodnota luciferázovej aktivity dosahovala $72,28 \pm 12,43$ FOLD. Po 24 hodinách bol pozorovaný nárast indukcie pri koncentrácii $11,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. č. 10F). Najvyššia indukcia luciferázovej aktivity $90,67 \pm 6,24$ FOLD bola dosiahnutá pri najvyššej koncentrácii $200,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. To predstavovalo 2,42 % z pozitívnej kontroly $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, pri ktorom bola stanovená indukcia luciferázovej aktivity na úrovni $3820,20 \pm 820,77$ FOLD.



UT = negatívna kontrola
 1 nM = 1 nmol·l⁻¹
 1 μM = 1 μmol·l⁻¹
 FOLD indukcia TCDD pre IAD a IPY po 24 h = 5487,47 ± 6,56
 FOLD indukcia TCDD pre TA po 24 h = 3820,20 ± 820,77

Obrázok č. 10: Indukcia transkripčnej aktivity AhR po 4h a 24h účinku vybraných metabolitov črevnej mikrobioty.

5.2 Stanovenie vplyvu vybraných látok na viabilitu buniek pomocou metódy MTT

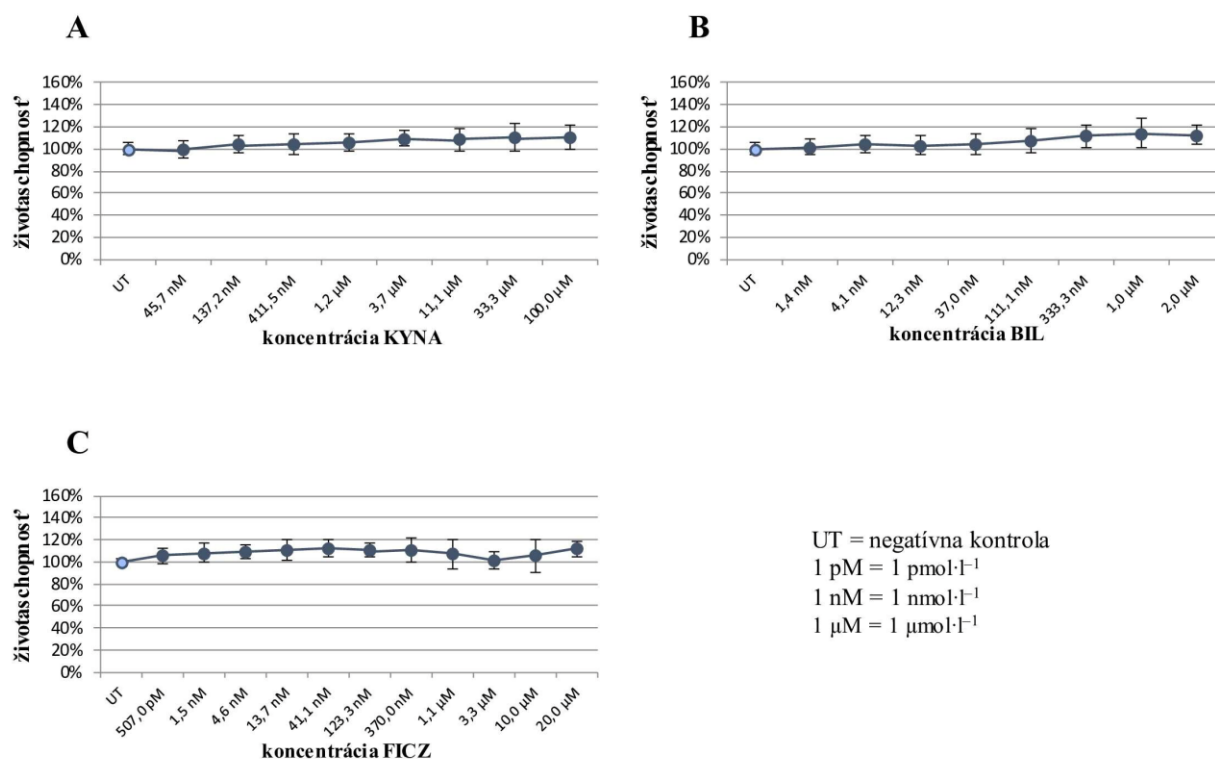
Bunková línia AZ-AhR bola použitá aj na stanovenie životaschopnosti (viability) buniek pomocou MTT testu. Bunky boli spolu s vybranými látkami inkubované počas 24 hodín. Jednotlivé koncentrácie skúmaných látok spolu s kontrolami boli nanášané v triplikátoch. Ako negatívna kontrola slúžilo 0,1% DMSO v DMEM. Výsledkami experimentov boli hodnoty životaschopnosti buniek v percentuálnom vyjadrení vzhľadom k negatívnej kontrole, ktorá predstavovala 100 %. Jednotlivé experimenty pre každú z vybraných látok prebehli 3-krát. Zo získaných údajov bola vypočítaná priemerná hodnota, ktorá je uvedená v grafoch (Obr. č. 11, 12, 13 a 14).

5.2.1 Vplyv vybraných endogénnych ligandov na viabilitu buniek

Po inkubácii buniek s kyselinou kynurénovou (KYNA) nebol zaznamenaný výraznejší vplyv na životaschopnosť buniek (Obr. č. 11A). Pri najnižšej koncentrácii $45,7 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bola viabilita $99,73 \% \pm 7,25 \%$. Pri zvyšných koncentráciách sa životaschopnosť buniek pohybovala v rozmedzí $104,31 \% \pm 7,45 \%$ až $110,80 \% \pm 10,41 \%$.

Po pôsobení bilirubínu (BIL) na bunky bola ich životaschopnosť v rozmedzí $102,06 \% \pm 6,48 \%$ do $114,33 \% \pm 13,19 \%$ (Obr. č.11B). Pri žiadnej z koncentrácií neklesla viabilita buniek pod 100 % čo indikuje, že žiadna zo skúmaných koncentrácií bilirubínu nemala cytotoxický efekt na sledované bunky. Najvyššia hodnota viability $114,33 \% \pm 13,19 \%$ bola zaznamenaná pri koncentrácii $1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Životaschopnosť buniek po pôsobení FICZ sa pohybovala v rozmedzí $101,58 \% \pm 7,78 \%$ až $111,81 \% \pm 7,66 \%$ (Obr. č. 11C). Viabilita buniek mala jemne narastajúcu tendenciu v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie. Pri koncentrácii $3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ však došlo k miernemu poklesu na najnižšiu hodnotu $101,58 \% \pm 7,78 \%$. Pri žiadnej z koncentrácií neklesla hodnota životaschopnosti buniek pod 100 %, čo naznačuje, že FICZ v nami použitých koncentráciách nepôsobil cytotoxicky.



Obrázok č. 11: Vplyv vybraných endogénnych ligandov na životaschopnosť bunkovej línie AZ-AhR.

