

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Adéla Marcalíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv kofeinu na indukovanou expresi cílových
genů receptoru pro vitamin D**

Bakalářská práce

Adéla Marcalíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

.....

Adéla Marcalíková

Souhrn

Kofein je významnou složkou lidské stravy, a přestože má řadu prospěšných účinků na zdraví, je spojován také s určitými zdravotními riziky, jako je například riziko vzniku osteoporózy a podobných onemocnění. Jedním z významných regulátorů kostního metabolismu je receptor pro vitamín D. Tato práce se zabývá vlivem kofeinu na expresi cílových genů tohoto receptoru, které potenciálně mohou souviset s vznikem takových onemocnění. Studován byl vliv kofeinu o koncentraci 0,1; 1; 10 a 100 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ v koinkubaci s ligandem receptoru, kalcitriolem, o koncentraci 75 nebo 1 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ v buněčných liniích LS180 a HOS a v lidských osteoblastech. Exprese byla stanovována na úrovni RNA pomocí Real-Time PCR a na úrovni proteinu pomocí Western blottingu, mezi sledovanými geny byly geny související s metabolismem kalcitriolu (*CYP24A1* a *CYP27B1*) a s tvorbou kostní matrix (*BGLAP*, *SPP1* a *TNFSF11*). V buněčné linii LS180 nebyly zaznamenány změny v expresi genů. V buněčné linii HOS a v kultuře osteoblastů byly zaznamenány mírné modulační účinky na expresi genů, které vyžadují další zkoumání.

Summary

Caffeine is an important part of human diet. Even though it has a number of beneficial health effects, it is associated with certain health hazards such as the development of osteoporosis and similar diseases. Vitamin D receptor is one of the major regulators of bone metabolism. This thesis is focused on the effect of caffeine on the receptor's target genes that potentially may be related to the development of such diseases. The effect of caffeine was studied at concentrations of 0,1; 1; 10 and 100 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ in coincubation with the ligand, calcitriol, at a concentration of either 75 or 1 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ in LS180 and HOS cell lines and human osteoblasts. The expression was assayed at RNA level by Real-Time PCR and at protein level by western blotting. The selected genes were associated with calcitriol metabolism (*CYP24A1* and *CYP27B1*) and with bone matrix formation (*BGLAP*, *SPP1* and *TNFSF11*). There were no changes in gene expression in the LS180 cell line. In the HOS cell line and osteoblast culture there were some modulatory effects detected but they need further analysis.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce, panu doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., za jeho trpělivost a ochotu. Rovněž bych chtěla poděkovat zaměstnancům Laboratoře molekulární farmakologie a toxikologie za jejich pomoc během mého působení v laboratoři.

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Cíle práce	2
3.	Literární přehled.....	3
3.1.	Receptor pro vitamín D.....	3
3.1.1.	Mechanismus působení VDR.....	3
3.1.2.	Vitamín D.....	5
3.1.3.	Ostatní ligandy VDR.....	7
3.1.4.	Cílové geny.....	8
3.2.	Kofein.....	10
3.2.1.	Farmakokinetika.....	11
3.2.2.	Farmakodynamika.....	13
3.2.3.	Kofein a vznik onemocnění.....	15
4.	Materiál a metody.....	16
4.1.	Biologický materiál.....	16
4.2.	Použité chemikálie a roztoky	16
4.3.	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	19
4.4.	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	20
4.4.1.	Pasážování a vyšetí buněčných linií	20
4.4.2.	Treatment.....	21
4.4.3.	Izolace RNA	22
4.4.4.	Reverzní transkripce.....	22
4.4.5.	Real-Time PCR	23
4.4.6.	Izolace proteinů, příprava vzorků pro SDS-PAGE	24
4.4.7.	SDS-PAGE.....	24
4.4.8.	Western blotting	26
5.	Výsledky	28
5.1.	Viabilita buněk v přítomnosti kofeinu	28
5.2.	Transkripční aktivita VDR v přítomnosti kofeinu	29
5.3.	Genová exprese v přítomnosti kofeinu.....	31
5.3.1.	Exprese na úrovni RNA po 24 h v buněčné linii LS180	31
5.3.2.	Exprese na úrovni proteinu po 24 h v buněčné linii LS180	33
5.3.3.	Časová závislost exprese na úrovni RNA v buněčné linii LS180	33
5.3.4.	Časová závislost exprese na úrovni proteinu v buněčné linii LS180	35
5.3.5.	Exprese na úrovni RNA po 24 h v buněčné linii HOS.....	35
5.3.1.	Exprese na úrovni proteinu po 24 h v buněčné linii HOS.....	38

5.3.2.	Expres na úrovni RNA po 24 h v lidských osteoblastech.....	40
5.3.1.	Expres na úrovni proteinu po 24 h v lidských osteoblastech.....	43
6.	Diskuse.....	44
7.	Závěr	48
8.	Literatura	49

Seznam symbolů a zkratek

1,25D ₃ -MARRS	1,25(OH) ₂ D ₃ membrane-associated rapid response binding protein
AA/BIS	Akrylamid/bisakrylamid
APS	Persíran amonný (ammonium persulfate)
ATM	Ataxia telangiectasia
BGLAP	Bone γ -carboxyglutamate protein
BSA	Telecí sérový albumin (bovinne serum albumin)
CBP	CREB-vazebný protein
DBP	Vitamín D vázající protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Přímá repetice (direct repeat)
ER	Obrácená repetice (everted repeat)
FBS	Fetální telecí sérum (fetal bovinne serum)
FBS-CS	Charcoal stripped fetální telecí sérum (fetal bovinne serum)
FOXO1	Forkhead box O1
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
HEPES-BSS	HEPES buffered saline solution
IOM	Institute of Medicine
LB	Loading buffer
LCA	Litocholová kyselina
M-CSF	Růstový hormon pro makrofágy (macrophage colony-stimulating factor)
MED1	Mediator complex subunit 1
NCoA62	Nuclear receptor coactivator 62 kDa
NCOR	Nuclear receptor co-represor
OCN	Osteokalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline
RANKL	Receptor activator of nuclear factor κ B ligand
RXR	Retinoidní X receptor
SDS	Dodecylsíran sodný (sodium dodecyl sulphate)
SIBLINGs	Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
SRC-1	Steroid receptor co-activator 1

TBS	Tris buffered saline
TNS	Trypsin neutralizing solution
TRPV6	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6
UT	Untreated
VDR	Receptor pro vitamín D
VDRE	Vitamín D responzivní elementy

Seznam obrázků

Obrázek 1: Metabolismus vitamínu D.....	6
Obrázek 2: Mechanismus účinku kofeinu.....	14
Obrázek 3: Viabilita buněčné linie LS180 po 24h inkubaci s kofeinem o koncentraci 0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$	28
Obrázek 4: Transkripční aktivita VDR v přítomnosti kofeinu o koncentraci 1–5000 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ po dobu 24 h v buněčné linii LS180.	29
Obrázek 5: Transkripční aktivita VDR při 24h koinkubaci kofeinu (0,1–5000 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180.....	30
Obrázek 6: Exprese genu <i>CYP24A1</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180.	32
Obrázek 7: Exprese genu <i>CYP27B1</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180.	32
Obrázek 8: Exprese genu <i>BGLAP</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180.	33
Obrázek 9: Časová závislost exprese genu <i>CYP24A1</i> na úrovni RNA po 2–8h koinkubaci kofeinu (1 a 10 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180.	34
Obrázek 10: Časová závislost exprese genu <i>BGLAP</i> na úrovni RNA po 2–8h koinkubaci kofeinu (1 a 10 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180.	34
Obrázek 11: Exprese genu <i>CYP24A1</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS.....	36
Obrázek 12: Exprese genu <i>CYP27B1</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS.....	36
Obrázek 13: Exprese genu <i>BGLAP</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS.....	37
Obrázek 14: Exprese genu <i>SPP1</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS.....	37
Obrázek 15: Exprese genu <i>TNFSF11</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS.....	38
Obrázek 16: Reprezentativní western blot detekce osteopontinu v buněčné linii HOS po 24h inkubaci.	39
Obrázek 17: Semikvantifikace exprese osteopontinu na úrovni proteinu po koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS po dobu 24 h.	39
Obrázek 18: Exprese genu <i>CYP24A1</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu (0,1–100 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a 1 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v lidských osteoblastech.	41

Obrázek 19: Exprese genu <i>BGLAP</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1-100 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$) v lidských osteoblastech.	42
Obrázek 20: Exprese genu <i>SPP1</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1-100 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$) v lidských osteoblastech.	42
Obrázek 21: Exprese genu <i>TNFSF11</i> na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1-100 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$) v lidských osteoblastech.	43

Seznam tabulek

Tabulka 1: Obsah kofeinu ve vybraných komerčně dostupných nápojích a volně dostupných léčích	11
Tabulka 2: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci 1 vzorku	23
Tabulka 3: Složení reakční směsi pro Real-Time PCR 1 vzorku.....	23
Tabulka 4: Podmínky PCR reakce	24
Tabulka 5: Složení dělicího gelu.....	25
Tabulka 6: Složení zaostřovacího gelu	25
Tabulka 7: Ředění použitých primárních protilátek	26

1. Úvod

Kofein je nedílnou součástí lidské stravy v západním světě a lze se s ním setkat běžně v různých formách, od tradičních jako je káva nebo čaj až po energetické nápoje, které za poslední dobu zažily silný rozmach. Přestože má tato látka své pozitivní účinky na udržení bdělosti a pozornosti, díky kterým jsou nápoje a potraviny s obsahem kofeinu tak rozšířené, je konzumace kofeinu spojována s určitými riziky pro lidské zdraví – četné studie popisují vliv kofeinu na vznik kardiovaskulárních chorob či negativní účinky na reprodukci a vývin plodu v těle matky, přestože jiné studie spojitost s konzumací kofeinu v těchto případech vylučují.

Konzumace kofeinu je také považována za rizikový faktor pro vznik osteoporózy či snížení kostní denzity u žen staršího věku, přestože jsou výsledky klinických studií zaměřených na tuto problematiku rovněž mnohdy protichůdné. Molekulární mechanismus, který by mohl za tím stát, nebyl dosud dostatečně studován. Potenciálním aktérem v takovém procesu může být receptor pro vitamín D, jež se mimo jiné významně podílí na regulaci metabolismu vápníku a fosforu, ovlivňuje resorpci kostí a tvorbu proteinů, které tvoří organickou složku kostní hmoty. Tato práce si klade za cíl prozkoumat účinky kofeinu na geny spadající pod regulaci tohoto receptoru, které by mohly mít vliv na vznik osteoporózy a podobných onemocnění.

2. Cíle práce

Cílem této práce je stanovit expresi genů *CYP24A1*, *CYP27B1*, *BGLAP*, *SPP1* a *TNFSF11* po koinkubaci kalcitriolu a kofeinu – na úrovni RNA metodou Real-Time PCR a na úrovni proteinu pomocí western blottingu, a to v nádorových buněčných liniích LS180 a HOS a v primární kultuře lidských osteoblastů.

3. Literární přehled

3.1. Receptor pro vitamín D

Receptor pro vitamín D (VDR) zprostředkovává biologické účinky vitamínu D (Haussler *et al.*, 1969). Jeho ligandem je $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamín D, biologicky aktivní, hormonální forma vitamínu D (Haussler *et al.*, 1968; Myrtle *et al.*, 1970; Norman *et al.*, 1971). VDR se podílí na homeostázi minerálů a má řadu jiných biologických účinků. Řadí se mezi jaderné receptory a společně s konstitutivním androstanovým receptorem a pregnanovým X receptorem náleží do podskupiny jaderných receptorů NR1I (Moore *et al.*, 2006).

Funkční domény VDR tvoří N-koncová DNA vazebná doména, která se skládá ze dvou zinkových prstů, ligand-vazebná doména, sestávající z minimálně 12 šroubovic a 3 β -skládaných listů, a pantová doména, která tyto dvě oblasti propojuje (Christakos *et al.*, 2016). Mimo nejběžnější variantu dlouhou 427 aminokyselin (tzv. VDRA isoformu) existují i jiné varianty VDR. Popsána byla VDRB1 isoforma, která má vyšší molekulovou hmotnost než VDRA díky prodloužení proteinu na N-konci (Sunn *et al.*, 2001). Tato isoforma má pravděpodobně podíl na charakteru odpovědi VDR v různých typech buněk a na různé typy ligandu (Esteban *et al.*, 2005). Třetí známá isoforma je dána polymorfismem v translačním iniciačním kodonu díky tranzici T-C, což má za výsledek zkrácení proteinu o 3 aminokyseliny a vyšší biologickou aktivitu (Arai *et al.*, 1997). Tato varianta byla pojmenována *FokI* podle restrikční endonukleázy, kterou se tento polymorfismus dá rozeznat (Gross *et al.*, 1996).

VDR se vyskytuje v mnoha tkáních. Nejvyšší exprese VDR je ve tkáních, ve kterých realizuje svou funkci v metabolismu vápníku – ve střevě, ledvinách, příštítných těliscích a kostech. Přítomen je také v hypofýze, mléčné žláze, mužských reprodukčních orgánech a rovněž v buňkách imunitního systému, zatímco v játrech a příčně pruhované svalovině jej nelze detekovat (Wang *et al.*, 2012).

3.1.1. Mechanismus působení VDR

VDR primárně funguje jako transkripční faktor. Vazba $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamínu D na VDR způsobuje asociaci receptoru s některou z isoform retinoidního X receptoru (RXR) a vzniklý heterodimer rozpoznává vitamín D responzivní elementy (VDRE) v promotoru cílových genů ve velkém žlábků dvoušroubovice DNA, kde se chová jako aktivátor či represor transkripce. VDRE ve většině případů tvoří přímá repetice (DR, direct repeat) dvou hexanukleotidových sekvencí (tzv. halfelements) s třínukleotidovou mezerou (označováno jako DR3), řidčeji se vyskytuje obrácená repetice (ER, everted repeat) s šestinukleotidovou mezerou (ER6). V případě nejběžnějšího DR3 se do sekvence na 5' konci váže RXR a do sekvence na 3' konci VDR. VDRE se v promotoru genu mohou vyskytovat v jedné kopii (např. myší osteokalcin, kuřecí parathormon či lidský p21), dvou (lidský cytochrom P450 24A1 a 3A4) či více (lidský RANKL, receptor activator of nuclear factor κ B ligand,

či TRPV6, transient receptor potential cation channel subfamily V member 6), přičemž pro maximální indukci je nutná vazba heterodimeru do všech VDRE (Haussler *et al.*, 2011a).

Aktivace transkripce cílových genů je umožněná asociací heterodimeru VDR-RXR s koaktivátory zajišťující acetylaci histonů, mezi jaké patří NCoA62 (nuclear receptor coactivator 62 kDa), SRC-1 (steroid receptor co-activator 1), CBP (CREB-vazebný protein) či P300. Následně dochází k asociaci dimeru s MED1 (mediator complex subunit 1), což umožňuje připojení RNA polymerázy II a dalších bazálních transkripčních faktorů a může dojít k transkripci genu. Represe transkripce je možná asociací s korepresory, jako jsou NCOR (nuclear receptor co-represor) a histondeacetylázy (Ryan *et al.*, 2015).

Aktivita VDR může být ovlivňována některými posttranslačními modifikacemi. Dosud byla popsána regulace pomocí fosforylace, sumoylace a ubikvitinace (Ženata *et Vrzal*, 2017).

Fosforylace VDR umožňuje jak zvýšení, tak snížení transkripční aktivity v závislosti na serinovém residuu, na které se připojuje fosfátový zbytek. Například fosforylací serinu 208 a 222 je možné zvýšit transkripční aktivitu VDR, což je zprostředkováno kinázou ATM (ataxia telangiectasia) (Ting *et al.*, 2012). Kasein kináza II rovněž umožňuje zvýšení transkripční aktivity, a to fosforylací serinu 208 (Jurutka *et al.*, 1993). Naopak snížení transkripční aktivity je realizováno fosforylací serinu 51 proteinkinázou C- β (Hsieh *et al.*, 1991) či skrz proteinkinázu A fosforylací serinu 182 (Hsieh *et al.*, 2004). Jinou možnou posttranslační modifikací VDR je sumoylace. Lee *et al.* (2014) prokázali sumoylaci lysinu 91, důsledkem je snížení transkripční aktivity VDR. Rovněž byla zjištěna ubikvitinace VDR, jež může za nasměrování receptoru k degradaci v proteazomu (Chi *et al.*, 2009; Peleg *et Nguyen*, 2010), lysinový zbytek zodpovědný za tuto modifikaci však dosud nebyl spolehlivě identifikován (Ženata *et Vrzal*, 2017).

Mimo genomické účinky může VDR zprostředkovávat i rychlé účinky, které nesouvisejí s transkripcí genů – v porovnání s genomickými účinky, které jsou realizovány v řádu hodin až dnů, negenomické účinky fungují v řádu jednotek až desítek minut (Haussler *et al.*, 2011b). Rychlé odpovědi se přisuzují VDR umístěnému mimo jádro buňky, ve vchlípeninách plazmatické membrány, tzv. kaveolách (Huhtakangas *et al.*, 2004). Membránové formy byly popsány i u jiných jaderných a steroidních receptorů, takže VDR není v tomto směru výjimkou (Pietras *et al.*, 2001; Norman *et al.*, 2004). Bravo *et al.* (2006) dokázali, že se nejedná o jiný receptor, než který umožňuje transkripci genů. Přesto i jinému receptoru, 1,25(OH)₂D₃ membrane-associated rapid response binding proteinu (1,25D₃-MARRS), se přisuzuje schopnost vázat a realizovat své účinky prostřednictvím 1 α ,25-dihydroxyvitamínu D (Nemere *et al.*, 2004).

Rychlé odpovědi spojené s negenomickými účinky VDR byly prokázány pouze v hrstce případů. Poprvé byly popsány na rychlé absorpci Ca²⁺ v kuřecím střevě, tzv. transkaltachii (Norman *et al.*, 1997). Dále lze uvést modulaci napěťově řízených Cl⁻ a Ca²⁺ kanálů v osteoblastech (Zanello *et Norman*, 2004) a Cl⁻ kanálů v Sertoliho buňkách (Menegaz *et al.*, 2010). Rychlé odpovědi VDR

jsou spojovány také se zvýšenou sekrecí inzulínu β -buňkami pankreatu a zvýšeným tokem Ca^{2+} do nich (Kajikawa *et al.*, 1999) a migrací buněk hladkého svalstva (Rebsamen *et al.*, 2002).