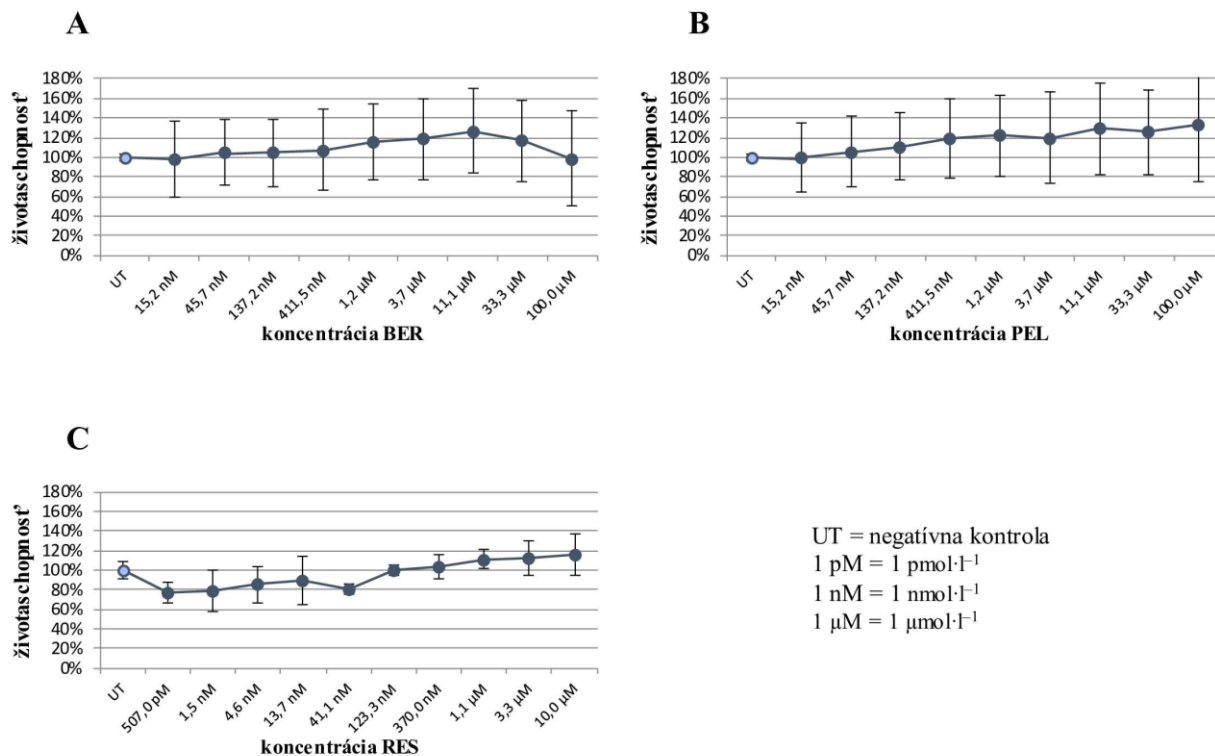
5.2.2 Vplyv vybraných látok prírodného pôvodu na viabilitu buniek

Po pôsobení berberínu (BER) bola životaschopnosť buniek v rozmedzí 104,51 % ± 33,65 % až 126,94 % ± 43,49 % (Obr. č. 12A). Pri 2 koncentráciách klesla viabilita pod 100 %. Pri najvyššej koncentrácii 100,0 μmol·l⁻¹ klesla viabilita na hodnotu 98,62 % ± 48,42 %. Pri najnižšej koncentrácii 15,2 μmol·l⁻¹ bola zaznamenaná najnižšia hodnota 97,53 % ± 38,93 %.

Pelargonidín (PEL) mal mierne proliferačné účinky na sledované bunky (Obr. č.12B). Životaschopnosť sa pohybovala v rozmedzí 99,68 % ± 35,06 % do 133,27 % ± 57,50 %. Najnižšia hodnota 99,68 % ± 35,06 % bola zaznamenaná pri najnižšej koncentrácii 15,2 pmol·l⁻¹. Pri zvyšných koncentráciách mala viabilita rastúcu tendenciu. Maximálna hodnota viability 133,27 % ± 57,50 % bola pozorovaná pri najvyššej koncentrácii 100,0 μmol·l⁻¹.

Po inkubácii buniek s resveratrolom (RES) sa ich životaschopnosť pohybovala v rozmedzí od 77,34 % ± 11,12 % do 115,93 % ± 20,62 % (Obr. č.12C). Resveratrol spôsoboval pri nižších

koncentráciách mierne zníženie životaschopnosti. Najnižšia hodnota $77,34 \% \pm 11,12 \%$ bola zaznamenaná pri najnižšej koncentrácii $507,0 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pri zvyšných koncentráciách mala viabilita buniek stúpajúcu tendenciu, s výnimkou koncentrácie $41,1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kedy došlo k miernemu poklesu na hodnotu $80,02 \% \pm 5,02 \%$.



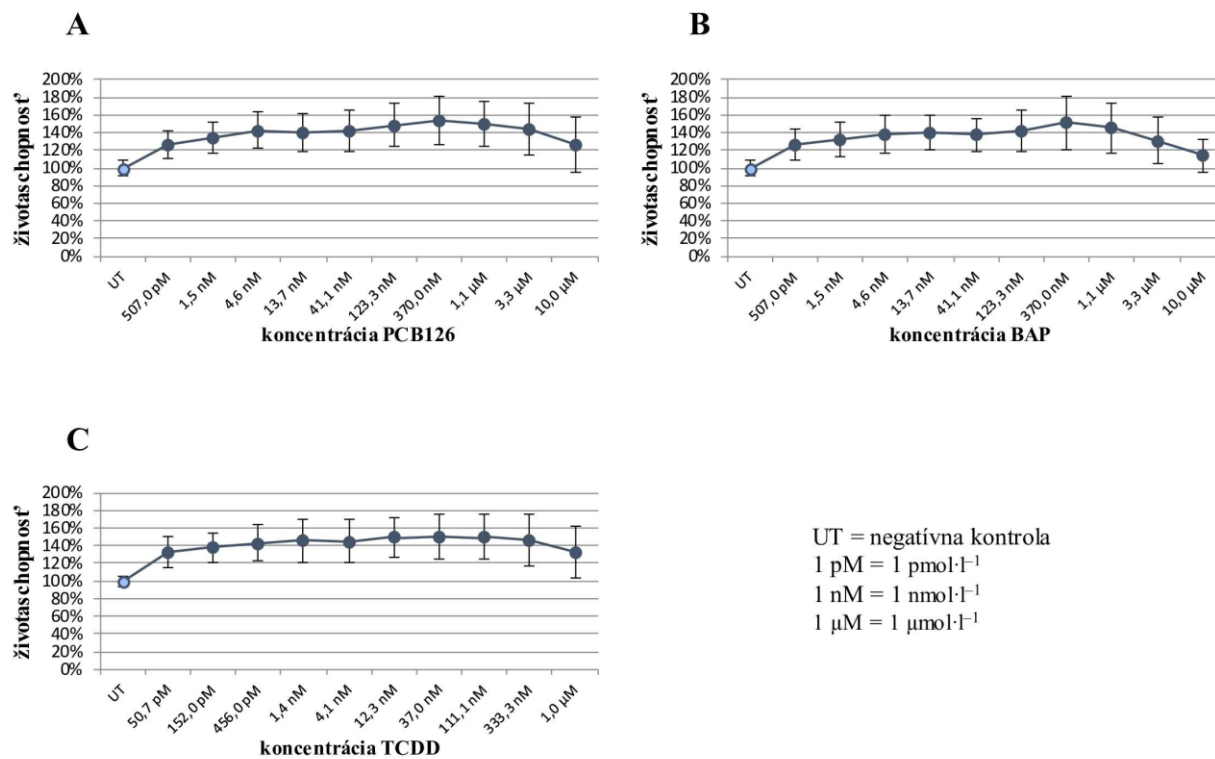
Obrázok č. 12: Vplyv vybraných látok prírodného pôvodu na životaschopnosť bunkovej línie AZ-AhR.

5.2.3 Vplyv vybraných environmentálnych polutantov na viabilitu buniek

Pôsobenie PCB126 malo mierne proliferačné účinky na skúmané bunky. Hodnoty viability sa pohybovali v rozmedzí od $126,63 \% \pm 30,65 \%$ do $153,89 \% \pm 26,94 \%$ (Obr. č. 13A). Najnižšie hodnoty $126,63 \% \pm 30,65 \%$ a $126,81 \% \pm 15,61 \%$ boli zaznamenané pri najvyššej koncentrácii $10,0 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a najnižšej koncentrácii $507,0 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Maximálna životaschopnosť buniek po pôsobení PCB126, $153,89 \% \pm 26,94 \%$, bola zaznamenaná pri koncentrácii $370,0 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Podobne ako v prípade PCB126, po aplikácii benzo[a]pyrénu (BaP) boli zaznamenané mierne proliferačné účinky. Životaschopnosť buniek sa pohybovala v rozmedzí 114,43 % ± 18,56 % až 151,13 % ± 29,78 % (Obr. č. 13B). Viabilita mala narastajúcu tendenciu v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie až do koncentrácie 370,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kedy bola zaznamenaná najvyššia hodnota 151,13 % ± 29,78 %. Následne došlo k poklesu viability sledovaných buniek až na najnižšiu hodnotu 114,43 % ± 18,56 % zaznamenanú pri najvyššej koncentrácii 10,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Rovnako ako pri predchádzajúcich dvoch testovaných látkach, boli po inkubácii buniek s TCDD pozorované mierne proliferačné účinky. Viabilita sa pohybovala v rozmedzí 132,12 % ± 29,30 % až 150,82 % ± 25,59 % (Obr. č. 13C). Najnižšie hodnoty životaschopnosti 132,12 % ± 29,30 % a 132,44 % ± 17,85 % boli zaznamenané pri najnižšej koncentrácii 50,7 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a najvyššej koncentrácii 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. K nárastu viability na maximálnu úroveň 150,82 % ± 25,59 % došlo pri koncentrácii 37,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



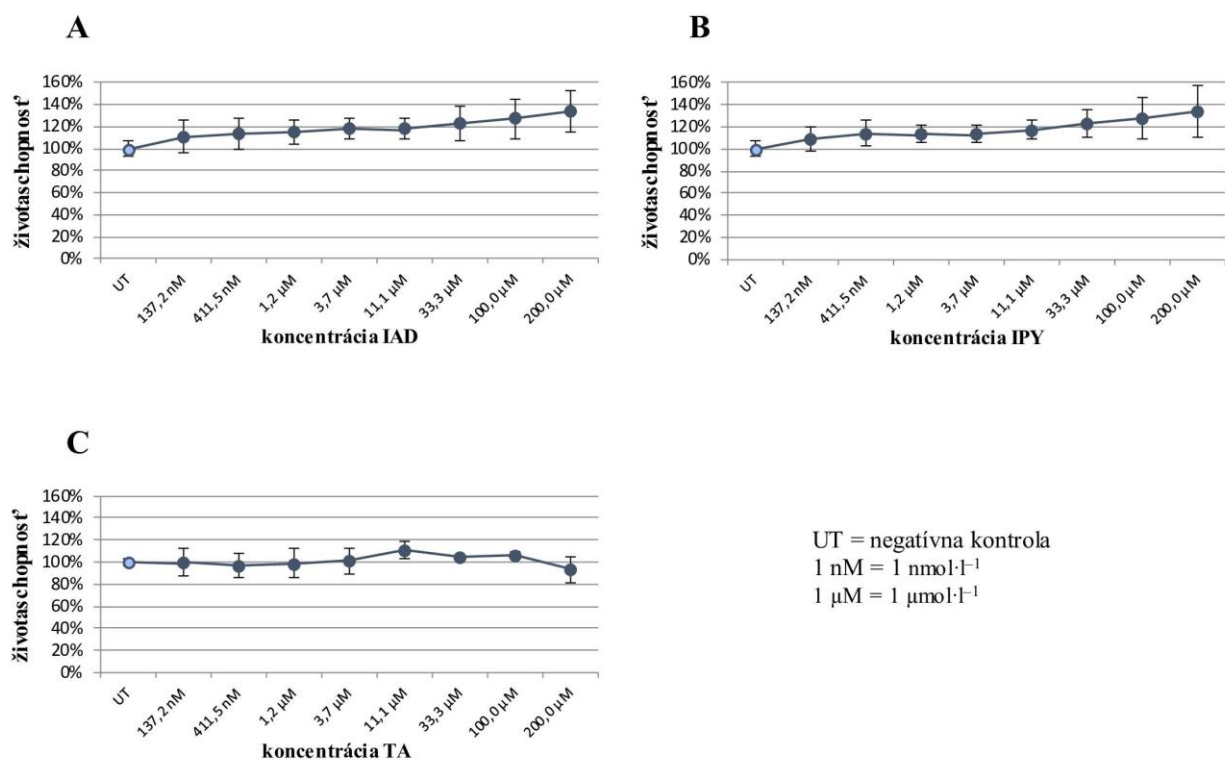
Obrázok č. 13: Vplyv vybraných environmentálnych polutantov na životaschopnosť bunkovej línie AZ-AhR.

5.2.4 Vplyvu vybraných metabolitov črevnej mikrobioty na viabilitu buniek

Životaschopnosť buniek po pôsobení indol-3-acetamidu (IAD) sa pohybovala v rozmedzí od 110,53 % ± 14,86 % do 133,58 % ± 19,21 % (Obr. č. 14A). Viabilita mala mierne narastajúcu tendenciu v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie IAD. Pri koncentrácii 11,1 μmol·l⁻¹ došlo k miernemu poklesu na hodnotu 117,95 % ± 8,84 %. Najnižšia hodnota 110,53 % ± 14,86 % bola zaznamenaná pri najnižšej koncentrácii 137,2 nmol·l⁻¹ a najvyššia hodnota 133,58 % ± 19,21 % pri najvyššej koncentrácii 200,0 μmol·l⁻¹.

Indol-3-pyruvát (IPY) mal na sledované bunky, podobne ako IAD, mierny proliferačný účinok (Obr. č. 14B). Viabilita mala narastajúcu tendenciu v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie a pri žiadnej z testovaných koncentrácií neklesla pod 100 %. Najnižšia hodnota 108,73 % ± 11,16 % bola zaznamenaná pri najnižšej koncentrácii 137,2 nmol·l⁻¹ a najvyššia hodnota 134,24 % ± 23,06 % pri najvyššej koncentrácii 200,0 μmol·l⁻¹.

Po pôsobení tryptamínu (TA) na sledované bunky sa životaschopnosť pohybovala v rozmedzí 93,29 % ± 11,44 % až 111,12 % ± 7,52 % (Obr. č. 14C). Najvyššia hodnota 111,12 % ± 7,52 % bola zaznamenaná pri koncentrácii 11,1 μmol·l⁻¹ a najnižšia hodnota 93,29 % ± 11,44 % pri najvyššej koncentrácii 200,0 μmol·l⁻¹. Nebol zaznamenaný žiadny výraznejší vplyv na viabilitu sledovaných buniek.