3.1.2. Vitamín D

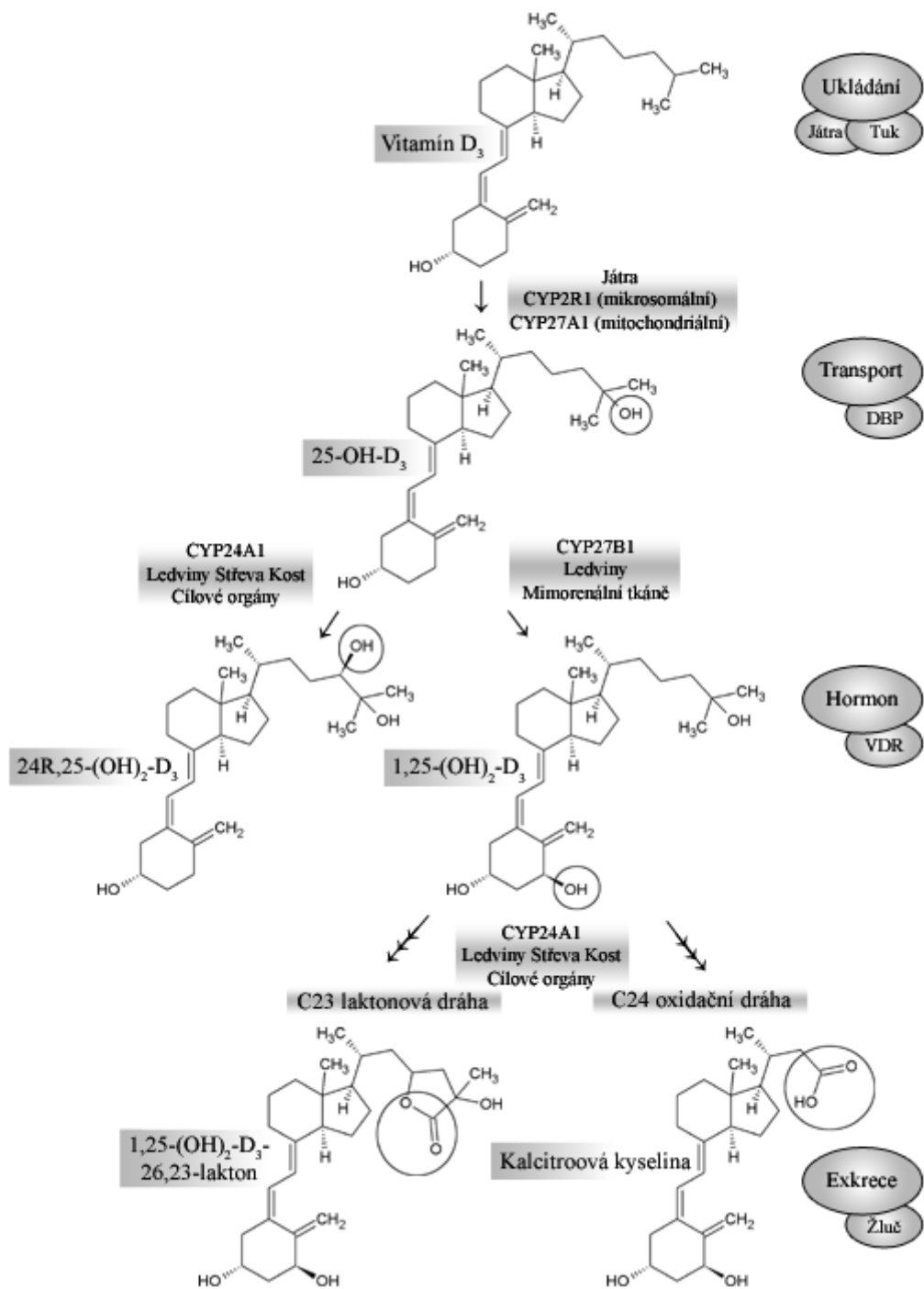
Přirozeným ligandem VDR je $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamín D, který se tvoří metabolickou přeměnou z vitamínu D. Ten může vznikat buď endogenně přeměnou prekursoru v kůži, nebo být přijímán potravou ve formě vitamínu D_3 (cholecalciferol) či D_2 (ergocalciferol).

Vitamín D_3 se nachází zejména v potravě z živočišných zdrojů. Nejvyšší obsah lze detekovat v rybách, přičemž nejhojněji se vyskytuje v játrech. Obecně se ve vnitřnostech nachází více než $10\times$ vyšší obsah vitamínu D_3 než ve svalovině, a množství se liší druh od druhu a od tkáně. Vitamín D_3 je dále obsažen i ve žloutku. Mléko a mléčné produkty jsou rovněž zdrojem vitamínu D_3 , jedná se ovšem o produkty obohacené (fortifikované), jinak je obsah vitamínu D_3 v těchto potravinách nízký. Vitamín D_2 je také přijímán v jídelníčku, pro tvorbu 25-hydroxyvitamínu D je však upřednostňován vitamín D_3 (Schmid *et Walther*, 2013). Vitamín D_2 pochází zejména z hub, přičemž obsah vitamínu D_2 v nich je ovlivněn UV zářením (Liu, 2012).

V kůži vychází syntéza z 7-dehydrocholesterolu (provitamínu D_3). Působením UV záření dochází k jeho izomerizaci na previtamín D_3 . Neenzymatickou cestou termální izomerizace se pak tvoří vitamín D_3 , který vstupuje do krevního oběhu, kde je přenášen ve vazbě na vitamín D vázající protein (DBP). V játrech se vitamín D hydroxyluje na 25-hydroxyvitamín D působením enzymů s vitamín D 25-hydroxylázovou aktivitou, z nichž mikrosomální cytochrom CYP2R1 je považován za fyziologicky nejvýznamnější, ačkoliv je možná účast také mitochondriálního CYP27A1 či 2D25 (Christakos *et al.*, 2016).

Z jater je 25-hydroxyvitamín D (kalcifediol) transportován do ledvin, kde transmembránový protein megalin zprostředkovává endocytózu 25-hydroxyvitamínu D vázaného na DBP. 25-hydroxyvitamín D je pak v buňkách proximálního tubulu hydroxylován mitochondriálním CYP27B1 na $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamín D (kalcitriol), biologicky aktivní formu vitamínu D, která je krví přenášena k cílovým tkáním. Ledvina tak slouží jako endokrinní orgán (Christakos *et al.*, 2016).

Inaktivaci kalcitriolu po realizaci svých biologických účinků zajišťuje 24-hydroxyláza CYP24A1, která je exprimována ve všech tkáních s expresí VDR. Produkt reakce, $1\alpha,24,25$ -trihydroxyvitamín D, je $10\times$ méně aktivní než kalcitriol. CYP24A1 je také zodpovědný za celkovou degradaci kalcitriolu pětikrokovou, tzv. C24 oxidační dráhou degradace kalcitriolu, která se děje štěpením postranního řetězce molekuly na kyselinu kalcitroovou, jež se vylučuje žlučí. Alternativní cesta degradace hormonu je možná i C23 hydroxylační dráhou, kdy dochází k vytvoření laktonu z postranního řetězce, konečným produktem je pak $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamín D-26,23-lakton (St. Arnaud, 2011). Metabolismus vitamínu D je shrnut v **obrázku 1**.



Obrázek 1: Metabolismus vitamínu D. Vitamín D₃ je hydroxylován v pozici C25 pomocí CYP2R1 či CYP27A1 na 25-hydroxyvitamín D₃ (25-OH-D₃), který je krví přenášen ve vazbě na vitamín D vázající protein (DBP). 25-hydroxyvitamín D₃ může být dále hydroxylován buď v pozici C24 enzymem CYP24A1 na neaktivní 24R,25-dihydroxyvitamín D₃ (24R,25-(OH)₂-D₃), nebo pomocí CYP27B1 na hormonální formu vitamínu D 1α,25-dihydroxyvitamín D₃ (1,25-(OH)₂-D₃), která své biologické účinky realizuje skrz receptor pro vitamín D (VDR). Tato forma je následně inaktivována sérií reakcí katalyzovaných pomocí CYP24A1, které ústí ve vytvoření dvou možných konečných produktů – kalcitriové kyseliny (výsledek tzv. C24 oxidační dráhy), která je vylučována žlučí, nebo 1α,25-dihydroxyvitamín D-26,23-laktonu (1,25-(OH)₂-D₃-26,23-lakton, výsledek tzv. C23 laktonové dráhy). Překresleno podle Jones *et al.*, 2013.

Jako marker statutu vitamínu D se používá hladina 25-hydroxyvitamínu D v krvi (Holick, 2009). Názory na optimální hladinu této látky v krvi se různí. Organizace Institute of Medicine (IOM) definuje deficienci 25-hydroxyvitamínu D jako sérovou hladinu $< 20 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ ($50 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$), normální hladinu jako $\geq 20 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ a nadbytek jako $> 50 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ ($125 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$) (Ross *et al.*, 2011). Alternativní doporučení pochází od Endocrine Society, kdy je koncentrace $< 20 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ ($50 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$) považována za deficientní, jelikož hrozí riziko vzniku osteomalacie nebo křivice, rozmezí $20\text{--}30 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ ($75 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$) je považováno za nedostatečné a hodnoty $\geq 30 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ za optimální, jelikož se snižuje riziko vzniku nádorových onemocnění, autoimunitních chorob, diabetu II. typu, kardiovaskulárních chorob a infekčních nemocí (Holick *et al.*, 2011).

Na základě metaanalýzy 394 studií bylo zjištěno, že globální průměr sérové koncentrace 25-hydroxyvitamínu D je asi $54 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$, což je vyhovující hodnota dle doporučení IOM, ale nedostatečná dle doporučení Endocrine Society. Zároveň jen v 19,6 % případů byla průměrná hladina vyšší než doporučovaných $75 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$, a vyšší než $100 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ byla u pouhých 4,2 % (Hagenau *et al.*, 2009). Jiná studie, zaměřená na Evropu, ukázala, že hodnoty nižší než $30 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ se vyskytují u 13 % populace, menší než $50 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ jsou u 40,4 % (Cashman *et al.*, 2016). Z celosvětového hlediska jsou hodnoty 25-hydroxyvitamínu D nejnižší na Blízkém a Středním východě, v zemích jako je Mongolsko nebo Indie je častý výskyt křivice z nedostatku vitamínu D. Rizikovými skupinami jsou adolescenti a senioři, zvláště ti v ústavní péči (Lips, 2010).

3.1.3. Ostatní ligandy VDR

Mimo $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamínu D byla zjištěna schopnost aktivace VDR i u jiných lipofilních látek. Tito agonisté mají nižší afinitu k VDR než přirozený ligand, mohou ale být lokálně významné (Haussler *et al.*, 2008).

První látkou, u které se prokázala aktivace VDR včetně biologických účinků, byla kyselina litocholová (LCA) a její metabolit 3-keto-LCA. LCA je sekundární žlučová kyselina s hepatotoxickými, mutagenními a potenciálně karcinogenními účinky, která se vyskytuje v tlustém střevě, VDR se tak může podílet na její detoxikaci (Makishima *et al.*, 2002). LCA má asi o čtyři řády nižší afinitu k VDR než kalcitriol (Haussler *et al.*, 2008).

Agonistické účinky jsou připisovány i některým složkám rostlin – kurkumin, polyfenol obsažený v kari s protinádorovými účinky, rovněž aktivuje VDR (Bartik *et al.*, 2010; Jurutka *et al.*, 2007) a podobný efekt byl zaznamenán i u dalších kurkuminoidů (Masoumi *et al.*, 2009). Schopnost aktivace VDR byla popsána i u některých esenciálních polynenasycených mastných kyselin – dokosahexaenové a arachidonové (Jurutka *et al.*, 2007) a u derivátu vitamínu E, γ -tokotrienolu (Haussler *et al.*, 2008).

Nakonec mezi ligandy VDR patří také terapeuticky využívané analogy vitamínu D pro léčbu sekundárního hyperparathyroidismu (parikalciol, doxerkalciferol, maxakalcitol a falekalcitriol), osteoporózy (eldekalcitol a alfakalcidol) či psoriázy (kalcipotriol a takalcitol) (Christakos *et al.*, 2016).

3.1.4. Cílové geny

Cílové geny VDR primárně souvisejí s kostním metabolismem – účastní se absorpce vápníku a fosforu a remodelace kostí. Jiné mají funkci i v detoxikaci endogenních i cizorodých látek, regulují diferenciaci a proliferaci nebo mají roli v imunitním systému.

Kost se skládá z anorganické složky, kde největší roli hraje hydroxyapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (Fujisawa *et al.*, 2012). Organická složka kosti je z 90% tvořená kolagenem, zbývajících 10 % tvoří nekolagenní proteiny, z nichž nejvíce zastoupený je osteokalcin (Neve *et al.*, 2013). Osteokalcin (OCN), produkt genu *BGLAP* (bone γ -carboxyglutamate protein), patří mezi cílové geny VDR. VDR jednak způsobuje zvýšení transkripce (Kerner *et al.*, 1989; Lian *et al.*, 1997), jednak má podíl také na stabilizaci vzniklé mRNA (Mosavin *et al.*, 1996). OCN je malý, vitamín K-dependentní protein specifický pro osteoblasty a odontoblasty (Fujisawa *et al.*, 2012). Translací mRNA vzniká prepromolekula, ze které se odštěpuje signální sekvence. Pro vznik finálního OCN se protein karboxyluje – karboxylace je vitální pro vazbu Ca^{2+} (Neve *et al.*, 2013). OCN váže hydroxyapatit a inhibuje tak tvorbu jeho krystalů (Price *et al.*, 1976). Podílí se rovněž na regulaci tvorby matrix (Fujisawa *et al.*, 2012). OCN má také funkci hormonu regulujícího glukózový metabolismus (Lee *et al.*, 2007).

Pod regulaci VDR spadá též osteopontin (OPN), produkt genu *SPP1* (secreted phosphoprotein 1), jehož transkripce se působením VDR zvyšuje (Noda *et al.*, 1990). VDR se zároveň účastní i regulace fosforylace tohoto proteinu (Safran *et al.*, 1998). OPN náleží do rodiny small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs). Pro OPN je charakteristické velké množství posttranslačních modifikací – fosforylace, glykosylace a sulfatace (Sodek *et al.*, 2000). OPN nese sekvenci aminokyselin Arg-Gly-Asp (tzv. RGD sekvenci) pro vazbu některých integrinů a umožňuje tak připojení osteoklastů ke kostní matrix a tím i resorpci kostí (Fujisawa *et al.*, 2012). Brání také mineralizaci kostí vazbou na hydroxyapatitové krystaly (Steitz *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 1996), přičemž fosforylace je klíčová pro schopnost inhibice růstu krystalů (Gericke *et al.*, 2005). Mimo funkcí v kostní matrix má i mnoho jiných významů – účastní se tvorby močových kamenů, důležitý je pro tvorbu hladkého svalstva cév a exprimován je také v buňkách imunitního systému při patologických stavech (Kazanecki *et al.*, 2007). Má také významnou roli v nádorové transformaci buněk (Gimba *et al.*, 2013).

Cílovým genem VDR je též RANKL (Kim *et al.*, 2006; 2007). RANKL (receptor activator of nuclear factor κB ligand) byl nejprve popsán na T-lymfocytech, funkce v kostním metabolismu byla zaznamenána až později (Anderson *et al.*, 1997). RANKL je společně s růstovým hormonem pro makrofágy (M-CSF, macrophage colony-stimulating factor) klíčovým faktorem pro diferenciaci osteoklastů (Nakagawa *et al.*, 1998). Existují dva receptory pro RANKL – RANK (Anderson *et al.*, 1997), který se vazbou svého ligandu podílí na diferenciaci osteoklastů (Nakagawa *et al.*, 1998), a osteoprotegerin (OPG), který slouží jako solubilní falešný receptor pro RANKL tím, že váže a tak

inaktivuje RANKL, čímž napomáhá regulaci resorpce kosti (Tsuda *et al.*, 1997; Simonet *et al.*, 1997). Hodnoty RANKL a OPN v krvi se proto někdy používají jako marker kostních onemocnění (Rogers *et al.*, 2005; Hofbauer, 2004). Mimo kostního metabolismu se RANKL účastní také vývoje lymfatických uzlin a mléčných žláz nebo regulace horečky (Sigl *et al.*, 2014).

Pod regulaci VDR spadají též některé enzymy spojené s detoxikací cizorodých látek, jako je CYP3A4 (Thummel *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2002) a SULT2A1 (Echchgadda *et al.*, 2004). Dále jsou mu přisuzovány také CYP2B6 a 2C9 (Drocourt *et al.*, 2002). Kromě enzymů detoxikace xenobiotik je cílem i CYP24A1, takže se VDR podílí na inaktivaci vlastního ligandu (Ohyama *et al.*, 1994; Zierold *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 1997). VDR ovlivňuje expresi některých regulátorů buněčného cyklu – transkripčního faktoru FOXO1 (forkhead box O1) nebo tumorsupresorových genů p53 a p21. Zároveň ovlivňuje imunitní systém indukcí cathelicidinu, jež souvisí s vrozenou imunitou, či represí interleukinu-17, cyklooxygenázy 2 nebo nuclear factor κ B (Haussler *et al.*, 2011b).

3.2. Kofein

Kofein (1,5,7-trimethylxanthin) je přirozeně se vyskytující alkaloid známý svými povzbuzujícími účinky. Je obsažen v kávě a v čaji, dále pak v kolových či energetických nápojích, malá množství se vyskytují také v čokoládě. Kofein je se společně s příbuznými alkaloidy theobrominem a theofylinem nachází v řadě rostlin z rodu kávovník (*Coffea* spp.) – ekonomicky nejvýznamnější jsou kávovník arabský (*Coffea arabica*) a kávovník statný (*C. canephora*). Důležitým zdrojem kofeinu je také rod kamélie (*Camellia* spp.), kde hlavním zástupcem je čajovník čínský (*Camellia sinensis*). Mezi další, méně významné zdroje patří kakaovník pravý (*Theobroma cacao*), kola zašpičatělá (*Cola acuminata*), paulinie nápojná (*Paullinia cupana*), jejíž semena jsou známá pod názvem guarana, a cesmína paraguayská (*Ilex paraguariensis*), která se využívá k přípravě čaje maté (Ashihara *et* Suzuki, 2004).

Průměrný denní příjem kofeinu je v současnosti 186 mg na den, přičemž 98 % je přijato nápoji, z toho 64 % činí káva, 16 % čaj a 18 % nealkoholické nápoje (Fulgoni *et al.*, 2015). Hodnoty se však liší regionálně dle místních zvyklostí, proto konzumace může dosahovat i 390 mg na den, jako je tomu v případě Dánska (Fredholm *et al.*, 1999).

Obsah kofeinu v kávě je závislý na způsobu přípravy. Espresso obsahuje nejvíce kofeinu – ve 240 ml šálku je obsaženo 320 mg kofeinu, přičemž množství může dosahovat hodnot 240–720 mg. Překapávaná káva obsahuje ve stejném objemu průměrně 133 mg (rozsah 102–200 mg), instantní 93 mg (rozsah 27–173 mg). Malé množství se vyskytuje i v kávě bez kofeinu – průměrně 5 mg ve 240 ml (Heckman *et al.*, 2010).

Obsah kofeinu v čaji, podobně jako u kávy, závisí na více faktorech, například se zvyšuje s délkou louhování (Chin *et al.*, 2008). Množství kofeinu ve výluhu se odvíjí i od teploty vody, kterou byl čaj spařený – nejvíce kofeinu se uvolní při použití vroucí vody. S ohledem na typ čaje je nejvyšší obsah v bílém čaji – $335 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$. V čaji Oolong je obsaženo $316 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$, v zeleném čaji $309 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$, nejmenší obsah je v černém čaji – $294 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ (Horžic *et al.*, 2009).

Obsah kofeinu v některých komerčně dostupných výrobcích je uveden v **tabulce 1**.

Ačkoliv je užívání kofeinu spojeno především s lidskou stravou, je tato látka obsažena i v některých léčivech. Kofein se mimo jiné používá jako adjuvantní látka v kombinaci s analgetiky, jako je kyselina acetylsalicylová, ibuprofen či paracetamol, jelikož zlepšuje analgetický účinek (Derry *et al.*, 2014). Dále je indikován v případech apnoe u nedonošenců (Kreutzer *et* Bassler, 2014).

Tabulka 1: Obsah kofeinu ve vybraných komerčně dostupných nápojích a volně dostupných lécích

Výrobek	Dávka	Množství kofeinu	Zdroj
Káva			
Starbucks Frappuchino Mocha	285 ml	71,8 mg	McCusker <i>et al.</i> , 2006
Starbucks Doubleshot	195 ml	105,7 mg	
Nealkoholické nápoje			
Coca Cola	360 ml	29,5 mg	McCusker <i>et al.</i> , 2006
Pepsi	360 ml	31,7 mg	
Mountain Dew	360 ml	45,4 mg	
Energetické nápoje			
Red Bull	250 ml	80 mg	Liotta <i>et al.</i> , 2012
Semtex	250 ml	78 mg	
Shock	500 ml	144 mg	
Čaj			
Nestea Cool Lemon Iced Tea	360 ml	11,5 mg	McCusker <i>et al.</i> , 2006
Lipton Brisk Lemon Iced Tea	360 ml	6,5 mg	
Volně prodejné léky			
Ataralgin	tableta	70 mg	Grundmann, 2001
Coldrex	tableta	25 mg	

3.2.1. Farmakokinetika

Farmakokinetika odpovídá jednokompartmentovému modelu. Pro kofein je charakteristická nelineární, na dávce nezávislá farmakokinetika ve fyziologických dávkách ($2\text{--}10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$), při vyšších dávkách se kinetika mění na lineární (Arnaud, 2011).

Kofein se z gastrointestinálního traktu vstřebává úplně, bez významnějšího efektu prvního průchodu játry (first-pass effect). Za pětinu absorpce je zodpovědný žaludek, zbytek je vstřebán v tenkém střevě. 99 % dávky se obvykle vstřebá do 45 minut, rychlost absorpce ale může záviset na potravině či nápoji, ve kterém je kofein obsažen – z kolových nápojů a čokolády je vstřebání opožděné (Arnaud, 2011). Kofein se na plazmatické proteiny váže z asi 35 % (Blanchard, 1982). Detekovat jej lze ve všech tělních tekutinách i tkáních, nemá ale tendenci se v orgánech akumulovat. Volně prochází hematoencefalickou bariérou i placentou (Arnaud, 2011). Distribuční objem se pohybuje v rozmezí $0,5\text{--}0,8 \text{ litrů} \times \text{kg}^{-1}$ (Arnaud, 1987; Cheng *et al.*, 1990).

Kofein je v těle metabolizován téměř kompletně. Společně s jeho primárními metabolity podléhá reabsorpci v ledvinách, proto se méně než 2 % kofeinu vyloučí močí nezměněny (Arnaud, 2011). CYP1A2, přítomný v játrech, zajišťuje 95 % veškerých přeměn primárního metabolismu kofeinu. První krok se děje demethylací molekuly. Majoritním metabolitem (asi 70% podíl) je paraxanthin (1,7-dimethylxanthin), který vzniká N-3-demethylací kofeinu. Ze 7–8 % se pak tvoří

N-4-demethylací theobromin (3,7-dimethylxanthin) a přibližně stejné procento připadá na N-7-demethylaci na theofylin (1,5-dimethylxanthin). Zbývajících asi 15 % kofeinu je hydroxylováno v pozici C8 na 1,3,7-trimethylmočovou kyselinu. Menší měrou se těchto přeměn mohou účastnit také CYP2E1 (přeměna na theobromin, theofylin a 1,3,7-trimethylmočovou kyselinu), CYP3A4, 2C8 a 2C9 (přeměna na theofylin a 1,3,7-trimethylmočovou kyselinu) (Thorn *et al.*, 2012).

Sekundárního metabolismu kofeinu se mimo CYP1A2 účastní také CYP2A6, N-acetyltransferáza 2 a xanthin dehydrogenáza. Paraxanthin se dále metabolizuje pomocí CYP1A2 a 2A6 na 1,7-dimethylmočovou kyselinu nebo N-acetyltransferázou 2 na 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil. Možná je též přeměna paraxanthinu na 1-methyluracil, který může být xanthin dehydrogenázou přeměněn na 1-methylmočovou kyselinu. Podobně může být enzymem CYP1A2 na 1-methylxanthin přeměněn theofylin. V moči se pak vylučují 1-methylxanthin, 1-methylmočová kyselina, 5-acetylamino-6-formyl-amino-3-methyluracil a 1,7-dimethylmočová kyselina (Thorn *et al.*, 2012).

Pro clearance je charakteristická značná interindividuální variabilita, která je dána genetickými a environmentálními faktory. Převažuje vylučování ledvinami, stolicí se vylučuje pouze 2–5 % dávky. Clearance může být ovlivněná přítomností jídla v žaludku. Poločas je obvykle 2,5–5 h, může ale dosáhnout až 2,3–9,9 h, což je dáno značnou interindividuální variabilitou (Arnaud, 2011).

Rozmezí účinků kofeinu je 10–100 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ (Francis *et al.*, 2011) a spodní hranice může být i nižší než 10 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ (Daly *et al.*, 1994). Koncentrace kofeinu v krvi se odvíjí od přijatého množství i od formy přijetí. 180 ml rozpustné kávy s obsahem 96,34 mg kofeinu dává maximální plazmatickou koncentraci 2,47 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (12,72 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$), této hodnoty bylo dosaženo v průměru po 26 min (Teekachunhatean *et al.*, 2013). Směs rozpustné pražené a zelené kávy s obsahem 70,69 mg kofeinu poskytuje maximální plazmatickou koncentraci 10,50 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, a to průměrně po 72,6 min (Martínez-López *et al.*, 2014). Mumford *et al.* (1996) naměřili po požití 72 mg kofeinu formou 800 ml koly maximální plazmatickou koncentraci kofeinu 1,57 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (8,08 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) a formou 82 g čokolády koncentraci 1,5 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (7,72 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$), v obou případech bylo hodnoty dosaženo po asi 2 h. V jiné studii byla po požití 248 ml energetického nápoje odpovídající dávce 100 mg kofeinu naměřena koncentrace 1,939 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (9,99 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$), dosaženo jí bylo průměrně po 53 min (Laizure *et al.*, 2017). Je-li kofein přijímán formou tablet (v tomto případě se jedná o komerční potravinový doplněk NoDoz s obsahem 100 mg kofeinu, jež se prodává za účelem udržení bdělosti), pak je maximální plazmatické koncentrace 1,5 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (7,72 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) dosaženo po 30 minutách (Perera *et al.*, 2011).

Data ohledně plasmatických koncentrací ve vyšších dávkách jsou sporá. Požití asi 565 mg kofeinu obsaženém v litru černé kávy vedlo k naměření 4 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (20,60 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) kofeinu v krvi po 10 hodinách, přičemž počáteční koncentrace kofeinu byla odhadnuta na 16 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (82,39 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$), dle případové studie rhabdomyolýzy způsobené vysokou dávkou kofeinu (Chiang

et al., 2013). Gramové dávky kofeinu jsou toxické a bývají smrtelné, přijetí takového množství je spojováno s požitím čistého kofeinu či kofeinu formou tablet a to buď nedopatřením, či v sebevražedném pokusu. Popsány byly plasmatické koncentrace v rozmezí 33–567 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (0,17–2,92 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$), naměřené *post mortem* (Jones, 2017). Například koncentrace 237 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (1,22 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$) byla v krvi naměřena po požití 15,6 g kofeinu (Ishigaki *et al.*, 2014).

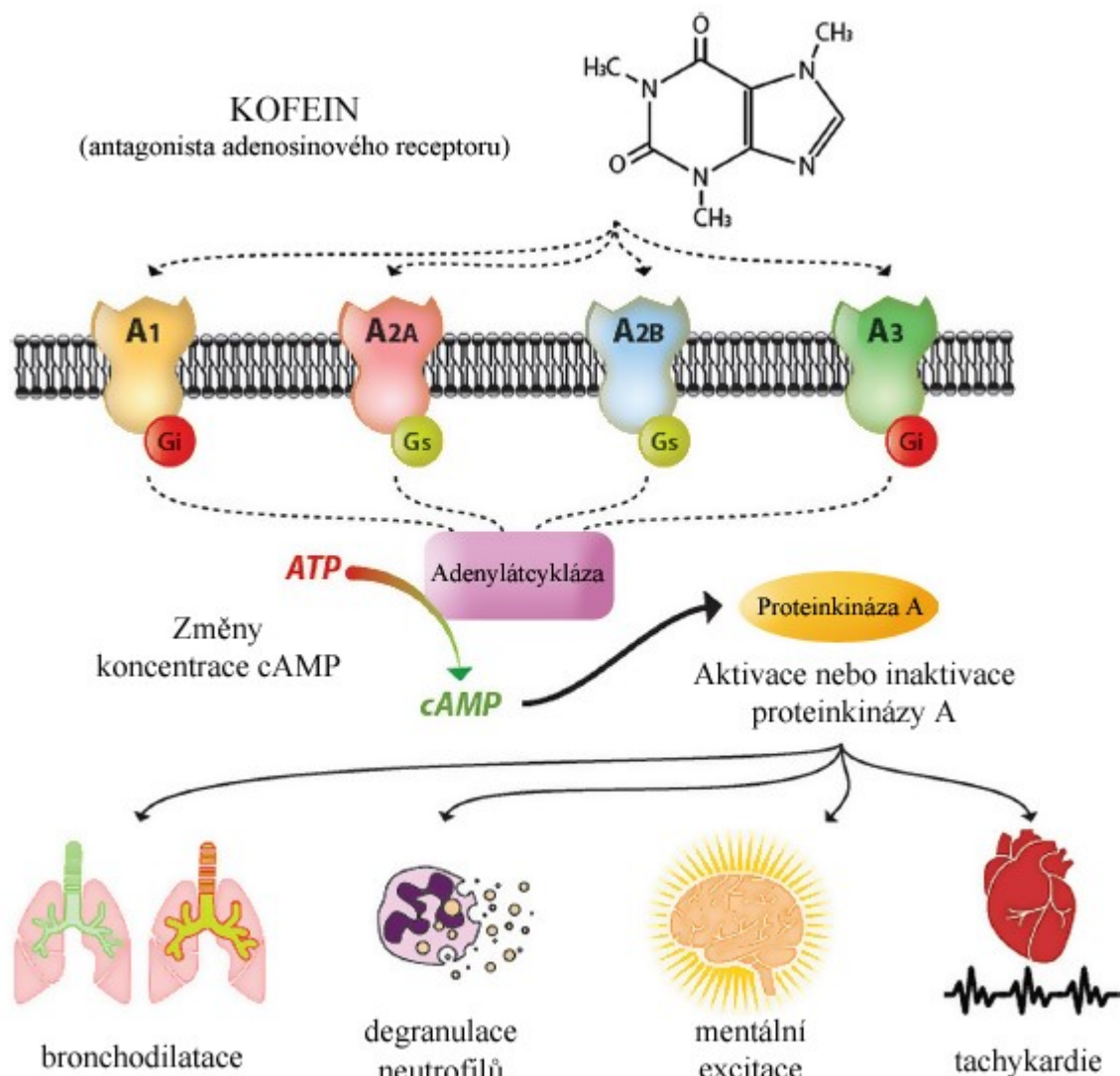
3.2.2. Farmakodynamika

Charakteristické biologické účinky kofeinu se dějí skrz blokádu adenosinových receptorů (**obrázek 2**). Ty jsou hlavním buněčným cílem kofeinu při plazmatických koncentracích, kterých lze dosáhnout jeho běžnou konzumací (Fredholm, 1979; Snyder *et al.*, 1981; Daly *et al.*, 1994). Nejcitlivější vůči kofeinu jsou receptory A_1 a A_{2A} (Fredholm *et al.*, 1999).

Adenosinové receptory jsou receptory spřažené s G-proteinem. A_1 receptor je obvykle spojený s G_i nebo G_o -proteiny, mohou tudíž inhibovat adenylátcyklázu a některé napětově řízené Ca^{2+} kanály nebo aktivovat K^+ -kanály a fosfolipázu C či D. A_1 receptory jsou umístěny ve všech částech mozku, nejvíce v hippocampu, mozkové kůře a kůře mozečku a některých thalamických jádrech. A_2 receptory jsou spřaženy se stimulačními G-proteiny, výsledkem tedy jsou protichůdné akce vůči A_1 receptorům – aktivace adenylátcyklázy a aktivace některých Ca^{2+} napětově řízených kanálů – záleží tudíž na lokaci receptoru. A_{2A} receptory jsou umístěny v částech mozku s největší koncentrací dopaminu – striatum, nucleus accumbens, tuberculum olfactorium. Inhibice A_1 receptorů má za výsledek zvýšené uvolňování neurotransmitterů a zvýšení rychlosti akčního potenciálu, inhibicí A_{2A} receptorů dochází ke zvýšení neurotransmise na dopaminových D_2 receptorech (Fredholm *et al.*, 1999).

Adenosinové receptory se mimo centrální a periferní nervovou soustavu vyskytují též v kardiovaskulárním, dýchacím, vylučovacím a gastrointestinálním systému a v tukové tkáni (Benowitz, 1990) a jsou exprimovány také v buňkách kostní dřevě, osteoblastech a osteoklastech (Mediero *et Cronstein*, 2013).

Kofein ovlivňuje i řadu jiných cílů v buňce. Koncentrace, které dané receptory či enzymy vyžadují, jsou však většinou příliš vysoké na to, aby mohly mít účinek na organismus při běžné konzumaci kofeinu (Fredholm *et al.*, 1999). Kromě účinků na adenosinové receptory má kofein bránit hydrolýze cyklického AMP inhibicí fosfodiesterázy, a to na základě stanovení aktivity fosfodiesterázy v mozku samců potkanů (Choi *et al.*, 1988). Jiná studie na potkanech ukázala, že existuje interakce mezi kofeinem a GABA receptory v mozku (Marangos *et al.*, 1979). Dalším buněčným cílem kofeinu jsou podle McPherson *et al.* (1991) také ryanodinové receptory v králičím mozku. Zaznamenána byla rovněž schopnost kofeinu inhibovat 5- α -reduktázu v lidských vlasových folikulech (Fischer *et al.*, 2007). Inhibiční efekt kofeinu byl detekován i na glycinových receptorech, a to v sítnici mloka a v buněčné linii HEK293 (Duan *et al.*, 2009). Všechny zmíněné studie studovaly účinek kofeinu na dané receptory či enzymy pouze *in vitro*.



Obrázek 2: Mechanismus účinku kofeinu. Kofein (1,5,7-trimethylxanthin) účinkuje jako antagonist adenosinových receptorů. Blokáda adenosinového receptoru způsobuje změnu v koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v buňce, jež ovlivňuje aktivitu proteinkinázy A. Výsledkem je široká škála biologických účinků – od mentálního povzbuzení přes zvýšení tepové frekvence až po bronchodilataci. Převzato ze Zulli *et al.*, 2016.

Nejvýraznější účinky má kofein na nervovou soustavu, kde působí stimulačně – povzbuzuje, zkracuje reakční dobu, zmírňuje únavu a zvyšuje bdělost, zároveň ale může narušovat spánek. Při pravidelné konzumaci kofeinu se rychle vyvíjí tolerance. Mimo tyto účinky snižuje průtok krve mozkem, také způsobuje zvýšení krevního tlaku a dechové frekvence, snížení tepové frekvence a systémové vyplavení adrenalinu, noradrenalinu a reninu. Vylučování vody a sodíku se jeho působením zvyšuje, v žaludku pak napomáhá sekreci pepsinu a žaludečních šťáv. Zvyšuje rychlost metabolismu a glykémii, rovněž zvyšuje množství volných mastných kyselin a kortizolu. Konzumace kofeinu je také spojená s možným zvýšením hladiny cholesterolu (Benowitz, 1990).

3.2.3. Kofein a vznik onemocnění

Kofein je asociován také s některými negativními účinky na organismus. Bývá spojován s vznikem kardiovaskulárních chorob, jeho vliv v tomto směru je ale sporný, neboť výsledky epidemiologických studií jsou protichůdné. Zdá se, že kofein může mít pozitivní i negativní efekt na vznik kardiovaskulárních onemocnění v souvislosti s příjmem této látky, jelikož tuto závislost je možné popsat nepřímou závislostí či U- nebo J-křivkou. Podobně nejednoznačné jsou studie spojující konzumaci kofeinu s reprodukčními riziky, jako jsou snížená plodnost, riziko potratu, růstová retardace, předčasný porod či vznik malformací – část studií vyvozuje slabou souvislost, část souvislost nezaznamenává. Výraznější efekt byl popsán pouze pro riziko potratu a vznik růstové retardace plodu (Doepker *et al.*, 2016).

Data týkající se vlivu kofeinu na zdraví kostí si také odporují – některé studie vliv kofeinu na výskyt osteoporózy či ukazatele, jako je kostní denzita nebo riziko vzniku fraktur, zamítají (Harter *et al.*, 2013; Grainge *et al.*, 1998; Cumming *et al.*, 1994), jiné ale souvislost ukázaly (Hallström *et al.*, 2006; Rapuri *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2000; Kiel *et al.*, 1990). Z dostupných dat je nicméně patrné, že kofein skutečně negativně ovlivňuje homeostázu vápníku, ač mírně, a může tím potenciálně vést k rozvinutí osteoporózy a jiných souvisejících onemocnění. Příčina je připisována zvýšenému vylučování vápníku močí a riziko se odvíjí od konzumace kofeinu v průběhu života. Přispívajícím faktorem je také příjem vápníku a větší riziko kofein představuje pro ženy (Nawrot *et al.*, 2003).

Možná role VDR v této souvislosti byla dosud jen málo studována. Jeden z výzkumů ukázal, že mezi ženami přijímajícími více než 300 mg kofeinu na den dochází k většímu úbytku kostní hmoty u účastnic nesoucích specifický polymorfismus VDR v homozygotní konstituci (Rapuri *et al.*, 2001). Rapuri *et al.* (2007) také ukázali, že v přítomnosti kofeinu dochází mimo potlačení aktivity alkalické fosfatázy v osteoblastech také ke snižování množství proteinu VDR.

Nawrot *et al.* (2003) udávají, že konzumace kofeinu je v dávkách do 400 mg na den bezpečná bez rizika toxicity nebo negativního efektu na kardiovaskulární systém, kostní metabolismus, status vápníku, plodnost, chování či vznik rakoviny. Mezi rizikové skupiny však patří děti, kde by přijatá dávka kofeinu neměla přesáhnout $2,5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti na den, a ženy v reprodukčním věku, jež by se měly vyvarovat konzumaci kofeinu vyšší než 300 mg denně.

4. Materiál a metody

4.1. Biologický materiál

Adherentní nádorové buněčné linie:

- Lidský bělošský adenokarcinom tlustého střeva LS180 (ECACC 87021202)
- Lidský bělošský osteosarkom HOS (ECACC 87070202)

Nádorové buněčné linie byly pěstovány na kultivačních lahvích o obsahu 75 cm² v kultivačním médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium s přidavkem 10 % fetálního telecího séra (FBS), 1 % roztoku neesenciálních aminokyselin a 2 mmol × l⁻¹ L-glutaminu.

Primární buněčné kultury:

- Normální lidské osteoblasty (Lonza, kat. č. CC-2538)

Osteoblasty byly pěstovány na kultivačních lahvích o obsahu 25 cm² v kultivačním médiu Osteoblast Basal Medium s přidavkem 10 % FBS, 25,5 μg × ml⁻¹ kyseliny askorbové, 30 μg × ml⁻¹ gentamicinu a 15 ng × ml⁻¹ amfotericinu B.