Obrázok č. 14: Vplyv vybraných metabolitov črevnej mikrobioty na životaschopnosť bunkovej línie AZ-AhR.

6 DISKUSIA

AhR je súčasťou mnohých funkcií organizmu, ako sú napríklad odbúravanie xenobiôtík, imunitná odpoveď, ontogenetický vývin, ale podieľa sa aj na metabolických procesoch a udržiavaní homeostázy ako dôležitá súčasť signalizačných procesov v gastrointestinálnom trakte. AhR môže byť aktivovaný rozličnými látkami (agonistami). V tejto bakalárskej práci sme sa zamerali na 4 vybrané skupiny látok a štúdium ich vplyvu na transkripčnú aktivitu AhR. Pomocou reportérovej línie AZ-AhR sme sledovali indukciu luciferázovej aktivity po pôsobení vybraných látok. Nárast luciferázovej aktivity sme zisťovali prostredníctvom luciferázovej eseje a na základe týchto meraní sme dokázali stanoviť vplyv testovaných látok na transkripčnú aktivitu AhR.

Prvou zo sledovaných skupín boli endogénne ligandy, kde sme sa ako na prvú zamerali na kyselinu kynurénovú. V štúdiu Michaudel *et al.* (2022) taktiež sledovali vplyv kyseliny kynurénovej na aktivitu AhR na troch rozličných ľudských bunkových líniách HT-29, LS-180 a Jurkat. Použili tri rôzne metodologické prístupy a to imunofluorescenčnú detekciu AhR, qRT-PCR a „radio ligand binding assay”, pomocou ktorých prišli k záveru, že kyselina kynurénová je silným agonistom AhR. Tento záver bol v našej práci na bunkovej línii AZ-AhR potvrdený len čiastočne, pretože k indukcii luciferázovej aktivity došlo iba po 4 hodinách kedy kyselina kynurénová vykazovala 68 % aktivity z pozitívnej kontroly 10 nmol·l⁻¹ TCDD. Ďalšou sledovanou látkou z tejto skupiny bol bilirubín, ktorý bol v predkladanej práci vyhodnotený ako zlúčenina, ktorá nijako výraznejšie neaktivuje AhR. Po 4 aj 24 hodinách bola indukcia luciferázovej aktivity AhR zanedbateľná. S tým sa ale úplne nezhodujú výsledky štúdie Phelan *et al.* (1998), ktorí študovali vplyv bilirubínu na transkripčnú aktivitu AhR pomocou niekoľkých zvieracích aj ľudských modelov. Aktivácia AhR bola sledovaná na dvoch myších bunkových líniách (H1L1.1c2 a Hepa1c1c7), ďalej na morčacej bunkovej línii (GPC16), potkanej bunkovej línii (H4IIE) a ľudskej bunkovej línii (HepG2). Výsledky ich pozorovaní dokázali, že bilirubín zvyšuje transkripčnú aktivitu AhR už aj pri najnižších skúmaných koncentráciách (1-10 μmol·l⁻¹). Rozpor s našimi výsledkami môže byť spôsobený použitím rôznych bunkových línií. Tomu by nasvedčoval aj fakt, že podľa zistení Phelan *et al.* (1998) na ľudskej bunkovej línii HepG2 došlo k indukcii aktivity AhR iba na úroveň 26 % z pozitívnej kontroly TCDD. V našej práci na bunkovej línii AZ-AhR dosahovala aktivita AhR po 4 hodinách pôsobenia bilirubínu 10 % z hodnoty 10 nmol·l⁻¹ TCDD. Poslednou skúmanou látkou v skupine endogénnych ligandov

bol FICZ, ktorý môže byť označený za zlúčeninu, ktorá dokázala indukovať transkripčnú aktivitu AhR zo všetkých testovaných látok najlepšie. Toto pozorovanie bolo potvrdené niekoľkými experimentálnymi prácami. Jednou z nich je štúdia od autorov Gan *et al.* (2020), kde bola použitá ľudská bunková línia HEP1-6. V tejto práci zistili, že po pridaní FICZ dochádza k aktivácii génov regulovaných prostredníctvom AhR a to konkrétne CYP1A1 a CYP1B1. Toto tvrdenie bolo potvrdené aj experimentami Tamayo *et al.* (2022), ktorý rovnako dokázali, že FICZ výrazne aktivuje AhR, čoho dôsledkom je indukcia expresie CYP1A1.

Druhou študovanou skupinou boli látky prírodného pôvodu, kde prvou sledovanou látkou bol berberín. Vrzal *et al.* (2005) skúmali mechanizmy aktivácie génovej expresie CYP1A1 na ľudskej bunkovej línii HepG2. Zistili, že po aplikácii berberínu došlo v bunkovej línii HepG2 k indukcii expresie CYP1A1, ktorá bola závislá od koncentrácie a času pôsobenia. Výsledkom ich práce bolo zistenie, že aj keď berberín indukuje AhR-sprostredkovanú expresiu CYP1A1, jej intenzita nie je príliš vysoká. To bolo potvrdené aj v našej práci, kde sme pozorovali, že berberín po 4 hodinách nijako výrazne nezvyšoval transkripčnú aktivitu AhR, avšak po 24 hodinách už aktivácia AhR ale zaznamená bola. Ďalšou látkou bol pelargonidín, ktorý v našej práci po 4 hodinách vykazoval výraznú indukciu luciferázovej aktivity a to až na úroveň 157 % z pozitívnej kontroly 10 nmol·l⁻¹ TCDD. Biagioli *et al.* (2019) sledovali pomocou ChIP eseje a qRT-PCR schopnosť pelargonidínu indukovať expresiu CYP1A1 v HepG2 bunkách. Zistili, že po pridaní pelargonidínu dochádza k tvorbe komplexu diméru AhR/ARNT a AhR responzívneho elementu v promótorovej oblasti CYP1A1 a následnej aktivácii expresie tohto génu. Rovnako ako v predkladanej práci, aj autori Kameníčková *et al.* (2013) sledovali vplyv pelargonidínu na transkripčnú aktivitu AhR v rovnakej bunkovej línii AZ-AhR. Pozorovali, že pelargonidín má agonistické účinky na AhR, ale indukcia transkripčnej aktivity dosahuje iba 1 % z hodnoty zaznamenatej po aplikácii 5 nmol·l⁻¹. Tento výsledok bol v súlade s našimi zisteniami, kedy po 24 hodinách síce indukcia luciferázovej aktivity dosahovala pomerne vysoké hodnoty, tie ale v porovnaní s 10 nmol·l⁻¹ TCDD predstavovali iba 5% účinok pozitívnej kontroly TCDD. Resveratrol bola tretia látka zo skupiny látok prírodného pôvodu. V našej práci nenastala vyššia indukcia transkripčnej aktivity AhR po 4 ani po 24 hodinách. Autori Pastorková *et al.* (2017) v svojej štúdii sledovali indukciu luciferázovej aktivity po aplikácii cis-resveratrolu a trans-resveratrolu na dvoch ľudských bunkových líniiach HepG2 a AZ-AhR. Ich výsledkom bola

nízka indukcia oboch látok, ale hodnoty luciferázovej aktivity boli približne 5-krát vyššie v porovnaní s našimi výsledkami.

Ďalšou študovanou skupinou látok boli enviromentálne polutanty, kde sme ako prvý sledovali vplyv PCB126. Zistili sme, že PCB126 je silným aktivátorom AhR. Shi *et al.* (2019) použili dve bunkové línie, ľudskú HepG2 a myšiu Hepa1c1c7, na sledovanie vplyvu PCB126 na transkripčnú aktivitu AhR. Pomocou qRT-PCR metódy stanovovali množstvo mRNA pre CYP1A1. V ľudskej bunkovej línii HepG2 zaznamenali oveľa výraznejší nárast koncentrácie mRNA ako v myších bunkách, čo potvrdzuje naše pozorovania o agonistickom účinku PCB126. Zároveň to poukazuje na skutočnosť o medzidruhových rozdieloch v schopnosti aktivovať AhR. Pomocou qRT-PCR a western blot analýzy študovali Reyes-Reyes *et al.* (2016) vplyv benzo[a]pyrénu na transkripčnú aktivitu AhR v bunkovej línii HepG2. Vplyv BaP na aktivitu AhR skúmal aj Vondráček *et al.* (2017) a to pomocou luciferázovej eseje s použitím reportérovej bunkovej línie AZ-AhR. Výsledky obidvoch kolektívov došli, podobne ako v predkladanej práci, k záveru, že BaP je výrazným agonistom AhR. V štúdiu Vondráček *et al.* (2017) dosiahla indukcia transkripčnej aktivity AhR po 6 hodinovej inkubácii s médiom obsahujúcim $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BaP 81 % z hodnoty pozitívnej kontroly TCDD. V našej práci bola po 4 hodinách pôsobenia rovnakej koncentrácie BaP dokonca zaznamenaná indukcia až na úrovni 123 % z hodnoty indukcie $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD. Poslednou z tejto skupiny bolo študované TCDD, ktoré sa využíva ako modelový agonista AhR a aj v našej práci bol identifikovaný ako silný aktivátor transkripčnej aktivity AhR. Naše zistenia boli potvrdené autormi Novotná *et al.* (2011), ktorí použili na stanovenie transkripčnej aktivity AhR rovnakú reportérovú líniu AZ-AhR. Podľa predpokladu, hodnoty indukcie luciferázovej aktivity sa po aplikácii TCDD pohybovali na približne rovnakej úrovni. Agonistické účinky TCDD boli dokázané aj pomocou qRT-PCR na ľudskej (HepG2) a myšej (Hep1c1c7) bunkovej línii (Shi *et al.*, 2019). Autori zistili, že v obidvoch líniiach došlo po aplikácii TCDD k výraznej indukcii transkripčnej aktivity AhR, ktorá mala za následok zvýšenie expresie CYP1A1 génov.

Poslednou skupinou testovaných látok boli metabolity črevnej mikrobioty, konkrétne sa jednalo o indol-3-acetamid a indol-3-pyruvát a tryptamín. Účinky všetkých troch látok na transkripčnú aktivitu AhR, študovali aj Vrzalová *et al.* (2022). Pomocou dvoch reportérových bunkových línii AZ-AhR a LS174T-AhR-Luc, zistili, že najsilnejšie agonistické účinky mali IAD a TA. Z nami získaných výsledkov je zjavné, že najvyššiu schopnosť aktivovať AhR vykazovali IPY a IAD, avšak rozdiely v hodnotách jednotlivých indukcii v porovnaní s výsledkami Vrzalová

et al. (2022) boli iba malé. V ďalšej štúdií Vyhlídalová *et al.* (2020) sledovali vplyv IAD, IPY a TA na transkripčnú aktivitu AhR v ľudských bunkových linách LS-180 a HR-29. Prostredníctvom qRT-PCR zistili, že k najvýraznejšiemu nárastu koncentrácie mRNA pre CYP1A1 došlo po inkubácii buniek s IPY a IAD, čo je v súlade s našimi pozorovaniami. Fakt, že TA vykazoval nižšiu schopnosť indukcie génovej expresie CYP1A1 pripísali autori intenzívnemu metabolizmu tejto látky. Navyše, aktivácia AhR bola potvrdená aj pomocou sledovania nukleárnej translokácie a ChIP eseje. Už krátko po aplikácii testovaných látok bol zaznamenaný transport AhR z cytozolu do jadra, kde po sformovaní heterodiméru AhR/ARNT došlo k jeho následnému naviazaniu na AhR responzívny element v promótorovej oblasti CYP1A1 génu (Vyhlídalová *et al.*, 2020).

7 ZÁVER

Hlavným cieľom predkladanej bakalárskej práce bolo určenie vplyvu vybraných skupín látok na transkripčnú aktivitu AhR v bunkách reportérovej línie AZ-AhR. Ďalším cieľom bolo stanovenie účinku týchto látok na viabilitu buniek. V teoretickej časti bola opísaná história aryl uhl'ovodíkového receptora, jeho štruktúra a aktivácia. Taktiež boli opísané jeho funkcie v organizme a časť literárneho prehľadu bola venovaná vybraným ligandom AhR.

V experimentálnej časti bakalárskej práce bola na bunkovej línii AZ-AhR zisťovaná indukcia transkripčnej aktivity AhR pomocou luciferázovej reportérovej eseje. Výsledkom experimentov bol nárast luciferázovej aktivity prejavujúci sa zvýšením intenzity luminiscencie. Bolo zistené, že zo skupiny endogénnych ligandov mal najvýraznejší vplyv na indukciu transkripčnej aktivity FICZ. Po 4 hodinách vykazoval najvyššie hodnoty $9,88 \pm 1,08$ FOLD. Po 24 hodinách to boli hodnoty až $1182 \pm 298,46$ FOLD. Pri kyseline kynurénovej bola zaznamenaná zvýšená indukcia luciferázovej aktivity len po 4 hodinách na hodnotu $6,03 \pm 0,56$ FOLD. Bilirubín nevykazoval výrazný vplyv na transkripčnú aktivitu AhR. Po 24 hodinách sa všetky hodnoty pohybovali na úrovni negatívnej kontroly (1 FOLD).

V skupine látok prírodného pôvodu boli najvyššie hodnoty indukcie luciferázovej aktivity pozorované pri pelargonidíne, kedy bola po 4 hodinovej inkubácii zaznamenaná hodnota $46,49 \pm 13,71$ FOLD. Po 24 hodinách nastal nárast indukcie iba po pôsobení jeho najvyšších koncentrácií. Berberín pôsobil ako slabý agonista AhR. Po 4 hodinách bola zaznamenaná najvyššia indukcia $3,96 \pm 0,94$ FOLD. Resveratrol nijako výrazne neovplyvňoval transkripčnú aktivitu AhR.

V skupine environmentálnych polutantov mali všetky tri látky výrazný vplyv na transkripčnú aktivitu AhR. Najvyššia indukcia luciferázovej aktivity bola zaznamenaná pri TCDD, ktorá po 4 hodinách dosahovala hodnotu $10,98 \pm 4,40$ FOLD a po 24 hodinovej inkubácii bola zaznamenaná hodnota $893,13 \pm 276,85$ FOLD. Pri PCB126 bol taktiež pozorovaný výrazný vplyv na úroveň luciferázovej aktivity. Po 4 hodinách dosahovala indukcia hodnotu $8,67 \pm 3,69$ FOLD a po 24 hodinách hodnotu $659,52 \pm 215,62$ FOLD. Pri benzo[a]pyréne bola po 4 hodinách pôsobenia zaznamenaná hodnota luciferázovej aktivity $10,59 \pm 4,93$ FOLD. Naopak, po 24 hodinách už nebol pozorovaný až taký výrazný nárast aktivity, indukcia dosahovala $305,51 \pm 36,22$ FOLD.