Všechny buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

4.2. Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie:

- 40% (w/v) roztok akrylamid/bisakrylamid (AA/BIS; 29:1) (Bio Basic, katalogové číslo 0007)
- Absolutní ethanol (Penta, kat. č. 71380-11000)
- Bradfordovo činidlo, 5× koncentrované (Serva, kat. č. 39222.03)
- Clonetics OGM BulletKit – Osteoblast Basal Medium, FBS, kyselina askorbová (25,5 mg × ml⁻¹), roztok gentamicin/amfotericin B (30 mg × ml⁻¹, 30 μg × ml⁻¹) (Lonza, kat. č. CC-3207)
- dATP (Takara, kat. č. 4026)
- dCTP (Takara, kat. č. 4028)
- Deionizovaná voda
- dGTP (Takara, kat. č. 4027)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, kat. č. D8418)
- dTTP (Takara, kat. č. 4029)
- Fetální telecí sérum (Sigma, kat. č. F6178)
- Fetální telecí sérum, charcoal-stripped (FBS-CS) (Sigma, kat. č. F6765)
- Chemiluminiscenční substrát WesternSure PREMIUM – Luminol Enhancer Solution, Stable Peroxidase Solution (LI-COR, kat. č. 926-95000)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, kat. č. C2432)
- Inhibitor fosfatáz (Roche, kat. č. 04 906 837 001)

- Inhibitor proteáz, 100× koncentrovaný (Thermo Scientific, kat. č. 78430).
- Inhibitor ribonukleáz (New England BioLabs, kat. č. M0307L)
- Isopropanol (Sigma, kat. č. I9516)
- Kalcitriol (Sigma, kat. č. D1530)
- Kofein (Sigma-Aldrich, kat. č. C0750)
- Kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, kat. č. D6546)
- L-glutamin, 100× koncentrovaný (Biosera, kat. č. XC-T1715)
- LightCycler 480 Probes Master, 2× koncentrovaný (Roche Diagnostics, kat. č. 04 887 301 001)
- Methanol (Lach-Ner, kat. č. 20038-AT0)
- Nízkotučné mléko (Laktino)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Biosera, kat. č. LM-S2041)
- Pufř do dělicího gelu, 4× koncentrovaný (Bio-Rad, kat. č. 161-0798)
- Pufř do zaostřovacího gelu, 4× koncentrovaný (Bio-Rad, kat. č. 161-0799)
- Primery (Generi Biotech):
 - *GAPDH*
 - Forward: 5' CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC 3'
 - Reverse: 5' ACGACCAAATCCGTTGACTC 3'
 - *CYP24A1*
 - Forward: 5' TCATCATGGCCATCAAAACA 3'
 - Reverse: 5' GCAGCTCGACTGGAGTGAC 3'
 - *BGLAP*
 - Forward: 5' CCAGCCCTATGGATGTGG 3'
 - Reverse: 5' TTTTCAGATTCCTCTTCTGGAGTT 3'
- Próby Universal Probe Library:
 - Próba č. 35 – *BGLAP* (Roche Diagnostics, kat. č. 04 687 655 001)
 - Próba č. 60 – *GAPDH* (Roche Diagnostics, kat. č. 04 688 589 001)
 - Próba č. 88 – *CYP24A1* (Roche Diagnostics, kat. č. 04 689 135 001)
- Próby RealTime ready Assay:
 - *CYP27B1* (Roche Diagnostics, kat. č. 114244)
 - *SPPI* (Roche Diagnostics, kat. č. 101170)
 - *TNFSF11* (Roche Diagnostics, kat. č. 144633)

- Protilátky:
 - Myší primární protilátka proti β -aktinu (Cell Signaling Technology, kat. č. 3700S)
 - Myší primární protilátka proti osteokalcinu (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-74495)
 - Myší primární protilátka proti osteopontinu (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-73631)
 - Koňská anti-myší sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou (Cell Signaling Technology, kat. č. 7076S)
- Random Primers 6 (New England BioLabs, kat. č. S1230S)
- ReagentPack Subculture Reagents – Trypsin-EDTA, Trypsin Neutralizing Solution (TNS), HEPES Buffered Saline Solution (HEPES-BSS) (Lonza, kat. č. CC-5034)
- Reakční pufr pro M-MuLV reverzní transkriptázu (New England BioLabs, kat. č. B0253S)
- M-MuLV reverzní transkriptáza (New England BioLabs, kat. č. M0253L)
- Roztok neesenciálních aminokyselin, 100× koncentrovaný (Sigma, kat. č. M7145)
- Roztok trypsin-EDTA, 0,25% (Sigma, kat. č. T4049)
- Standard molekulové hmotnosti PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, kat. č. 26616)
- Telecí sérový albumin (BSA, bovinne serum albumin) (Sigma, kat. č. A2153)
- TEMED (Bio Basic, kat. č. TB0508)
- Tris-glycinový pufr (transferový pufr), 10× koncentrovaný (Bio Basic, kat. č. A0029)
- Trisbase-glycin-SDS pufr (migrační pufr), 10× koncentrovaný (Bio Basic, kat. č. A0031)
- TriReagent (Sigma, kat. č. T9424)
- Tris Buffered Saline (TBS), 20× koncentrovaný (Thermo Scientific, kat. č. 28358)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P1379)
- Voda zbavená ribonukleáz (Sigma, W4502)

Použité roztoky:

- 0,1% (w/v) roztok Ponceau S v 5% kyselině octové
- 0,4% (w/v) roztok trypanové modři v PBS
- 10% (w/w) roztok dodecylsírany sodného (SDS)
- 10% (w/w) roztok peroxodisírany amonného (APS)
- 75% (v/v) ethanol
- Lyzační pufr (pH 7,5): 50 mmol \times l⁻¹ HEPES, 5 mmol \times l⁻¹ EDTA, 150 mmol \times l⁻¹ NaCl, 1 % Triton X-100
- Nanášecí pufr, 2× koncentrovaný (LB, loading buffer): 2,5 ml 4× pufru do zaostřovacího gelu; 4 ml 10% (w/w) SDS; 2 ml glycerolu; 2 mg bromfenolové modři; 0,31 g dithiotreitolu; doplní se deionizovanou vodou do 10 ml

- TBS-Tween: 50 ml 20× TBS; 950 ml deionizované vody; 0,5 ml Tweenu 20
- Transferový pufr: 100 ml 10× transferového pufru, 200 ml methanolu, 700 ml deionizované vody

4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- Automatická pipeta Reference 2 (Eppendorf)
- Blotovací aparatura Trans-Blot SD Cell (BioRad)
- Centrifuga 5418 R (Eppendorf)
- Centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- CO₂ inkubátor Mitre 4000 Series (Contherm)
- Elektroforetická cela Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- Kývačka MR-12 (Biosan)
- Laminární box Labculture Class II, Type A2 (Esco)
- Light Cycler 480 II (Roche)
- Mikrocentrifuga 5415 R (Eppendorf)
- Mikroskop inverzní IMT-2 (Olympus)
- Minikývačka MR-1 (Biosan)
- Multikanálová pipeta Research Plus (Eppendorf)
- Odsávačka FTA-1 (Biosan)
- Pipetovací násadec Fastpette V2 (Labnet International, Inc.)
- Skener pro chemiluminiscenční western blotting C-DiGit Blot Scanner (LI-COR)
- Sonikační lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (BANDELIN electronic)
- Spektrofotometr Infinite m200 (Tecan)
- Spektrofotometr Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- Termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02n (Major Science)
- Vodní lázeň LCB-11D (Daihan Labtech)
- Vortex Reax top (Heidolph)
- Výrobník ledu F100 Compact (Icematic)
- Zdroj napětí MP-500V (Clever Scientific Ltd.)

4.4. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1. Pasážování a vyšetí buněčných linií

Pasážování a vyšetí adherentních nádorových buněčných linií:

1. Kultivační láhev se vyjme z inkubátoru a přenese se do sterilního prostředí.
2. Odsaje se staré kultivační médium.
3. Vrstva buněk se promyje 5 ml PBS a roztok se odsaje.
4. Pro uvolnění buněk z povrchu kultivační láhve se na vrstvu buněk rovnoměrně nanese 1 ml roztoku trypsinu a láhev se na 3 min umístí do inkubátoru.
5. Po vyjmutí z inkubátoru se do stěny kultivační láhve lehce udeří rukou pro uvolnění zbytku buněk.
6. K roztoku trypsinu se přidá 9 ml DMEM s FBS-CS.
7. Buněčná suspenze se promíchá a přenese do centrifugační zkumavky.
8. Odebere se 20 μ l homogenní suspenze do mikrozkušavky a tento objem se smíchá s 80 μ l roztoku trypanové modři.
9. Obarvená suspenze se nanese po 10 μ l z každé strany Bürkerovy komůrky a provede se počítání buněk.
10. Z buněčné suspenze se odebere takový objem, aby po naředění kultivačním médiem obsahoval celkový objem roztoku (24 ml):
 - a. 1×10^6 buněk (v případě buněčné linie LS180), nebo
 - b. 5×10^5 buněk (v případě buněčné linie HOS)na každé 2 ml DMEM s FBS-CS a 1 jamku v šestijamkové destičce.
11. Naředěná suspenze se napipetuje po 2 ml do šestijamkových kultivačních desek. Desky se umístí do inkubátoru a nechají přes noc adherovat k povrchu desek.
12. Zbytek buněčné suspenze se vrátí na kultivační láhev, doplní kultivačním médiem DMEM s FBS do objemu 20 ml a umístí zpět do inkubátoru.

Pasážování a vyšetí primární kultury osteoblastů:

1. Z kultivační láhve se odstraní médium.
2. Vrstva buněk se promyje roztokem HEPES-BSS a roztok se odsaje.
3. Buňky se převrství 2 ml roztoku trypsin-EDTA.
4. Buňky se nechají uvolnit z povrchu láhve po dobu 2–6 min, poté se do stěny kultivační láhve lehce udeří rukou pro uvolnění zbytku buněk.
5. K roztoku trypsinu se přidají 4 ml roztoku TNS, roztok se promíchá a přenese do centrifugační zkumavky.
6. Kultivační láhev se vypláchne 2 ml roztoku HEPES-BSS a zbytek suspenze se přidá do centrifugační zkumavky.
7. Buněčná suspenze se centrifuguje při $220\times$ g po dobu 5 min.

8. Odsaje se většina supernatantu, pelet se uvolní poklepáním na stěnu zkumavky.
9. Buňky se resuspendují ve 2 ml kultivačního média.
10. Ze suspenze se odebere 20 μl do mikrozskumavky, k objemu se přidá 80 μl roztoku trypanové modři a po promíchání se provede počítání buněk v Bürkerově komůrce.
11. Buněčná suspenze se naředí tak, aby po naředění kultivačním médiem na celkový objem (12 ml) a nanesení do jamek na dvanáctijamkové kultivační desce obsahoval roztok 10^4 buněk v 1 ml na 1 jamku.
12. Vyšetě buňky se nechají adherovat přes noc a poté se kultivují, dokud nejsou téměř konfluentní.
13. Zbylá buněčná suspenze se vyseje na kultivační láhve v množství 125×10^3 buněk na láhev o obsahu 25 cm^2 . Doplní se 1 ml kultivačního média na každých 5 cm^2 kultivační plochy a buňky se umístí zpět do inkubátoru.

4.4.2. Treatment

Jako zásobní roztoky slouží logaritmická koncentrační řada roztoků kofeinu o koncentraci 0,1; 1; 10 a 100 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$, rozpuštěného v DMSO, a roztoky kalcitriolu o koncentraci 75 a 1 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, rozpuštěného rovněž v DMSO.

Pracovní roztoky kofeinu a kalcitriolu se 1000 \times ředí v médiu DMEM s FBS-CS (buněčné linie LS180 a HOS) či Osteoblast Growth Medium (osteoblasty) následovně:

- I. 2 ml média + 4 μl DMSO
- II. 2 ml média + 2 μl 75 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl DMSO
- III. 2 ml média + 2 μl 75 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl 0,1 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu
- IV. 2 ml média + 2 μl 75 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl 1 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu
- V. 2 ml média + 2 μl 75 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl 10 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu
- VI. 2 ml média + 2 μl 75 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl 100 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu
- VII. 2 ml média + 4 μl DMSO
- VIII. 2 ml média + 2 μl 1 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl DMSO
- IX. 2 ml média + 2 μl 1 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl 0,1 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu
- X. 2 ml média + 2 μl 1 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl 1 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu
- XI. 2 ml média + 2 μl 1 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl 10 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu
- XII. 2 ml média + 2 μl 1 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolu + 2 μl 100 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu

Tyto roztoky se nechají na buňkách inkubovat po dobu 24 h (všechny roztoky) či v případě stanovení časové závislosti po dobu 2, 4, 6 a 8 h (pouze roztoky I, II a IV, V).

4.4.3. Izolace RNA

Níže uvedený postup platí pro buňky vyšetě na šestijamkové kultivační desky, v případě vyšetě na dvanáctijamkové desky byl použit vždy poloviční objem uvedených reagensů.

1. Po uplynutí doby inkubace se z jamky odstraní kultivační médium s přídavkem kofeinu a kalcitriolu.
2. Buňky se lyzují přidáním 1 ml TriReagentu na jamku.
3. Obsah jamky se seškrábne stěrkou a poté přepipetuje do mikrozkušavek.
4. Roztok se pomocí automatické pipety důkladně zhomogenizuje a nechá se inkubovat 10 min při pokojové teplotě.
5. Přidá se po 200 μ l chloroformu a mikrozkušavkami se třepe po dobu 1 min.
6. Roztok se ponechá inkubovat 5 min při pokojové teplotě.
7. Vzorky se 15 min centrifugují při teplotě 4 °C rychlostí 13 200 otáček \times min⁻¹.
8. Po oddělení fází se 500 μ l vodné fáze přenesse do čisté mikrozkušavky.
9. RNA se precipituje přidáním 500 μ l isopropanolu, roztok se po dobu 10 s promíchá pomocí vortexu a ponechá 7 min při pokojové teplotě.
10. Roztok se centrifuguje 13 min při teplotě 4 °C rychlostí 13 200 ot. \times min⁻¹.
11. Supernatant se odstraní, zbytky kapaliny se osuší oklepáním o buničinu, pelet se promyje 1 ml chlazeného ethanolu a provede se centrifugace po dobu 5 min při 4 °C rychlostí 13 200 ot. \times min⁻¹.
12. Zopakuje se slití supernatantu, promytí a centrifugace (**bod 11**).
13. Supernatant se opět odstraní, kapalina se osuší o buničinu a pelet se nechá vysušit zahřátím v suché lázni po dobu 1 min při 65 °C.
14. Přidá se 50 μ l vody zbavené ribonukleáz a RNA se rozpustí inkubací při 65 °C po dobu 5 min, následně se roztok důkladně promíchá a zchladí v ledové tříšti.
15. Koncentrace získané RNA se stanoví pomocí spektrofotometru NanoDrop.

4.4.4. Reverzní transkripce

1. Vzorky RNA se do nových mikrozkušavek naředí tak, aby v objemu 5 μ l bylo obsaženo 1000 ng izolované RNA.
2. K naředěné RNA se přidá 1 μ l roztoku Random Primers 6 (100 pmol \times l⁻¹).
3. Mikrozkušavky se inkubují při 65 °C po dobu 5 min.
4. Po inkubaci se vzorky zchladí na ledu a poté stočí v centrifuze.
5. Připraví se reakční směs podle **tabulky 2** pro příslušný počet vzorků a napipetuje se do nich po 6 μ l.
6. Mikrozkušavky se krátce stočí v centrifuze.
7. Roztoky se inkubují při 42 °C po dobu 1 h.
8. Enzym se inaktivuje inkubací při 65 °C po dobu 10 min.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci 1 vzorku

Reagencie	Objem [μl]
Reverzní transkriptáza	0,6
Inhibitor ribonukleáz	0,3
dNTPs ($100 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$)	0,6
10× koncentrovaný reakční pufr	1,2
PCR voda	3,3
Celkem	6,0

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro Real-Time PCR 1 vzorku

Typ próby	Reagencie	Objem [μl]
UPL	Probes master, 2×	5,0
	UPL próba	0,2
	Směs forward + reverse primer (každý po $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)	0,8
	Voda	2,0
	Celkem	8,0
Real-Time Ready Assay	Probes master, 2×	5,0
	Real-Time Ready Assay	0,5
	Voda	2,5
	Celkem	8,0

9. Vzorky cDNA se krátce zchladí na ledu.
10. cDNA se 10× naředí přidáním 108 μl vody a roztok promíchá na vortexu.

4.4.5. Real-Time PCR

1. Připraví se reakční směs pro sledované geny (příslušný počet vzorků v triplikátu) v závislosti na typu použité próby (**tabulka 3**) a směs se promíchá.
2. Reakční směs se napipetuje do 96 jamkové mikrotitrační desky po 8 μl pro každý vzorek v triplikátu.
3. Vzorky cDNA se promíchají na vortexu.
4. cDNA se do jamek pipetuje k reakční směsi po 2 μl .
5. Mikrotitrační deska se přelepí folií a centrifuguje se při $1500 \text{ ot.} \times \text{min}^{-1}$ po dobu 3 min.
6. Destička se umístí do Light Cycleru s nastavením dle **tabulky 4** a nechá se probíhat PCR amplifikace.

Tabulka 4: Podmínky PCR reakce

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Pre-inkubace	95	10 min	1
Amplifikace	95	10 s	45
	60	30 s	
Ochlazení	40	30 s	1

4.4.6. Izolace proteinů, příprava vzorků pro SDS-PAGE

1. Z kultivačních desek se po uplynutí doby inkubace odstraní kultivační médium s přídavkem kofeinu a kalcitriolu.
2. Jamky se promyjí vychlazeným roztokem PBS a pufr se opět odstraní.
3. Do jamek se napipetuje po 1 ml vychlazeného PBS a buňky se důkladně seškrábou škrabkou.
4. Suspenze se přenese do mikrozkušavek.
5. Roztok se centrifuguje po dobu 2 min při 4000 ot. \times min⁻¹ a teplotě 4 °C.
6. Supernatant se odstraní.
7. Do mikrozkušavek se přidá asi 100 μ l lyzačního pufru s přídavkem inhibitorů fosfatáz a proteáz a roztok se důkladně zhomogenizuje.
8. Vzorky se znovu homogenizují na vortexu.
9. Mikrozkušavky se ponechají 2–5 min stát na ledu.
10. Proveďte se homogenizace v sonikační lázni.
11. Lyzáty se opět promíchají na vortexu.
12. Vzorky se centrifugují 13 min při 13 200 ot. \times min⁻¹ při teplotě 4 °C.
13. Supernatant se přenese do čistých mikrozkušavek.
14. Z jednotlivých vzorků se odebere 2 \times po 5 μ l do jamek 96 jamkové mikrotitrační desky.
15. Do dalších jamek se nanese stejný objem roztoků BSA (0,2; 0,4; 0,6 μ g \times ml⁻¹) v duplikátu pro vytvoření kalibrační křivky.
16. Přidá se po 20 μ l Bradfordova činidla.
17. Spektrofotometricky se změří absorbance roztoků při vlnové délce 595 nm.
18. Pomocí kalibrační závislosti se stanoví koncentrace proteinů obsažených v roztoku.
19. Do nových mikrozkušavek se vzorky naředí tak, aby ve 20 μ l bylo obsaženo 20 μ g proteinů.
20. K danému objemu se přidá po 20 μ l 2 \times LB a vzorky se promíchají.
21. Roztoky se nechají 5 min denaturovat při 95 °C a poté se prudce zchladí v ledové tříšti.

4.4.7. SDS-PAGE

1. Skla na SDS-PAGE se odmastí ethanolem, upevní do rámu a rám připevní do stojanu.
2. Připraví se směs pro dělicí gel (**tabulka 5**), roztok se promíchá a nalije mezi skla přibližně po úroveň rámu.

Tabulka 5: Složení dělicího gelu

Reagencie	Objem	
	10% gel	15% gel
40% (w/w) roztok AA/BIS (29:1)	2,50 ml	3,75 ml
Deionizovaná voda	4,90 ml	3,65 ml
4× pufr do dělicího gelu	2,50 ml	
10% (w/w) roztok SDS	100 µl	
10% (w/w) roztok APS	100 µl	
TEMED	10 µl	

Tabulka 6: Složení zaostřovacího gelu

Reagencie	Objem
40% (w/w) roztok AA/BIS (29:1)	400 µl
4× pufr do zaostřovacího gelu	1,00 ml
Deionizovaná voda	2,56 ml
10% (w/w) roztok SDS	40 µl
10% (w/w) roztok APS	30 µl
TEMED	4 µl

3. Roztok dělicího gelu se převrství isopropanolem a nechá se zatuhnout.
4. Po ztuhnutí se isopropanol odmyje deionizovanou vodou.
5. Připraví se směs pro zaostřovací gel (**tabulka 6**) a nalije se na stávající vrstvu gelu.
6. Mezi skla se vloží hřebínek a gel se nechá zatuhnout.
7. Skla s gelem se zasunou do stojanu a vloží do elektroforetické cely.
8. Prostor mezi skly se vyplní čerstvým migračním pufrem, zbytek cely se doplní pufrem použitým.
9. Z gelu se vyjme hřebínek a jamky se opatrně propláchnou čerstvým migračním pufrem.
10. Do první jamky se nanese 2 µl standardu molekulové hmotnosti.
11. Do ostatních jamek se nanese připravené vzorky po 40 µl.
12. Elektroforetická cela se uzavře a kabely se připojí ke zdroji elektrického napětí.
13. Spustí se elektroforetická separace při konstantním proudu 30 mA na jeden gel. Separace probíhá, dokud čelo téměř nedosahuje spodního okraje gelu.
14. Po ukončení elektroforetické separace se zdroj napětí se vypne, skla s gelem se vyjmou z komůrky a opatrně se od sebe oddělí lopatkou.
15. Odstraní se zaostřovací gel a zbytek gelu se přesune do transferového pufru na asi 5 min.