V skupine metabolitov črevnej mikrobioty vykazovali najvyššie agonistické účinky IPY a IAD. Po 4 hodinách pôsobenia IAD bola zaznamenaná indukcia luciferázovej aktivity $61,59 \pm 21,51$ FOLD a v prípade IPY dosahovala hodnota $71,33 \pm 8,56$ FOLD. Najnižšiu

transkripčnú aktivitu AhR po ovplyvnení buniek vykazoval TA, kedy po 4 hodinovej inkubácii bola zaznamená hodnota $26,06 \pm 4,26$ FOLD. Pri všetkých troch látkach nebol zaznamenaný výrazný vplyv na indukciu luciferázovej aktivity po 24 hodinách, zvýšené hodnoty boli pozorované iba pri najvyšších koncentráciách.

Životaschopnosť buniek bola stanovená pomocou MTT testu. Pri žiadnej zo skúmaných látok v nami použitých koncentráciách nebol zaznamenaný výraznejšie cytotoxické účinky na testované bunky. Po inkubácii buniek s resveratrolom klesla životaschopnosť buniek na najnižšiu hodnotu a to $77,34 \% \pm 11,12 \%$. Látky BER, PEL, PCB126, BaP, TCDD, IPY a IAD vykazovali mierne proliferáčné účinky. Zvyšné látky nemali žiadny merateľný vplyv na viabilitu reportérových buniek.

8 LITERATÚRA

Aden D.P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B. B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615–616.

Bell D. R., Poland A. (2000): Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting Protein. *Journal of Biological Chemistry* 275: 36407–36414.

Bennett P., Ramsden D.B., Williams A. C. (1996): Complete structural characterisation of the human aryl hydrocarbon receptor gene. *Journal of Clinical Pathology* 49: M12–M16.

Bergander L., Wincent E., Rannug A., Foroozesh M., Alworth W., Rannug U. (2004): Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chemico-Biological Interactions* 149(2-3): 151–164.

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.

Biagioli M., Carino A., Fiorucci C., Annunziato G., Marchianò S., Bordoni M., Roselli R., Giorgio C. D., Castiglione F., Ricci P., Bruno A., Faccini A., Distrutti E., Baldoni M., Costantino G., Fiorucci S. (2019): The aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates the counter-regulatory effects of pelargonidins in models of inflammation and metabolic dysfunctions. *Nutrients* 11(8): 1820.

Biagioli M., Marchiano S., Roselli R., Giorgio C., Bellini R., Bordoni M., Gidari A., Sabbatini S., Francisci D., Fiorillo B., Catalanotti B., Distrutti E., Carino A., Zampella A., Costantino G., Fiorucci S. (2021): Discovery of a AhR pelargonidin agonist that counter-regulates Ace2 expression and attenuates ACE2-SARS-CoV-2 interaction. *Biochemical Pharmacology* 188: 114564.

Bolsoni-Lopes A., Alonso-Vale M. I. C. (2015): Lipolysis and lipases in white adipose tissue - an update. *Archives of Endocrinology and Metabolism* 59(4): 335–342.

Boule L. A., Winans B., Lambert K., Vorderstrasse B. A., Topham D. J., Pavelka M. S., Lawrence B. P. (2015): Activation of the aryl hydrocarbon receptor during development enhances the pulmonary CD4⁺ T-cell response to viral infection. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 309(3): L305–L313.

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

Cassán, F., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2013): Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2): 440–459.

Crews S.T. (1998): Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes & Development* 12: 607–620.

DiNatale B. C., Murray I. A., Schroeder J. C., Flaveny C. A., Lahoti T. S., Laurenzana E. M., Omiecinski C. J., Perdew, G. H. (2010): Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicological Sciences* 115(1): 89–97.

Dolwick K. M., Schmidt J. V., Carver L. A., Swanson H. I., Bradfield C. A. (1993): Cloning and expression of human Ah receptor cDNA. *Molecular Pharmacology* 44(5): 911–917.

Dvořák, Z., Poulíková, K., Mani, S. (2021): Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry* 215: 113231.

Ema M., Sogawa K., Watanabe N., Chujoh Y., Matsushita N., Gotoh O., Funae Y., Fujii-Kuriyama Y. (1992): cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184(1): 246–253.

Eskenazi B., Warner M., Brambilla P., Signorini S., Ames J., Mocarelli P. (2018): The Seveso accident: A look at 40 years of health research and beyond. *Environment International* 121: 71–84.

Esser C., Barga I., Weighardt H., Haarmann-Stemmann T., Krutmann J. (2013): Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Seminars in Immunopathology* 35(6): 677–691.

Fairbrother A., Hope B. (2005): Ecotoxicology, Terrestrial. In: *Encyclopedia of Toxicology* (Second Edition), pp. 138–143, Elsevier, Oregon.

Fairman R., Beran-Steed R. K., Anthony-Cahill S. J., Lear J. D., Stafford W. F., DeGrado W. F., Benfield P. A., Brenner, S. L. (1993): Multiple oligomeric states regulate the DNA binding of helix-loop-helix peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22): 10429–10433.

Fujisawa-Sehara A., Yamane M., Fujii-Kuriyama Y. (1988): A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(16): 5859–5863.

Gan M., Ding H., Chen G. (2020): 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole reduces apoptosis induced by benzo[a]pyrene in a mitochondrial-dependent manner. *Cell Biology International* 44(12): 2427–2437.

Gehm B. D., McAndrews J. M., Chien P.Y., Jameson, J. L. (1997): Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25): 14138–14143.

Gielen J. E., Goujon F. M., Nebert D. W. (1972): Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. *The journal of Biological Chemistry* 217: 1125–1137.

Gupta N., Singh T., Chaudhary R., Garg S. K., Sandhu G. S., Mittal V., Gupta R., Bodin R., Sule S. (2016): Bilirubin in coronary artery disease: cytotoxic or protective. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* 7(4): 469–476.

Haedrich, J., Stumpf C., Denison M. (2018): Ah-receptor based bioassay screening for PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in human milk samples from a WHO/UNEP global survey on halogenated POPs. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht* 114: 389–397.

Hahn M. E., Karchner S. I., Shapiro M. A., Perera S. A. (1997): Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25): 13743–13748.

Hahn M. E., Poland A., Glover E., Stegeman J. J. (1994): Photoaffinity labeling of the Ah Receptor: phylogenetic survey of diverse vertebrate and invertebrate species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 310(1): 218–228.

Hankinson O. (1995): The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review Of Pharmacology and Toxicology* 35(1): 307–340.

Heath-Pagliuso S., Rogers W. J., Tullis K., Seidel S. D., Ceniijn P. H., Brouwer A., Denison M. S. (1998): Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37(33): 11508–11515.

Hoffman T., Acerbo E., Carranza K., Gilberto V., WallisL., Hanneman W. (2019): Ultrasensitivity dynamics of diverse aryl hydrocarbon receptor modulators in a hepatoma cell line. *Archives of Toxicology* 93.

Ikuta T., Rguchi H., Tachibana T., Yonedas Y., KAwajiri K. (1997): Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 273(5): 2895–2904.

Jang M. (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275(5297): 218–220.

Jing W., Dong S., Luo X., Liu J., Wei B., Du W., Yang L., Luo H., Wang Y., Lu, H. (2020): Berberine improves colitis by triggering AhR activation by microbial tryptophan catabolites. *Pharmacological Research* 164: 105358.

Jones S. (2004): An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* 5(6): 226.

Kameníčková A., Anzenbacherova E., Pavek P., Soshilov A. A., Denison M. S., Anzenbacher P., Dvořák Z. (2013): Pelargonidin activates the AhR and induces CYP1A1 in primary human hepatocytes and human cancer cell lines HepG2 and LS174T. *Toxicology Letters* 218(3): 253–259.

Kaur G., Dufour J. M. (2012): Cell lines. *Spermatogenesis* 2(1): 1–5.

Kimbrough R. D. (1995): Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: an update. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(2): 133–163.

Korkalainen M., Tuomisto J., Pohjanvirta R. (2004): Primary structure and inducibility by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) of aryl hydrocarbon receptor repressor in a TCDD-sensitive and a TCDD-resistant rat strain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315(1): 123–131.

Le Beau M. M., Carver L. A., Espinosa R. III., Schmidt J. V., Bradfield C. A. (1994): Chromosomal localization of the human AhR locus encoding the structural gene for the Ah receptor to 7p21→p15. *Cytogenetic and Genome Research*. 66(3): 172–176.

Li Y., Innocentin S., Withers D. R., Roberts N. A., Gallagher A. R., Grigorieva E. F., Wilhelm C., Veldhoen M. (2011): Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell* 147: 629–640.

Li S., Pei X., Zhang W., Xie H., Zhao B. (2014): Functional analysis of the dioxin response elements (DREs) of the murine CYP1A1 gene promoter: beyond the core DRE sequence. *International Journal of Molecular Sciences* 15(4): 6475–6487.

Lo S. N., Wang Ch. W., Chen Y. S., Huang C. C., Wu T. S., Li L. A., Lee I. J., Ueng, Y. F. (2017): Berberine activates aryl hydrocarbon receptor but suppresses CYP1A1 induction through miR-21-3p stimulation in MCF-7 breast cancer cells. *Molecules* 22(11): 1847.

López-Terrada D., Cheung S. W., Finegold M. J., Knowles B. B. (2009): HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology* 40(10): 1512–1515.

Ma Q. (2011): Influence of light on aryl hydrocarbon receptor signaling and consequences in drug metabolism, physiology and disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 7(10): 1267–1293.

Ma Q., Baldwin K. T. (2000): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry* 275(12): 8432–8438.

Ma Q., Dong, L., Whitlock J. P., Jr. (1995): Transcriptional activation by the mouse Ah receptor. Interplay between multiple stimulatory and inhibitory functions, *Journal of Biological Chemistry* 270: 12697–12703.

Ma Q., Whitlock J. P. (1997): A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Biological Chemistry* 272(14): 8878–8884.

Meigs J. W., Albom J. J., Kartin B. L. (1954): Chloracne from an unusual exposure to arochlor. *Journal of the American Medical Association* 154(17): 1417–1718.

Michalopoulos G. K., Bhushan B. (2020): Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18: 40–55.

Michaudel C., Danne C., Agus A., Magniez A., Aucouturier A., Spatz M., Lefevre A., Kirchgesner J., Rolhion N., Wang Y., Lavelle A., Galbert C., Da Costa G., Poirier M., Lapière A., Planchais J., Nádvořník P., Illés P., Oeuvray C., Creusot L., Michel M. L., Benech N., Bourrier A., Nion-Larmurier I., Landman C., Richard M. L., Emond P., Seksik P., Beaugerie L., Arguello R. R., Moulin D., Mani S., Dvořák Z., Bermúdez-Humarán L. G., Langella P., Sokol H. (2023): Rewiring the altered tryptophan metabolism as a novel therapeutic strategy in inflammatory bowel disease. *Gut*. 72(7): 1296–1307.

Mimura J., Ema M., Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y. (1999): Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & Development* 13(1): 20–25.

Monostory K., Pascussi J. M. (2008): Regulation of drug-metabolizing human cytochrome P450s. *Acta Chimica Slovenica* 55: 20–37.

Murre C., McCaw P. S., Baltimore D. (1989): A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56(5): 777–783.

Ngashangva L., Bachu V., Goswami P. (2019): Development of new methods for determination of bilirubin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 162: 242–285.

Nikolic M., Sustersic T., Filipovic N. (2018): In vitro models and on-Chip systems: biomaterial interaction studies with tissues generated using lung epithelial and liver metabolic cell lines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6: 1.

Novotná A., Pavek 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.

Panteleyev A. A., Bickers D. R. (2006): Dioxin-induced chloracne – reconstructing the cellular and molecular mechanisms of a classic environmental disease. *Experimental Dermatology* 15(9): 705–730.

Pastorková B., Vrzalová A., Bachleda P., Dvořák Z. (2017): Hydroxystilbenes and methoxystilbenes activate human aryl hydrocarbon receptor and induce CYP1A genes in human hepatoma cells and human hepatocytes. *Food Chemical Toxicology* 103:122–132.

Peng L., Kang S., Yin Z., Jia R., Song X., Li L., Li Z., Zou Y., Liang X., Li L., He C., Ye G., Yin L., Shi F., Ly C., Jing B. (2015): Antibacterial activity and mechanism of berberine against *Streptococcus agalactiae*. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(5): 5217–5223.

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

Phelan D., Winter G. M., Rogers W. J., Lam J. C., Denison M. S. (1998): Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357(1): 155–163.

Pinero-Fernandez S., Chimere C., Keyser U. F., Summers D. K. (2011): Indole transport across *Escherichia coli* membranes. *Journal of Bacteriology* 193(8): 1793–1798.

Pinto C. J. G., Ávila-Gálvez M. A., Lian Y., Moura-Alves P., Nunes d Santos C. (2023): Targeting the aryl hydrocarbon receptor by gut phenolic metabolites: a strategy towards gut inflammation. *Redox Biology* 61: 2213–2317.

Poland A., Glover E., Kende A. S. (1976): Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 251(16): 4936–4946.

Poland A., Knutson J. C. (1982): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22: 517–554.

Pongratz, I., Antonsson, C., Whitelaw, M. L., Poellinger, L. (1998): Role of the PAS domain in regulation of dimerization and DNA binding specificity of the dioxin receptor. *Molecular and Cellular Biology* 18(7): 4079–4088.

Pongratz I., Mason G. G. F., Poellinger L. (1992): Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 267(19): 13728–13734.

Ramadoss P., Perdew G. H. (2005): The transactivation domain of the Ah receptor is a key determinant of cellular localization and ligand-independent nucleocytoplasmic shuttling properties. *Biochemistry* 44(33): 11148–11159.

Rannug U., Rannug A., Sjöberg U., Li H., Westerholm R., Bergman J. (1995): Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chemistry & Biology* 2(12): 841–845.

Revel A., Raanani H., Younlgai E., Xu J., Rogers I., Han R., Savouret J. F., Casper R. F. (2003): Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *Journal of Applied Toxicology* 23(4): 255–261.

Reyes-Reyes E. M., Ramos I. N., Tavera-Garcia M. A., Ramos K. S. (2016): The aryl hydrocarbon receptor agonist benzo(a)pyrene reactivates LINE-1 in HepG2 cells through canonical TGF- β 1

signaling: implications in hepatocellular carcinogenesis. *American Journal of Cancer Research* 6(5): 1066–1077.