4.4.8. Western blotting

1. PVDF membrána se hydratuje v methanolu, vypláchne se deionizovanou vodou a umístí se do transferového pufru na kývačku.
2. Na elektrodu blotovací aparatury se navrství (zdola nahoru):
 - a. 2 filtrační papíry navlhčené transferovým pufrem,
 - b. hydratovaná membrána,
 - c. gel,
 - d. 2 filtrační papíry.Jednotlivé vrstvy poválí válečkem, aby se zamezilo vzniku bublin.
3. Přiloží se druhá elektroda a víko, aparatura se zapojí do zdroje.
4. Spustí se blotting při konstantním proudu 350 mA po dobu 90 min.
5. Po dokončení blotování se membrána ponoří na 5 min do barviva Ponceau S.
6. Nеспецифické obarvení membrány se vymyje deionizovanou vodou.
7. Membrána se odřízne v místech, která odpovídají molekulové hmotnosti stanovovaných proteinů.
8. Membrána se rehydratuje v methanolu, vypláchne se deionizovanou vodou a poté se ponoří do pufru TBS-Tween na kývačce.
9. Připraví se 5% (w/v) roztok nízkotučného mléka v TBS-Tween a 5% (w/v) roztok BSA v TBS-Tween.
10. Membrána se převrství roztokem nízkotučného mléka a nechá se blokovat po dobu 1 h při pokojové teplotě na kývačce.
11. Do roztoku BSA se napipetuje primární protilátka dle příslušného ředění (**tabulka 7**).
12. Po uplynutí příslušného času se roztok vymění za roztok BSA s protilátkou a membrána se nechá inkubovat přes noc při 4 °C na kývačce.
13. Následující den se membrána 3× promyje pufrem TBS-Tween na kývačce vždy po 5 min.
14. Připraví se 2,5% (w/v) roztok nízkotučného mléka v TBS-Tween a do něj se napipetuje sekundární protilátka v ředění 1:2000.
15. Membrána se nechá inkubovat s tímto roztokem 45 min při pokojové teplotě na kývačce.
16. Po uplynutí inkubační doby se membrána 3× promyje pufrem TBS-Tween na kývačce vždy po 5 min.

Tabulka 7: Ředění použitých primárních protilátek

Protilátka	Ředění
β -aktin	1:6000
Osteokalcin	1:100
Osteopontin	1:200

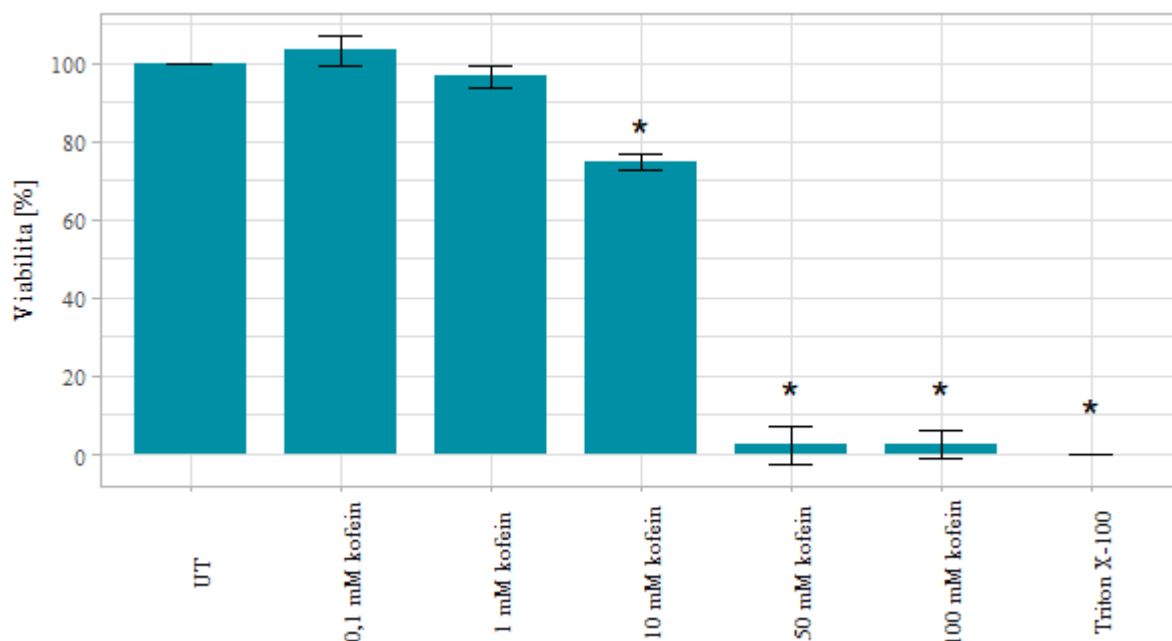
17. Chemiluminiscenční substrát a enhancer se smíchají v poměru 1:1, tímto roztokem se převrství membrána a nechá se inkubovat 5 min.
18. Zbytky roztoku na membráně se osuší o filtrační papír.
19. Proveďte se detekce proteinů v skeneru pro western blotting.

5. Výsledky

5.1. Viabilita buněk v přítomnosti kofeinu

K určení netoxických koncentrací kofeinu byla stanovena viabilita buněk v přítomnosti kofeinu pomocí metody MTT na nádorové buněčné linii LS180 odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva (**obrázek 3**). Pro test byly použity koncentrace $0,01$ – $100 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ po dobu 24 h.

Při ošetření buněk kofeinem o koncentraci $0,1$ a $1 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ neklesala životaschopnost buněk pod 90 %, při zvýšení molární koncentrace kofeinu na $10 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ už došlo k poklesu viability asi o čtvrtinu oproti negativní kontrole (UT), při dalším zvyšování koncentrace na $50 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ a $100 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ klesla viabilita buněk téměř na hodnotu pozitivní kontroly (Triton X-100).

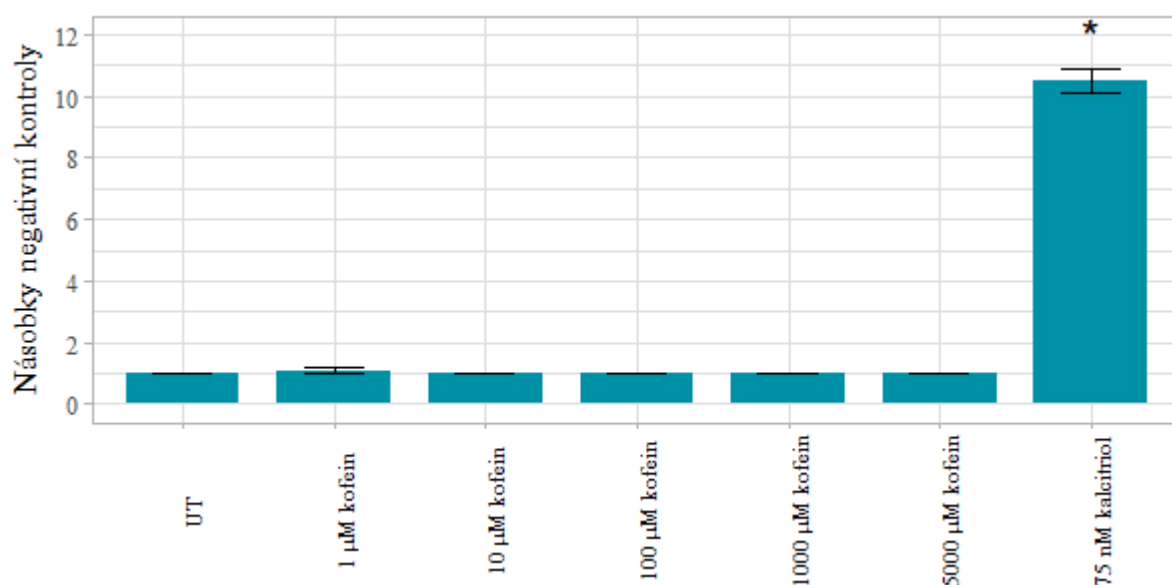


Obrázek 3: Viabilita buněčné linie LS180 po 24h inkubaci s kofeinem o koncentraci $0,1$ – $100 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$. Viabilita byla stanovena metodou MTT. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka ze 4 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. Vzorky označené (*) jsou statisticky signifikantní vůči negativní kontrole ($P < 0,05$) na základě dvouvýběrového t-testu. UT, untreated – negativní kontrola, Triton X-100 – pozitivní kontrola.

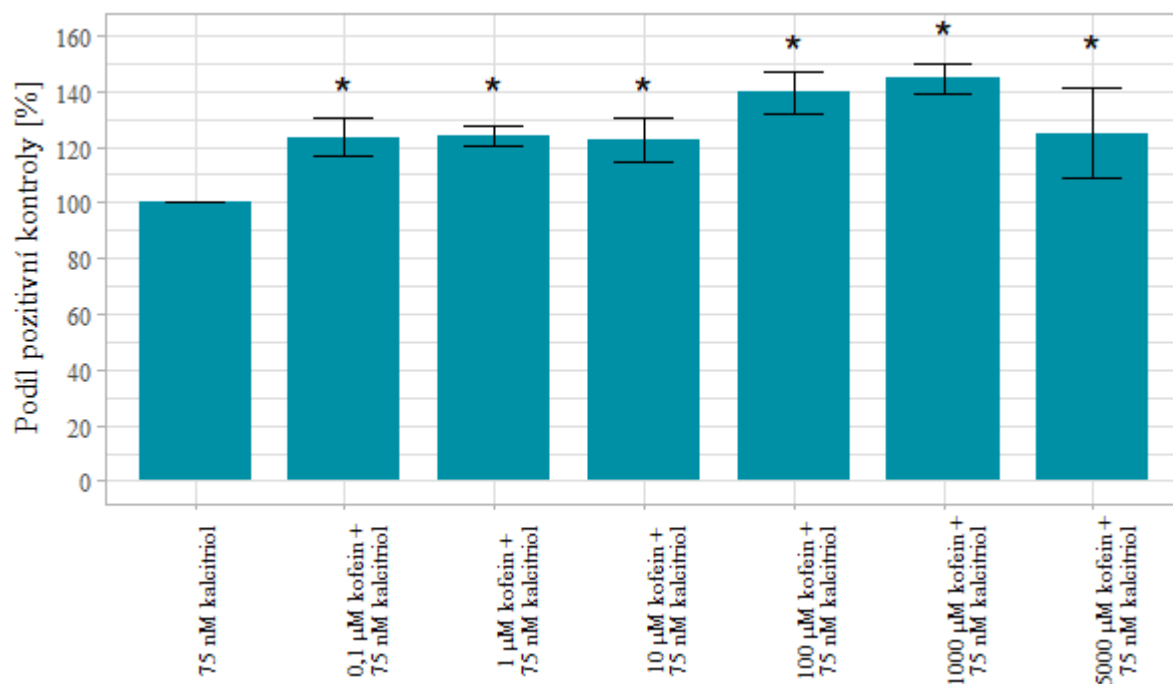
5.2. Transkripční aktivita VDR v přítomnosti kofeinu

Po vyloučení toxických koncentrací byl ke stanovení transkripční aktivity VDR v přítomnosti kofeinu v linii LS180 metodou Reporter Gene Assay použit kofein o koncentraci $0,1\text{--}5000 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ po dobu 24 h. Kofein samotný nebyl schopen aktivovat transkripci prostřednictvím VDR, jak je patrné z výsledků Reporter Gene Assay v agonistickém módu (**obrázek 4**) – u všech použitých koncentrací kofeinu byla zjištěna hodnota luminiscence odpovídající hodnotě negativní kontroly (UT), zatímco v případě kalcitriolu ($75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$, pozitivní kontrola) byly naměřené hodnoty $10\times$ vyšší.

V případě antagonistického módu Reporter Gene Assay (**obrázek 5**) byl kofein (ve výše uvedených koncentracích) koinkubován s kalcitriolem ($75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$). V tomto případě došlo ke statisticky významnému zvýšení transkripční aktivity vůči pozitivní kontrole. Koncentrace kofeinu $0,1\text{--}10 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ a $5000 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ v kombinaci s kalcitriolem způsobily zvýšení transkripce zhruba o pětinu oproti kalcitriolu samotnému, v případě $100\text{--}1000 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ kofeinu došlo ke zvýšení až o 40 %.



Obrázek 4: Transkripční aktivita VDR v přítomnosti kofeinu o koncentraci $1\text{--}5000 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ po dobu 24 h v buněčné linii LS180. Transkripční aktivita VDR byla stanovena metodou Reporter Gene Assay v agonistickém módu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů. Vzorky označené (*) jsou statisticky signifikantní vůči negativní kontrole ($P < 0,05$) na základě dvouvýběrového t-testu. UT, untreated – negativní kontrola, 75 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 5: Transkripční aktivita VDR při 24h koinkubaci kofeinu (0,1–5000 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) s kalcitriolem (75 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$) v buněčné linii LS180. Transkripční aktivita VDR byla stanovena pomocí Reporter Gene Assay v antagonistickém módu. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 8 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. Vzorčky označené (*) jsou statisticky signifikantní vůči pozitivní kontrole ($P < 0,05$) na základě dvouvýběrového t-testu. 75 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.

5.3. Genová exprese v přítomnosti kofeinu

Vliv kofeinu na indukci exprese vybraných cílových genů VDR byl zkoumán v rozmezí koncentrací $0,1\text{--}100 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, které lze považovat za fyziologicky relevantní, v koinkubaci s kalcitriolem (jakožto pozitivní kontrolou) o dvou koncentracích – $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$, jež se považuje za dostatečnou ze zdravotního hlediska, a $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$, reprezentující deficienci vitamínu D. Jako negativní kontrola (UT) slouží vzorky, kde byly buňky namísto příslušných roztoků kofeinu a kalcitriolu ošetřeny pouze rozpouštědlem (DMSO) v odpovídajícím množství. Vzorky UT byly připraveny zvlášť pro vzorky vyšší a nižší koncentrace kalcitriolu, aby bylo možné evaluovat vliv různé hladiny kalcitriolu nezávisle na sobě. V určitých případech byly hodnoty namísto negativní kontroly přepočítány na pozitivní kontrolu, a to z důvodu velkých rozdílů v míře exprese jednotlivých genů mezi experimenty.

Sledována byla exprese genů *CYP24A1*, *CYP27B1*, *BGLAP*, *SPP1* a *TNFSF11*. Expresi na úrovni RNA byla stanovována pomocí Real-Time PCR a získaná data byla normalizována na expresi glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH), exprese na úrovni proteinu byla stanovována pomocí western blottingu a data byla normalizována na expresi β -aktinu.

5.3.1. Exprese na úrovni RNA po 24 h v buněčné linii LS180

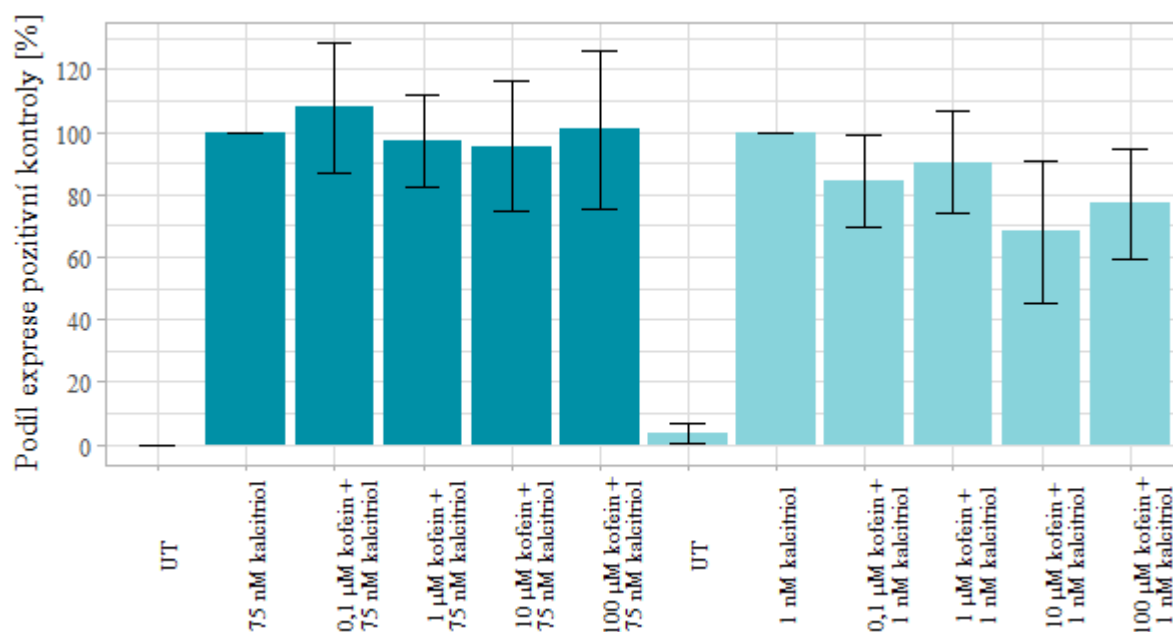
Expresi genů byla stanovována v buněčné linii LS180, na základě detekce zvýšené transkripční aktivity VDR v přítomnosti kofeinu.

CYP24A1. Ošetření kofeinem nemělo výraznější vliv na expresi mRNA *CYP24A1* v žádné z použitých koncentrací kofeinu v případě koinkubace s kalcitriolem o koncentraci $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ (**obrázek 6**). Při použití kalcitriolu o koncentraci $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ byla zaznamenána o něco výrazněji snížená exprese mRNA oproti pozitivní kontrole, a to až o třetinu v případě $10 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ kofeinu, tento pokles však nebyl statisticky významný.

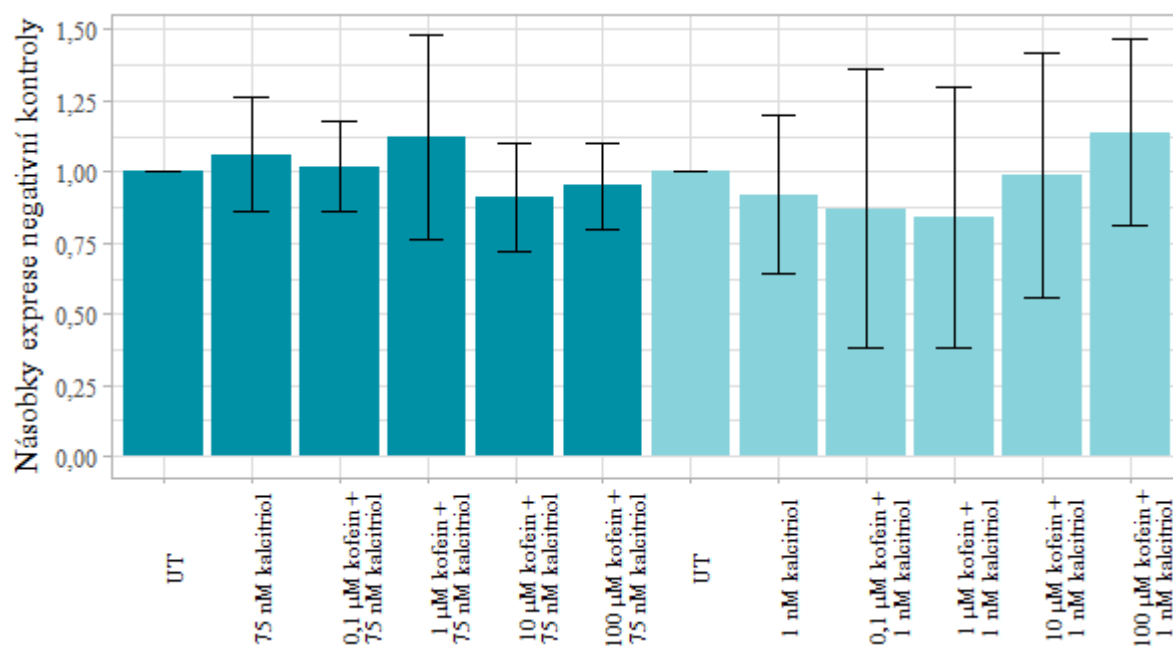
CYP27B1. Po aplikaci kofeinu bylo možné pozorovat pouze nevýznamné změny v expresi mRNA daného enzymu, a to s ohledem na obě použité koncentrace kalcitriolu (**obrázek 7**). U pozitivní kontroly, kalcitriolu, však nedošlo k očekávanému poklesu v expresi genu *CYP27B1* ani u jedné z použitých koncentrací hormonu. Regulace tohoto genu skrz VDR je zřejmě v této buněčné linii nefunkční.