Rico-Leo E. M., Lorenzo-Martín L. F., Román Á. C., Bustelo Y. R., Merino J. M., Fernández-Salguero P. M. (2021): Aryl hydrocarbon receptor controls skin homeostasis, regeneration, and hair follicle cycling by adjusting epidermal stem cell function. *STEM CELLS* 39(12): 1733–1750.

Shen H., Zeng C., Wu X., Liu S., CHen X. (2019): Prognostic value of total bilirubin in patients with acute myocardial infarction: A meta-analysis. *Medicine* 98: 3.

Shi H., Hardesty J. E., Jin J., Head K. Z., Falkner K. C., Cave M. C., Prough R.A. (2019): Concentration dependence of human and mouse aryl hydrocarbon receptor responsiveness to polychlorinated biphenyl exposures: Implications for aroclor mixtures. *Xenobiotica* 49(12): 1414–1422.

Shin J. W., Lee H. S., Na J. I., Huh C. H., Park K. C., Choi H. R. (2020): Resveratrol inhibits particulate matter-induced inflammatory responses in human keratinocytes. *International Journal of Molecular Sciences* 21(10): 3446.

Schupp M., Lazar M. A. (2010): Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper. *Journal of Biological Chemistry* 285(52): 40409–40415.

Schwartz L. (1936): Dermatitis from synthetic resins and waxes. *American Journal of Public Health and the Nations Health* 26: 586–592.

Schwertner H. A, Jackson W. G, Tolan G.(1994): Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 40(1): 18–23.

Sinal C. J., Bend J. R. (1997): Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of Cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma Hepa 1c1c7 Cells. *Molecular Pharmacology* 52(4): 590–599.

Soshilov A., Denison M. S. (2011): Ligand displaces heat shock protein 90 from overlapping binding sites within the aryl hydrocarbon receptor ligand-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 286(40): 35275–35282.

Sun M., Ma N., He T., Johnston L. J., Ma X. (2020): Tryptophan (Trp) modulates gut homeostasis via aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–9.

Tamayo M., Martín-Nunes L., Piedras M. J., Martín-Calvo M., Martí-Morente D., Gil-Fernández M., Gómez-Hurtado N., Moro M. Á., Bosca L., Fernández-Velasco M., Delgado C. (2022): The aryl hydrocarbon receptor ligand FICZ improves left ventricular remodeling and cardiac function at the onset of pressure overload-induced heart failure in mice. *International Journal of Molecular Sciences* 23(10): 5403.

Togawa H., Shinkai S., Mizutani T. (2008): Induction of human UGT1A1 by bilirubin through AhR dependent pathway. *Drug Metabolism Letters* 2(4): 231–237.

Tomkiewicz C., Herry L., Bui L. C., Métayer C., Bourdeloux M., Barouki R., Coumoul, X. (2012): The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene* 32(14): 1811–1820.

Trefs E., Gannon M., Wasserman D. H. (2017): The liver. *Current Biology* 27(21): R1147–R1151.

Tremaroli V., Bäckhed F. (2012): Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489(7415): 242–249.

Vondráček J., Pěňčíková K., Neča J., Ciganek M., Grycová A., Dvořák Z., Machala M. (2017): Assessment of the aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human cell-based reporter gene assay. *Environmental Pollution (Pt A)*: 307–316.

Vrzal R., Zdarilová A., Ulrichová J., Bláha L., Giesy J. P., Dvořák Z. (2005): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by berberine in HepG2 and H4IIE cells: biphasic effect on CYP1A1. *Biochemical Pharmacology* 70(6): 925–936.

Vrzalová A., Pečinková P., Illés P., Gurská S., Džubák P., Szotkowski M., Hajdúch M., Mani S., Dvořák Z. (2022): Mixture effects of tryptophan intestinal microbial metabolites on aryl hydrocarbon receptor activity. *International Journal of Molecular Sciences* 23(18): 10825.

Vyhlídalová B., Krasulová K., Pečinková P., Marcalíková A., Vrzal R., Zemánková L., Vančo J., Trávníček Z., Vondráček J., Karasová M., Mani S., Dvořák Z. (2020): Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 21(7): 2614.

Wang Q., Chen J., Ko Ch. I., Fan Y., Carreira V., Chen, Y., Xia Y., Medvedovic M., Puga A. (2013): Disruption of aryl hydrocarbon receptor homeostatic levels during embryonic stem cell differentiation alters expression of homeobox transcription factors that controls cardiomyogenesis. *Environmental Health Perspectives* 121(11-12): 1334–1343.

Wang H., Zhao Y., Li L., McNutt M. A., Wu L., Lu S., Yu Y., Zhou W., Feng J., Chai G., Yang Y., Zhu, W. G. (2007): An ATM- and rad3-related (ATR) signaling pathway and a phosphorylation-acetylation cascade are involved in activation of p53/p21Waf1/Cip1inr response to 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment. *Journal of Biological Chemistry* 283(5): 2564–2574.

Wang H., Wei Y., Yu, D. (2015): Control of lymphocyte homeostasis and effector function by the aryl hydrocarbon receptor. *International Immunopharmacology* 28(2): 818–824.

WHO (2003): Polychlorinated biphenyls: human health aspects In: World Health Organization, pp. 1–64, Geneva, Switzerland.

Wincent E., Amini N., Luecke S., Glatt H., Bergman J., Crescenzi C., Rannug A., Rannug U. (2009): The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501

substrate 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *Journal of Biological Chemistry* 284(5): 2690–2696.

Wiśniewski J. R., Vildhede A., Norén A., Arthursson P. (2016): In depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes. *Journal of Proteomics* 136: 234–247.

Wong J. Y., Hu W., Downward G. S., Seow W. J., Bassig B. A., Ji B. T., Wei F., Wu G., Li J., He J., Liu Ch. S., Cheng W. L., Huang Y., Yang K., CHen Y., Rothman N., Vermeulen R. C., Lan Q. (2017): Personal exposure to fine particulate matter and benzo[a]pyrene from indoor air pollution and leukocyte mitochondrial DNA copy number in rural China. *Carcinogenesis* 38(9): 893–899.

Xing X., Bi H., Chang A. K., Zang M. X., Wang M., Ao X., Li S., Pan H., Guo Q., Wu H. (2012): SUMOylation of AhR modulates its activity and stability through inhibiting its ubiquitination. *Journal of Cellular Physiology* 227(12): 3812–3819.

Ye Y., Liu X., Wu N., Han Y., Wang J, Yu Y., Chen Q. (2021): Efficacy and safety of berberine alone for several metabolic disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Front Pharmacol* 12: 653887.

Young R. A. (2014): Dioxins. In: *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, pp. 190–194, Academic Press, Maryland.

Zhang W., Sargis R. M., Volden P. A., Carmean C. M., Sun X. J., Brady M. J. (2012): PCB 126 and other dioxin-like PCBs specifically suppress hepatic PEPCK expression via the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS ONE* 7(5): e37103.

Zhou Y., Tung H. Y., Tsai Y. M., Hsu S. C., Chang H. W., Kawasaki H., Tseng H. Ch., Plunkett B., Gao Peisong., Hung Ch. H., Vonakis B. M., Huang S. K. (2013): Aryl hydrocarbon receptor controls murine mast cell homeostasis. *Blood* 121(16): 3195–3204.