BGLAP. V případě koinkubace kofeinu se $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ roztokem kalcitriolu byl pozorován mírný nárůst v množství mRNA ve všech testovaných koncentracích kofeinu oproti očekávané indukci samotným kalcitriolem (**obrázek 8**). Při nižší koncentraci kalcitriolu ($1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$) nedošlo k změně v expresi mRNA, pouze u nejvyšší koncentrace kofeinu došlo k mírnému nárůstu. Žádná ze zjištěných změn v expresi nebyla statisticky významná.

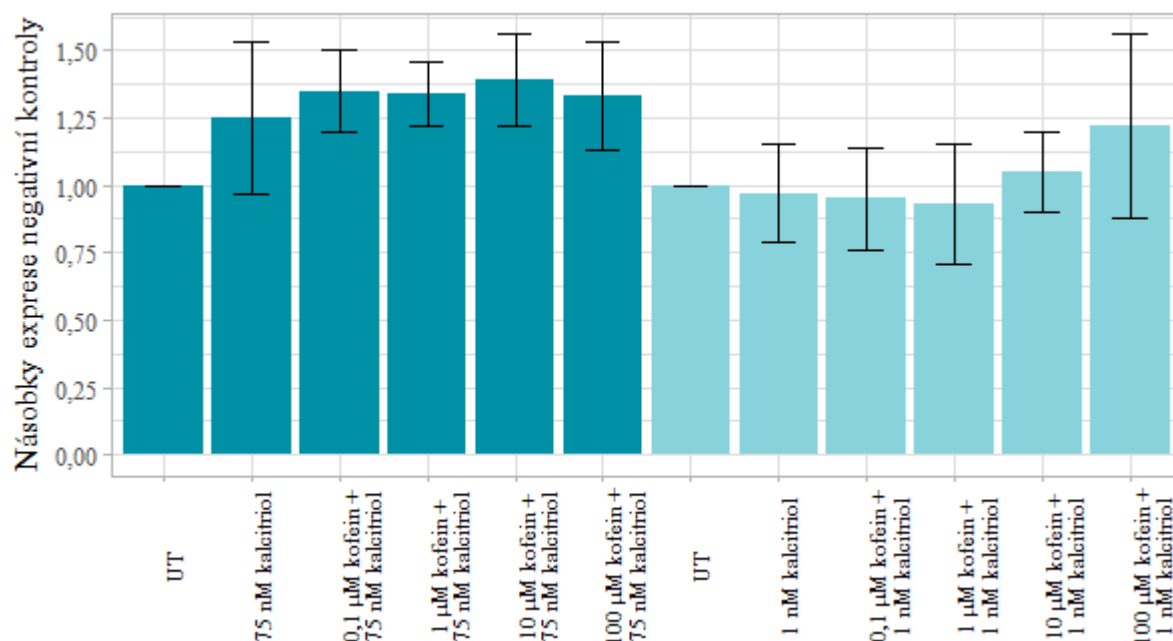
Expresi genů *SPP1* a *TNFSF11* nebyla v buněčné linii LS180 na úrovni mRNA detekována.



Obrázek 6: Expresa genu *CYP24A1* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1\ \text{nmol} \times \text{l}^{-1}$) v buněčné linii LS180. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 5 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 7: Expresa genu *CYP27B1* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1\ \text{nmol} \times \text{l}^{-1}$) v buněčné linii LS180. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 5 experimentů. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 8: Expres genu *BGLAP* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem ($75\ \text{a}\ 1\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 5 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.

5.3.2. Expres na úrovni proteinu po 24 h v buněčné linii LS180

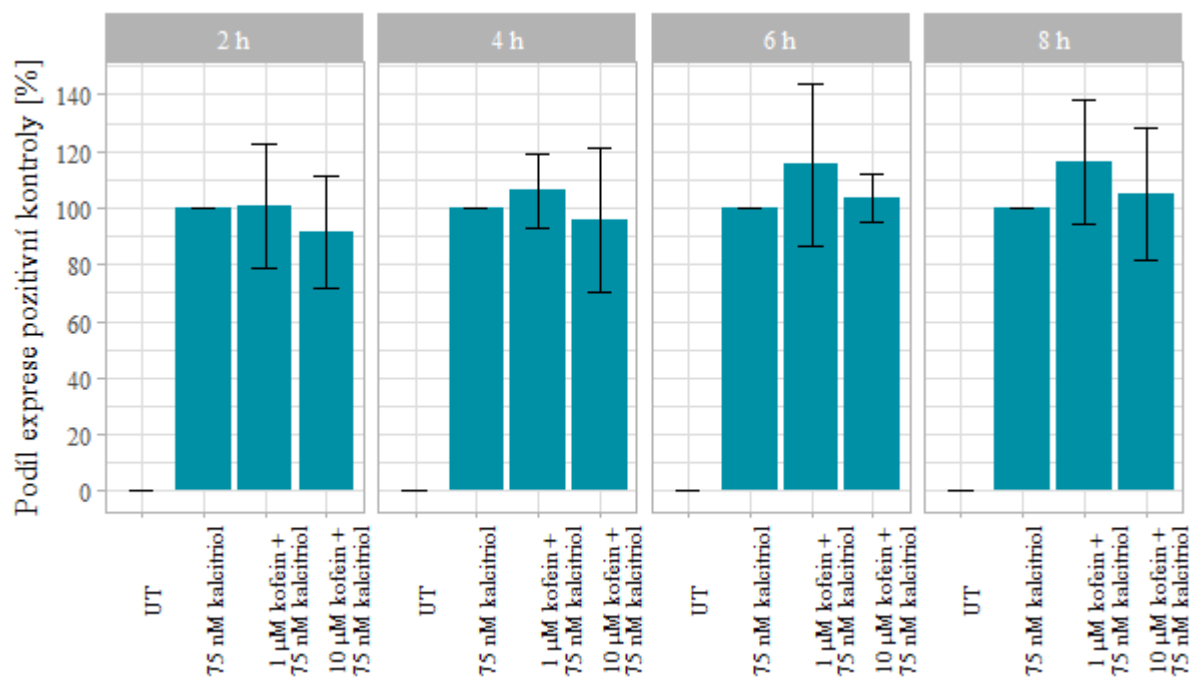
Vzhledem k absenci výraznějšího efektu na úrovni RNA nebyla expres na úrovni proteinu u žádného z genů zkoumána.

5.3.3. Časová závislost exprese na úrovni RNA v buněčné linii LS180

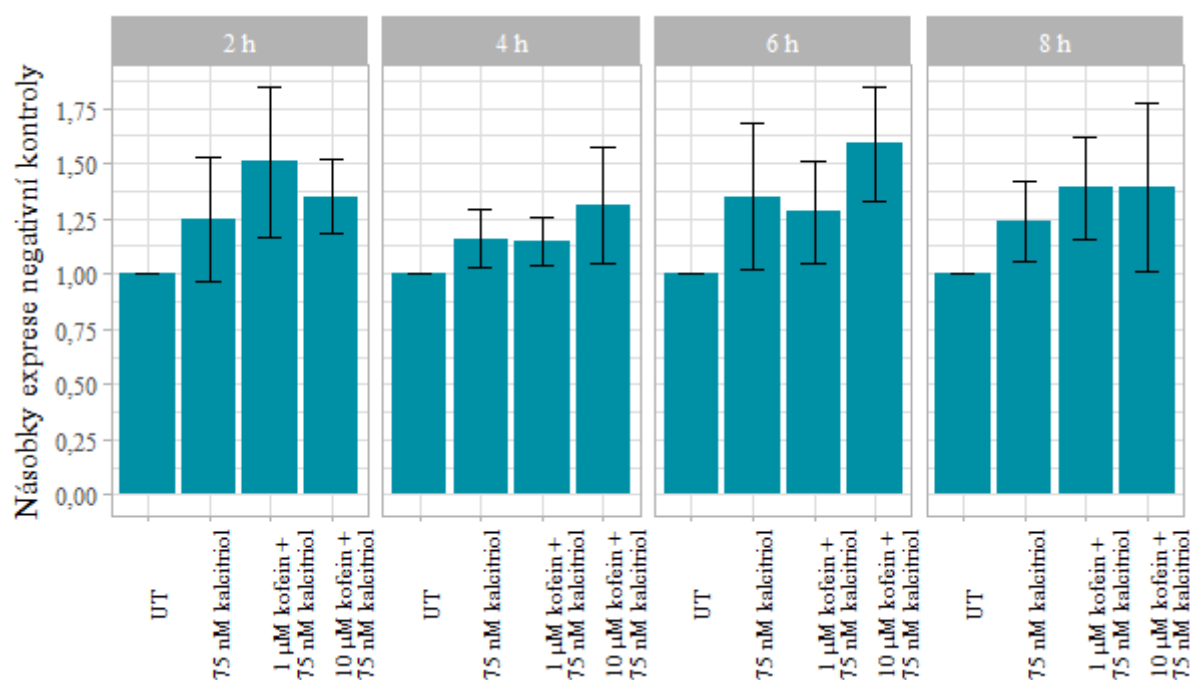
Po zhodnocení vlivu kofeinu v koinkubaci s kalcitriolem na vybrané cílové geny VDR po inkubaci po dobu 24 h byla zhodnocena expres také po kratších časových intervalech – po 2–8 h. V tomto případě byly testovány pouze vzorky $1\ \text{a}\ 10\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ kofeinu se $75\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$ kalcitriolem a geny *CYP24A1* a *BGLAP*, jejichž expres byla v této buněčné linii indukována.

***CYP24A1*.** Při studiu ovlivnění exprese mRNA genu *CYP24A1* v čase byly pozorovány pouze mírné modulace exprese ve všech časových intervalech, které nebyly statisticky významné v porovnání s kalcitriolem samotným (**obrázek 9**).

***BGLAP*.** V případě mRNA genu *BGLAP* bylo v některých případech pozorováno mírné zvýšení exprese po aplikaci kofeinu oproti pozitivní kontrole, obvykle u vyšší koncentrace kofeinu s výjimkou 2h inkubace (**obrázek 10**). Ke zvýšení došlo i u nižší koncentrace kofeinu, a to po 2 a 8 h. Po 4 h však efekt nebyl pozorován a po 6 h byla expres mírně snížena. Změny v expresi tohoto genu rovněž nebyly statisticky signifikantní.



Obrázek 9: Časová závislost exprese genu *CYP24A1* na úrovni RNA po 2–8h koinkubaci kofeinu (1 a 10 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 5 experimentů. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 10: Časová závislost exprese genu *BGLAP* na úrovni RNA po 2–8h koinkubaci kofeinu (1 a 10 $\mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 $\text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii LS180. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 5 experimentů s vyloučením nereprezentativních hodnot. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.

5.3.4. Časová závislost exprese na úrovni proteinu v buněčné linii LS180

Na úrovni proteinu nebylo možné detekovat přítomnost osteokalcinu (produktu genu *BGLAP*), exprese genů *CYP24A1* a *CYP27B1* nebyla na úrovni proteinu stanovována.

5.3.5. Exprese na úrovni RNA po 24 h v buněčné linii HOS

Pro další stanovení změn v expresi sledovaných genů po zásahu kofeinem byla použita nádorová buněčná linie HOS odvozená od osteosarkomu, tedy vhodnější model pro studium exprese kostních proteinů.

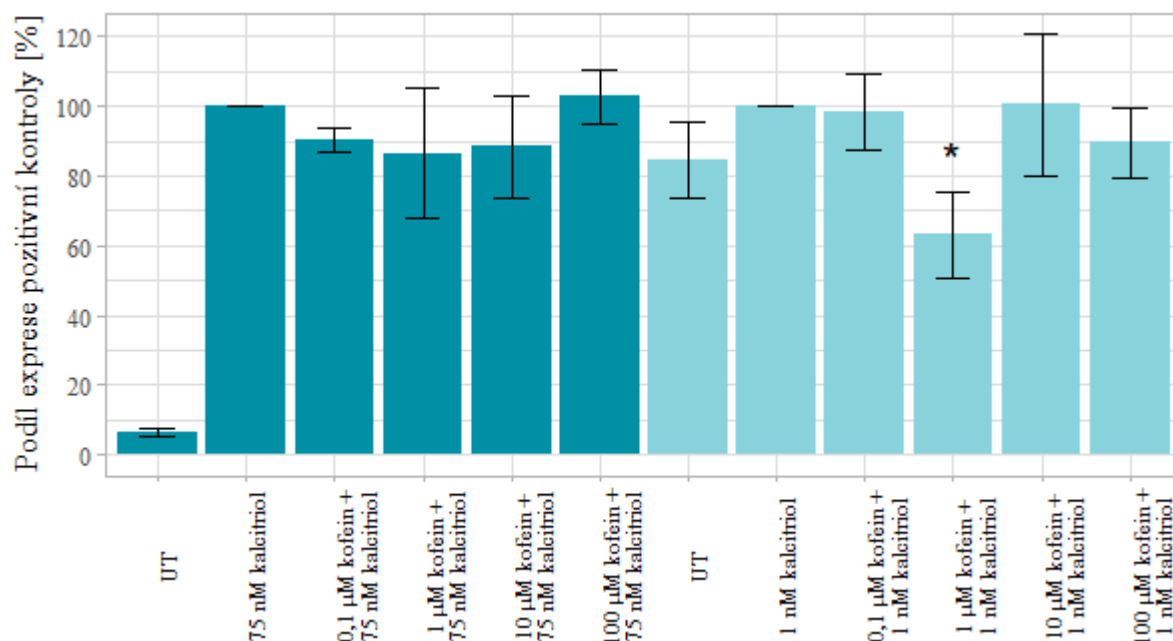
CYP24A1. Při ošetření kalcitriolem o koncentraci $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ došlo v kombinaci s kofeinem k mírnému snížení exprese mRNA *CYP24A1* při koncentracích $0,1\text{--}10 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, v případě nejvyšší koncentrace nebyla pozorována změna (**obrázek 11**). U nižší koncentrace kalcitriolu došlo k statisticky významnému ($P = 0,0236$) snížení exprese vůči pozitivní kontrole v případě koncentrace kofeinu $1 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, v menší míře byla snížena exprese též u koncentrace $100 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, nebyla však signifikantní. U ostatních koncentrací nebyla pozorována změna.

CYP27B1. Koinkubace vyšší hladiny kalcitriolu s kofeinem způsobila snížení exprese mRNA *CYP27B1* u koncentrace $10 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, u ostatních koncentrací nedošlo ke změně v expresi (**obrázek 12**). Koinkubace s nižší hladinou kalcitriolu měla za výsledek snižování exprese mRNA v koncentracích $1\text{--}100 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, v poslední zmíněné koncentraci byla změna statisticky signifikantní ($P = 0,0029$) vůči pozitivní kontrole. Stejně jako u linie LS180 (**obrázek 7**) nebyla u této buněčné linie exprese *CYP27B1* dle očekávání pozitivní kontrolou snížena.

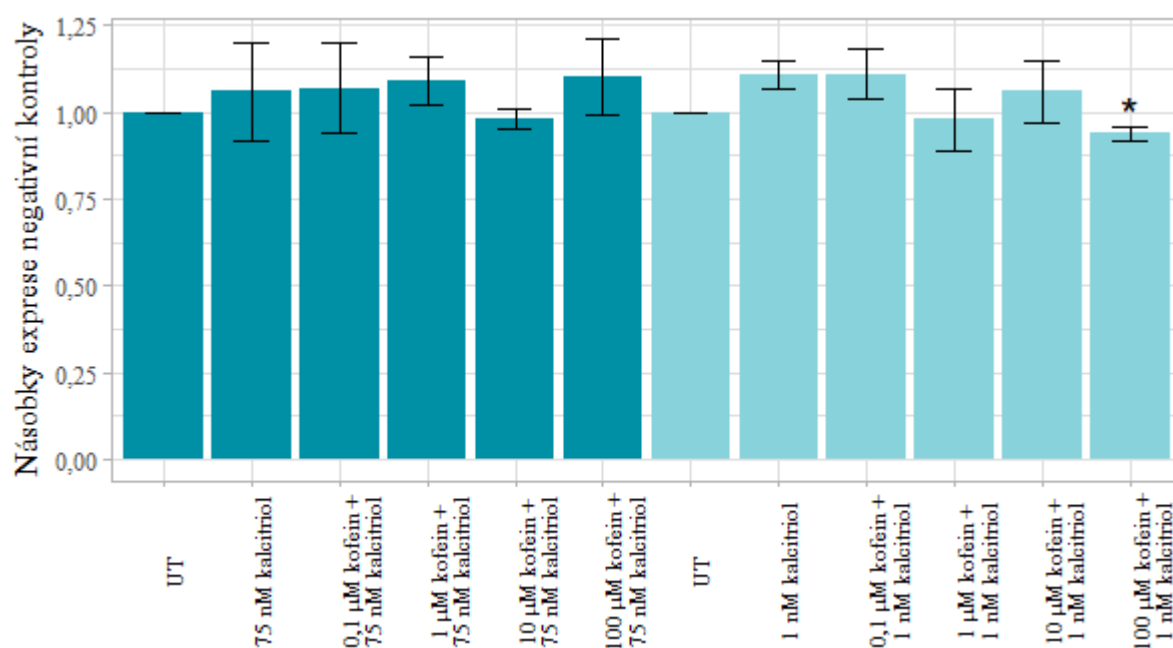
BGLAP. Ošetření kofeinem způsobilo pouze mírné modulace exprese tohoto genu s ohledem na obě použité hladiny kalcitriolu, jen u koncentrace $100 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ kofeinu v kombinaci se $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ kalcitriolem bylo zaznamenáno zvýšení množství mRNA, které ale nebylo statisticky významné (**obrázek 13**). V případě buněčné linie HOS však nedošlo k výraznější indukci exprese mRNA u pozitivní kontroly oproti kontrole negativní, a to ani u kalcitriolu o koncentraci $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$.

SPPI. Kombinace $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ kalcitriolu s kofeinem způsobila mírný nárůst v mRNA genu *SPPI* v testovaných koncentracích, kombinace $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ kalcitriolu a kofeinu měla pak jen mírné modulační účinky na expresi (**obrázek 14**). Účinky kofeinu na expresi *SPPI* nebyly v žádném ze zmíněných případů signifikantní.

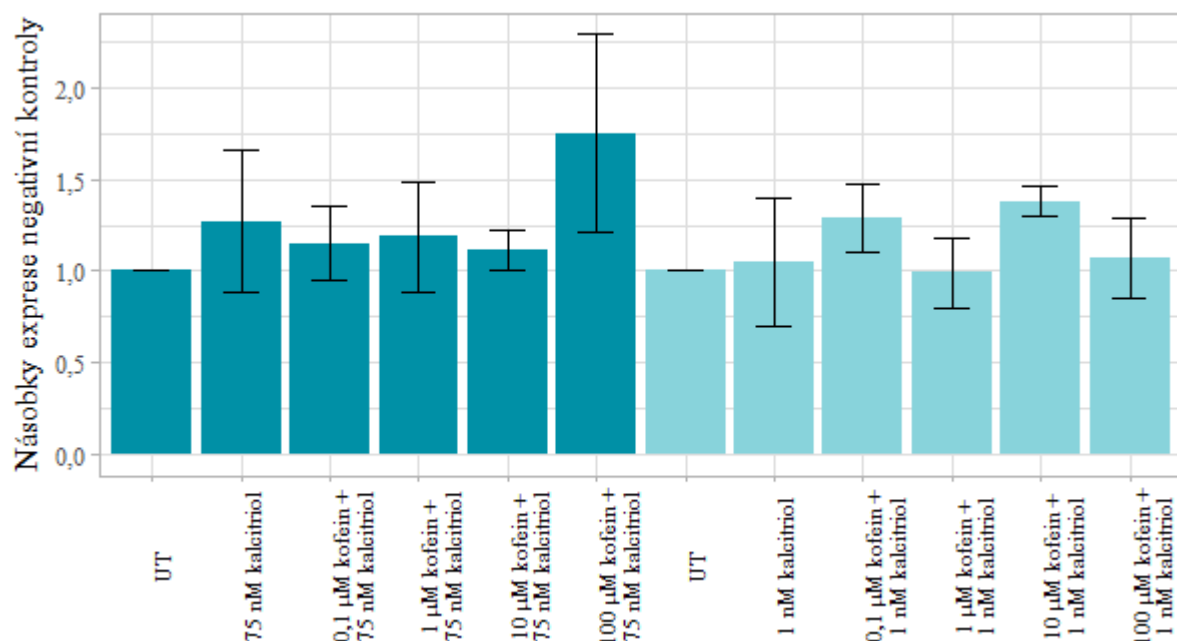
TNFSF11. Při vyšší koncentraci kalcitriolu kofein způsobil mírné snížení exprese mRNA *TNFSF11* ve všech koncentracích s výjimkou $100 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, změny však rovněž nebyly statisticky významné (**obrázek 15**). Ošetření buněk kofeinem v kombinaci s $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ kalcitriolem nemělo vliv na hladinu mRNA.



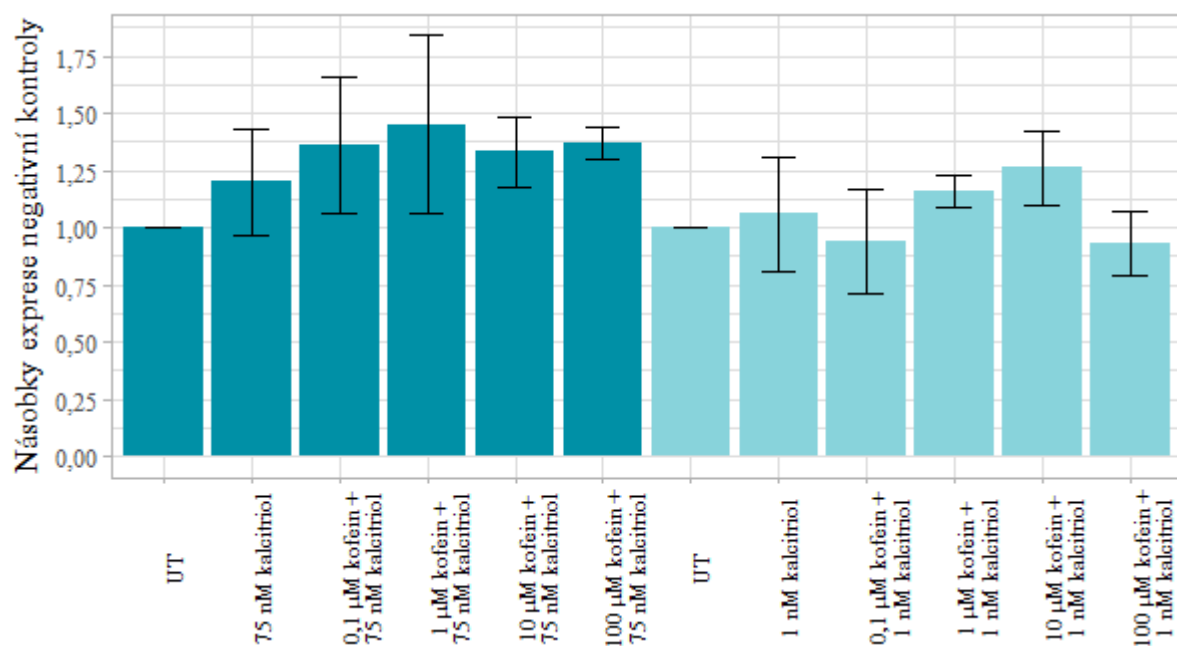
Obrázek 11: Expresa genu *CYP24A1* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. Vzorky označené (*) jsou statisticky signifikantní vůči příslušné pozitivní kontrole ($P < 0,05$) na základě dvouvýběrového t-testu. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



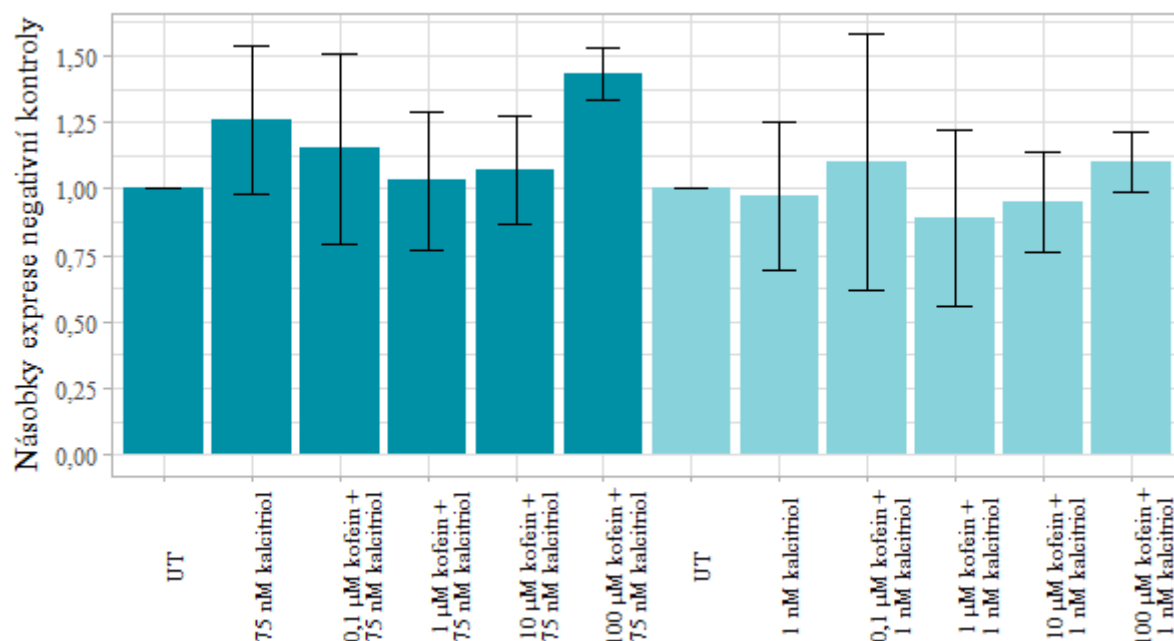
Obrázek 12: Expresa genu *CYP27B1* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. Vzorky označené (*) jsou statisticky signifikantní vůči příslušné pozitivní kontrole ($P < 0,05$) na základě dvouvýběrového t-testu. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 13: Expressie genu *BGLAP* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem ($75\ \text{a}\ 1\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 14: Expressie genu *SPPI* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem ($75\ \text{a}\ 1\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 15: Exprese genu *TNFSF11* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů s vyloučením nerepresentativních hodnot. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.

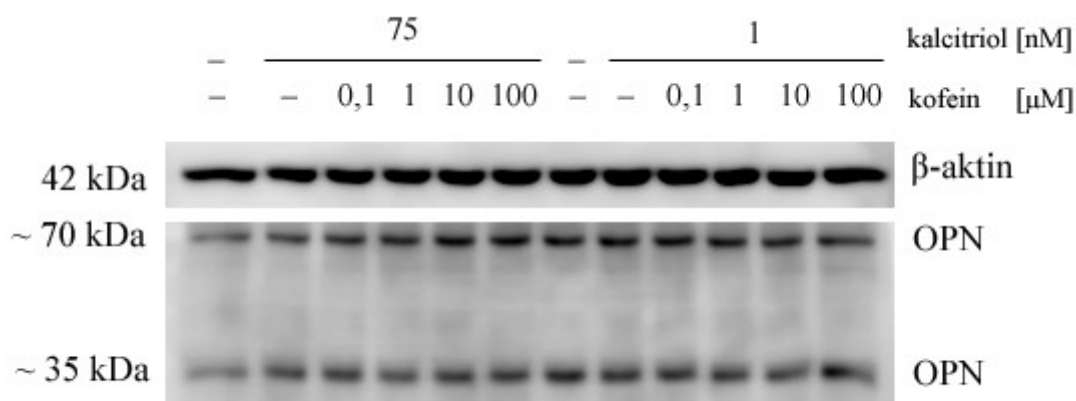
5.3.1. Exprese na úrovni proteinu po 24 h v buněčné linii HOS

Po zhodnocení efektu kofeinu na mRNA bylo zjišťováno, zda se efekt následně promítá i do proteinového produktu.

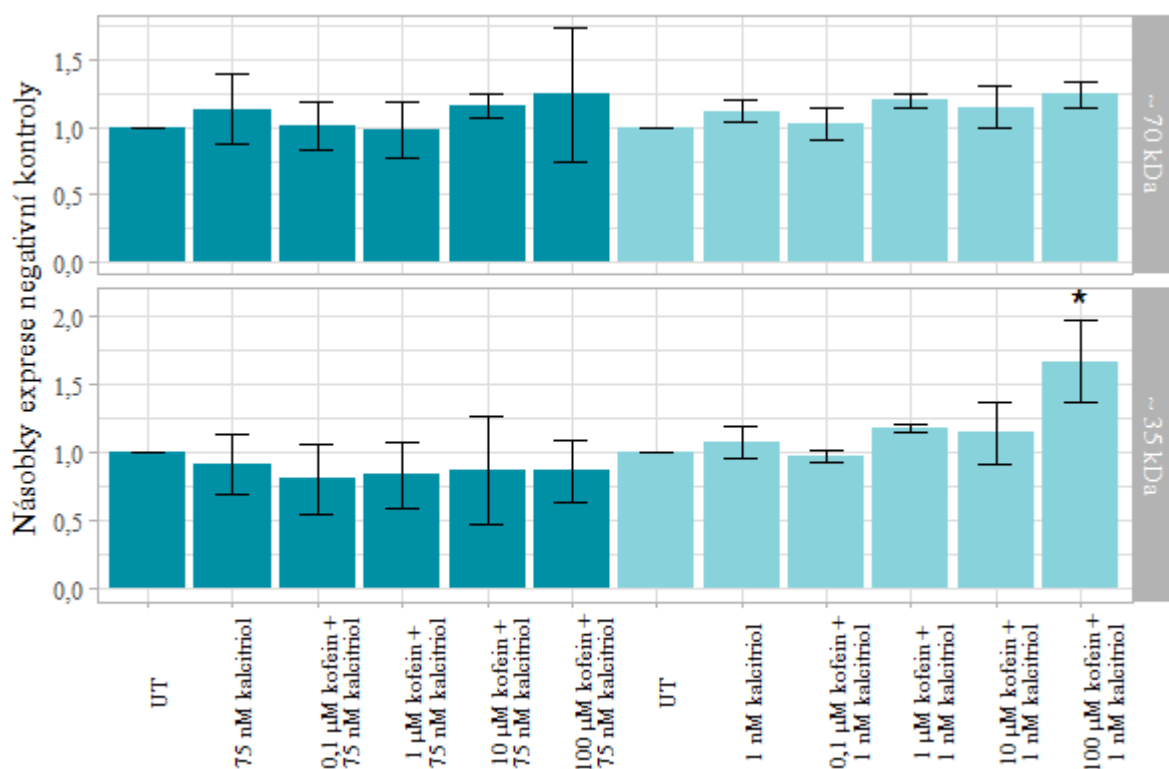
Osteopontin. Stanovení proteinového produktu genu *SPPI*, osteopontinu (OPN), vedlo k detekci dvou produktů (**obrázek 16**). Protein, jehož molekulovou hmotnost lze odhadnout na asi 70 kDa, byl jen mírně, konzistentně s mRNA, indukován vyšší koncentrací kalcitriolu, přičemž koinkubace s kofeinem neměla žádný významný účinek na hladinu proteinu (**obrázek 17**). U nižší koncentrace kalcitriolu rovněž téměř nedošlo ke změnám.

U proteinového produktu s nižší molekulovou hmotností (asi 35 kDa) došlo při použití vyšší koncentrace kalcitriolu k mírnému nesignifikantnímu snížení množství proteinu ve všech koncentracích kofeinu. V případě nižší koncentrace kalcitriolu byl pozorován trend narůstajícího množství proteinu, který dosáhl hodnoty asi o 60 % vyšší oproti kalcitriolu samotnému v koncentraci $100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, v tomto případě bylo zvýšení statisticky signifikantní ($P = 0,03202$) vůči pozitivní kontrole.

Osteokalcin, produkt genu *BGLAP*, v této buněčné linii rovněž nebyl detekován. Exprese genů *CYP24A1*, *CYP27B1* a *TNFSF11* (proteinový produkt RANKL) nebyla stanovována.



Obrázek 16: Reprezentativní western blot detekce osteopontinu v buněčné linii HOS po 24h inkubaci. Detekovány byly dvě varianty osteopontinu, jejichž molekulová hmotnost byla odhadnuta na 35 a 70 kDa. Jako kontrola dávkování byl použit β -aktin. OPN – osteopontin.



Obrázek 17: Semikvantifikace exprese osteopontinu na úrovni proteinu po koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100 \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$) v buněčné linii HOS po dobu 24 h. Množství proteinu bylo stanoveno metodou western blottingu, příslušné hodnoty denzitometricky. Hodnoty jsou normalizovány vůči β -aktinu. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů. Vzorky označené (*) jsou statisticky signifikantní vůči pozitivní kontrole ($P < 0,05$) na základě dvouvýběrového t-testu. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.

5.3.2. Expresse na úrovni RNA po 24 h v lidských osteoblastech

Poté byla hodnocena exprese cílových genů v primární kultuře lidských osteoblastů, jež mají z použitých modelových systémů nejvěrněji reflektovat reálnou situaci v lidském těle. Vliv kofeinu byl testován na kultuře osteoblastů pocházejících ze dvou různých dárců (značeno A a B), proto jsou výsledky evaluovány zvlášť.

CYP24A1. V případě dárce A došlo po ošetření kalcitriolem o koncentraci $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ v kombinaci s kofeinem k postupnému snižování množství mRNA genu *CYP24A1* v koncentraci $0,1 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ o asi 40 %, u $1 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ až o 60 % (**obrázek 18**). Ve vyšších koncentracích kofeinu se exprese opět zvýšila na 54 % hodnoty pozitivní kontroly, v případě $100 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ kofeinu vzrostla až na téměř 90 % exprese pozitivní kontroly. Po ošetření kofeinem v kombinaci s $1 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ kalcitriolem vzhledem k vysokým odchylkám mezi naměřenými hodnotami není vliv kofeinu patrný.

V případě dárce B lze pozorovat vzhledem k velkým odchylkám pouze nevýznamné modulace exprese genu ve všech koncentracích kofeinu, a to jak v kombinaci se $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$, tak s $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ kalcitriolem.

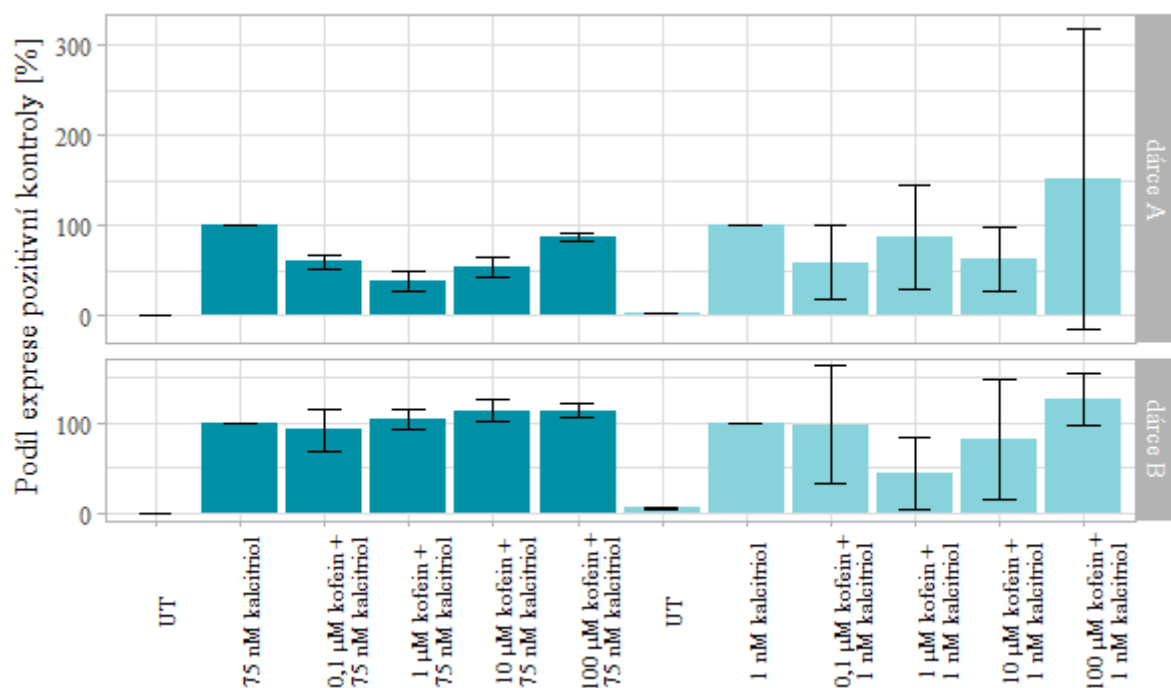
CYP27B1. Stejně tak jako v případě buněčných linií LS180 (**obrázek 7**) a HOS (**obrázek 12**) nedošlo k očekávanému poklesu exprese u pozitivní kontroly oproti negativní kontrole. Vzhledem k této skutečnosti a rovněž k faktu, že exprese tohoto genu byla u dárce A naměřena pouze sporadicky v některých vzorcích, nebyla exprese tohoto genu dále stanovována.

BGLAP. U dárce A nebyla exprese tohoto genu úspěšně naměřena. V případě dárce B pak byly zaznamenány pouze mírné modulace v expresi u obou hladin kalcitriolu a všech použitých koncentrací kofeinu, tyto změny nebyly statisticky signifikantní (**obrázek 19**). Nicméně u tohoto buněčného modelu došlo oproti dříve používaným ke koncentračně závislé indukci exprese *BGLAP* genu.

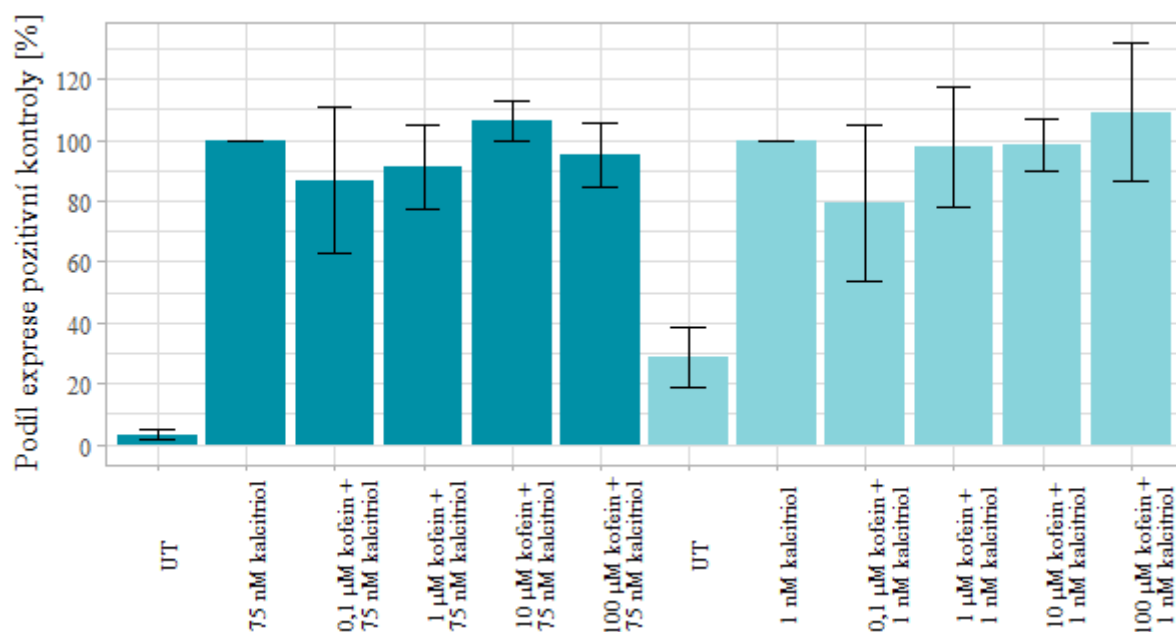
SPPI. Expresse tohoto genu byla kalcitriolem indukována jeho vyšší koncentrací, konkrétně 2,3–10,4×, u nižší koncentrace však nebyla indukce mRNA patrná (**obrázek 20**). V případě dárce A byla u kalcitriolu o koncentraci $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ pozorována mírná změna v expresi vykazující podobnou závislost, jaká byla popsána u *CYP24A1* (**obrázek 18**). U nižší hladiny kalcitriolu byly pozorovány mírné modulace.

V případě dárce B došlo ke snížení exprese při koncentraci $0,1 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$, v ostatních koncentracích byla změna téměř nezatelná od pozitivní kontroly. U nižší koncentrace kalcitriolu došlo ke zvýšení exprese ve všech koncentracích mimo $1 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ kofeinu. Ke statisticky významné změně v expresi ($P = 0,0234$) oproti samotnému kalcitriolu došlo v případě nejvyšší koncentrace kofeinu $100 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$.

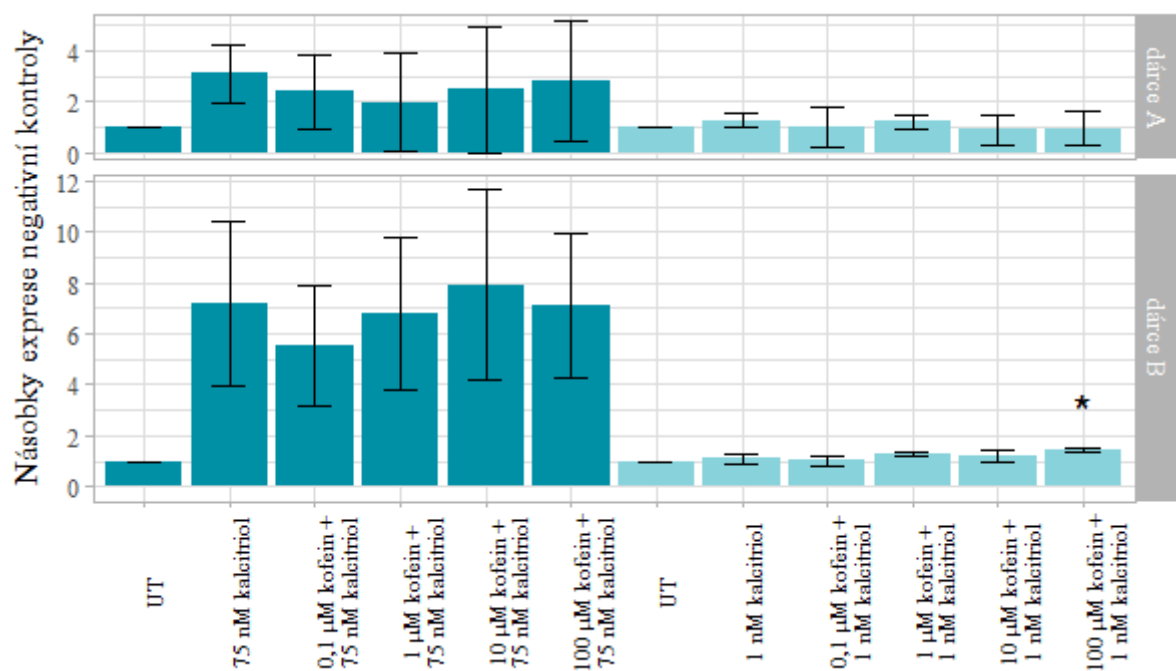
TNFSF11. V případě genu *TNFSF11* byla exprese na úrovni mRNA úspěšně naměřena pouze u vzorků z dárce B (**obrázek 21**). Indukce zde byla zaznamenána u obou hladin kalcitriolu, konkrétně 4,7–11,6× u kalcitriolu o koncentraci $75 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$ a 1,6–1,8× u kalcitriolu o koncentraci $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$. V případě vyšší hladiny kalcitriolu způsobila aplikace kofeinu v koncentraci $0,1\text{--}1 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$ nesignifikantní snížení exprese, ve vyšších koncentracích kofeinu naopak mírný nárůst oproti pozitivní kontrole, rovněž nesignifikantní. Analogický efekt byl pozorován po ošetření kofeinem i při nižší hladině kalcitriolu.



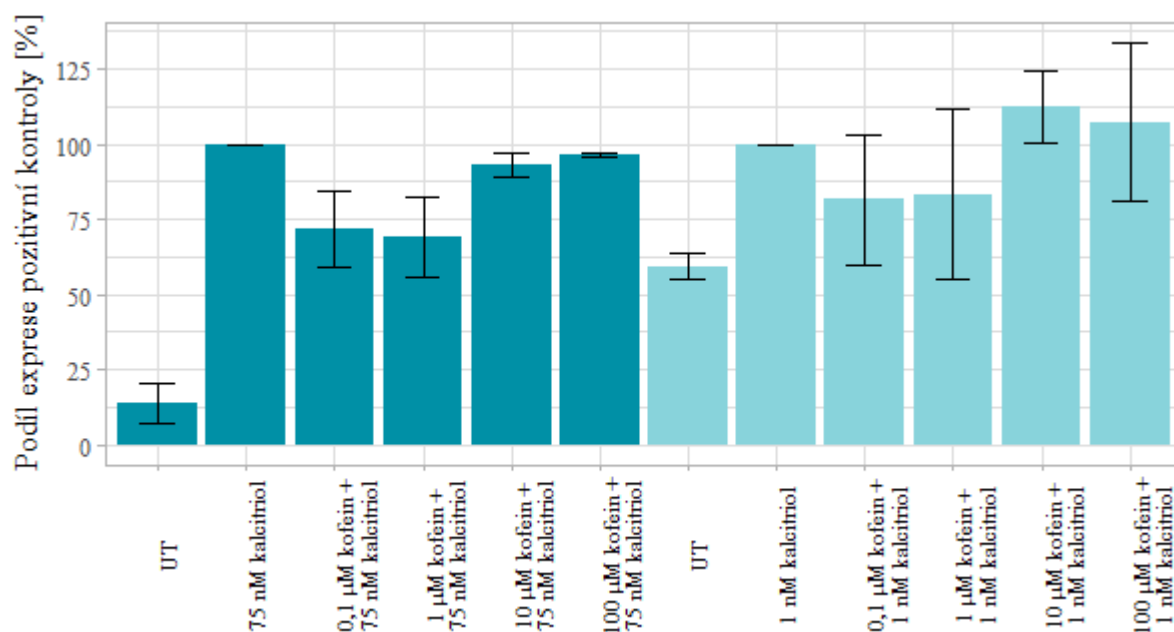
Obrázek 18: Exprese genu *CYP24A1* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100 \text{ } \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1 \text{ nmol} \times \Gamma^{-1}$) v lidských osteoblastech. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 2 experimentů (dárce A) či 3 experimentů (dárce B). UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 19: Expresa genu *BGLAP* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v lidských osteoblastech. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů, konkrétně z dárců B. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 20: Expresa genu *SPP1* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \Gamma^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1\ \text{nmol} \times \Gamma^{-1}$) v lidských osteoblastech. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 2 experimentů (dárce A) či 3 experimentů (dárce B). Vzorky označené (*) jsou statisticky signifikantní vůči pozitivní kontrole ($P < 0,05$) na základě dvouvýběrového t-testu. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.



Obrázek 21: Expresa genu *TNFSF11* na úrovni RNA po 24h koinkubaci kofeinu ($0,1\text{--}100\ \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) s kalcitriolem (75 a $1\ \text{nmol} \times \text{l}^{-1}$) v lidských osteoblastech. Množství RNA bylo stanoveno pomocí Real-Time PCR. Hodnoty jsou normalizovány vůči *GAPDH*. Data pochází z dárce B a jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka z 3 experimentů s vyloučením nereprezentativních hodnot. UT, untreated – negativní kontrola; 75 nM kalcitriol, 1 nM kalcitriol – pozitivní kontrola.

5.3.1. Expresa na úrovni proteinu po 24 h v lidských osteoblastech

Detekce proteinových produktů zkoumaných genů nebyla z časových důvodů stanovena.

6. Diskuse

Tato práce demonstruje účinky kofeinu na expresi cílových genů VDR souvisejících s kostní matrix či s metabolismem kalcitriolu, a to s ohledem na efekt různých koncentrací tohoto hormonu. Vliv kofeinu na expresi těchto genů může mít za důsledek patologické změny, které mohou potenciálně vést k vzniku osteoporózy a podobných onemocnění, u kterých byla v minulosti v některých studiích popsána spojitost s konzumací kofeinu.

Jedním z možných mechanismů, jakým by kofein mohl ovlivňovat účinky VDR, je ovlivněním koncentrace aktivní formy vitamínu D, kalcitriolu, v krvi. Nabízí se dvě možnosti, jakým se toto může dít – jednak je to ovlivnění přeměny kalcifediolu na kalcitriol, nebo naopak ovlivnění inaktivace kalcitriolu. Tyto účinky byly zde testovány analýzou indukce exprese mRNA dvou enzymů – CYP24A1, který hormonální formu vitamínu D inaktivuje, a CYP27B1, který hormon tvoří. Výsledky neukázaly signifikantní změny exprese *CYP24A1* v žádném z použitých modelových systémů mimo jednoho případu (koncentrace $1 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu koinkubovaného s $1 \text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolem v buněčné linii HOS), stejná situace je v případě *CYP27B1*, kde rovněž došlo k ojedinělému případu signifikantního snížení exprese (koncentrace $100 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu koinkubovaného s $1 \text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolem v buněčné linii HOS). Na data získaná studiem změn exprese *CYP27B1* by však pravděpodobně neměl být brán zřetel vzhledem ke skutečnosti, že v žádné z nádorových linií ani v kultuře osteoblastů nedošlo k očekávané represi exprese tohoto enzymu účinkem kalcitriolu.

Studie zabývající se účinkem kofeinu na expresi těchto enzymů nebyly nalezeny, Yeh *et al.* (1986) však zjistili, že u mladých potkanů se následkem podání kofeinu zvyšuje sérová koncentrace kalcitriolu, tato změna však nebyla pozorována u potkanů dospělých. Taft *et al.* (1984) pak *in vitro* detekovali inhibiční efekt kofeinu na tvorbu kalcitriolu z kalcifediolu v ledvinových tubulech kuřat. Závěry z těchto studií zcela neodpovídají výsledkům prezentovaným v této práci, obě práce však pro experimenty využívaly mnohem vyšší koncentrace kofeinu, než zde – v prvním případě byly potkanům podávány dávky, které odpovídají asi 16 šálkům kávy na den pro člověka, v druhém případě *in vitro* studie byl inhibiční efekt zaznamenán u koncentrací $5\text{--}10 \text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu, tedy koncentracím mnohonásobně překračujícím fyziologicky možnou plazmatickou koncentraci kofeinu. Neshoda může pramenit rovněž z velmi odlišných modelových systémů, na kterých byly účinky kofeinu testovány.

Jinou potenciální možností účinku kofeinu na VDR s ohledem na vznik osteoporózy a podobných onemocnění může být ovlivnění exprese genů kódujících proteiny, jež se nějakým způsobem účastní formování kosti. Jedním z proteinů, který tvoří významnou část organické složky kosti a podílí se na mineralizaci kostí, je osteokalcin (produkt genu *BGLAP*). Tento protein je rovněž markerem funkce osteoblastů. Kofein neměl na expresi *BGLAP*, ať už mRNA či proteinu,

signifikantní efekt v žádném z modelových systémů a rozdíl nebyl zaznamenán ani u různých použitých koncentrací kalcitriolu.

Existuje řada studií, jež analyzují expresi tohoto genu po ošetření kofeinem, v žádné z nich však nebyl zohledněn vliv hladiny kalcitriolu. Tato skutečnost značně ztěžuje porovnávání, pravděpodobně je možné potenciální efekt kofeinu přirovnat zde k expresi genu při použití kalcitriolu o koncentraci $1 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$, tedy hladině odpovídající nedostatku vitamínu D, jež se vyskytuje u velké části populace. Zvýšení exprese osteokalcinu zaznamenali Zhou *et al.* (2010) při studiu exprese mRNA i proteinu tohoto genu v potkaních mezenchymálních stromálních buňkách odvozených z kostní dřene. Zvýšení množství mRNA při koncentraci kofeinu 100 a $300 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ a naopak snížení při koncentraci $1000 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ detekovali také Su *et al.* (2013) v myši nádorové buněčné linii M2-10B4 odvozené od stromálních buněk kostní dřene. Naopak Tassinari *et al.* (1991) zjistili snížení množství osteokalcinu závislé na dávce v kultuře kuřecích osteoblastů, snížení exprese mRNA pak zaznamenali i Barone *et al.* (1993) v některých stádiích maturace potkaních osteoblastů. Výsledky jsou tedy značně protichůdné a neshodují se se zde předkládanými daty. Ve všech studiích byly však použity koncentrace kofeinu v rozmezí $100 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ a více, které tedy zcela neodpovídají koncentracím použitým zde. Je tedy možné, že kofein může mít vliv na expresi osteokalcinu, případný efekt však může být jiný s ohledem na různé buněčné typy či použitou dávku kofeinu.

Osteopontin (produkt genu *SPPI*) je dalším z kostních proteinů podílejících se na mineralizaci, rovněž má zprostředkovávat resorpci kostí poskytnutím vazebných míst pro osteoklasty. V tomto případě nebyly detekovány změny v expresi s výjimkou koncentrace $100 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu koinkubovaného s $1 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolem v buněčné linii HOS na úrovni proteinu, kdy byla hladina jednoho z detekovaných proteinových produktů zvýšená. Stejná koncentrace také způsobila signifikantní zvýšení exprese u jednoho z dárců v lidských osteoblastech. Lze se tedy opatrně domnívat, že tato koncentrace kofeinu v kombinaci s nízkou hladinou kalcitriolu v krvi může mít určitý biologický význam, je však sporné, zda je takový závěr skutečně relevantní, jelikož dosažení koncentrace $100 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu je perorální cestou fyziologicky nemožné. Dalším faktorem mluvícím v neprospěch významu zvýšení exprese mRNA *SPPI* je nízký počet opakování těchto experimentů a absence údajů o hladině proteinu v případě stanovení exprese v kultuře osteoblastů.

RANKL (produkt genu *TNFSF11*) se účastní rekrutování osteoklastů, čímž umožňuje resorpci kostí. V případě tohoto genu nebyly detekovány žádné statisticky významné změny v jeho expresi. V práci Yi *et al.* (2016), kde byla sledována exprese genu *TNFSF11* na úrovni mRNA i proteinu v tkáňovém modelu lidských buněk periodontálního vazy, rovněž nebyly zjištěny změny v expresi, ve shodě s výsledky prezentovanými zde. Přestože podobně jako v případě výzkumů zmíněných výše, které se zabývaly expresí osteokalcinu, ani zde nebyl brán ohled na hladinu kalcitriolu, je předností práce této vědecké skupiny použití takové koncentrace kofeinu, která je fyziologicky dosažitelná ($10 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$), a která tak umožňuje lepší srovnání se zde prezentovanými výsledky.

Lze tedy konstatovat, že kofein v rozmezí koncentrací $0,1\text{--}100 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ v kombinaci s kalcitriolem (bez ohledu na jeho koncentraci), nemá vliv na expresi stanovovaných genů v použitých buněčných modelech. Ovlivnění VDR pomocí kofeinu bylo však již dříve demonstrováno (Rapuri *et al.*, 2007). V této studii bylo metodou western blottingu zjištěno, že následkem zvyšujících se koncentrací kofeinu v kombinaci s kalcitriolem o koncentraci $100 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ dochází ke koncentračně závislému snížení množství proteinu VDR, které autoři přisuzují jeho snížené expresi. Vzhledem ke skutečnosti, že množství mRNA nebylo v této studii stanovováno, není jasné, zda efekt kofeinu skutečně spočívá ve snížení exprese VDR jako takového, či jde o potenciální ovlivnění stabilizačních účinků ligandu na VDR, jež bylo u kalcitriolu již dříve popsáno (Kongsbak *et al.*, 2014; Arbour *et al.*, 1993; Wiese *et al.*, 1992). Bez ohledu na pravou příčinu snížení množství proteinu VDR, výsledky prezentované zde nejsou ve shodě s uvedenou studií. Sledována však byla exprese jiných genů a rovněž koncentrace kofeinu, které k tomuto stanovení byly použity ($0,2\text{--}10 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$), více než dvacetinásobně překračují koncentrace, které lze detekovat v krvi po běžném přijímání kofeinu ve stravě, a spíše odpovídají koncentracím pro lidi toxickým. Je tedy otázkou, zda je snížení množství VDR následkem ošetření kofeinu fyziologicky relevantní.

Vzniklé rozpory lze pravděpodobně přisuzovat i volbě modelového systému. Při zkoumání vlivu kofeinu na expresi daných genů v buněčné linii LS180 nebyly zjištěny žádné statisticky signifikantní rozdíly v množství mRNA, přestože právě v této linii bylo zvýšení transkripční aktivity metodou Reporter Gene Assay opakovaně detekováno. Tato linie však nepředstavuje příliš přesný modelový systém pro studium vlivu kofeinu na kostní tkáň, což lze konstatovat rovněž vzhledem k faktu, že exprese *SPPI* a *TNFSF11* nebyla v těchto buňkách detekována vůbec, a v případě *BGLAP* byla detekována pouze mRNA. V další fázi práce byl vliv kofeinu testován na buněčné linii HOS, která je nádorovou linií odvozenou od osteosarkomu a je tedy pro účely této studie vhodnější. U tohoto modelového systému v některých ojedinělých případech bylo možné některé změny v genové expresi vyhodnotit jako statisticky signifikantní, linie HOS však v některých případech nevykazovala uspokojivou míru indukce cílového genu VDR kalcitriolem, vyvozování závěrů je proto i tady značně omezené. Naposledy kultura lidských osteoblastů byla použita jako finální modelový systém nejvíce se blížící reálné situaci, přestože v tomto případě rovněž chybí kontext celého organismu. Zde roli v zjištěných rozporech může hrát také genotyp daného dárce a rovněž počet replikací experimentu, jelikož bylo možné připravit pouze 2 experimenty v případě dárce A a 3 experimenty v případě dárce B, což značně ztěžuje vyvozování fyziologicky relevantních závěrů.

Zvýšenou aktivitu VDR v přítomnosti kofeinu a kalcitriolu, která byla základem pro tuto práci, lze přirovnávat ke zvýšení transkripční aktivity následkem ošetření kofeinem, která byla popsána u glukokortikoidního receptoru v nádorové linii SaOS-2 odvozené od lidského osteosarkomu (Föcking *et al.*, 2005). Zvýšení transkripční aktivity autoři studie přičítají zvýšené hladině cyklického AMP v důsledku inhibice fosfodiesterázy kofeinem. Toto vysvětlení se nabízí i zde, pravděpodobně však není aplikovatelné pro tento případ ze dvou důvodů – jednak jsou za spodní hranici inhibice

fosfodiesterázy kofeinem považovány koncentrace v rozmezí 100–1000 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ (Francis *et al.*, 2011), a zde byla transkripční aktivita signifikantně zvýšená i při koncentraci kofeinu 1000× nižší. Dále pak fosforylace proteinkinázou A, která byla popsána u VDR, má transkripční aktivitu receptoru naopak snižovat (Hsieh *et al.*, 2004). Rovněž potenciální zvýšení hladiny Ca^{2+} , které bylo popsáno jako následek vysoké koncentrace kofeinu (Kirino *et Shimizu*, 1982) by skrz fosforylaci proteinkinázou C- β (Hsieh *et al.*, 1991) vedlo ke snížení, ne zvýšení aktivity VDR. Uvolnění Ca^{2+} bylo navíc detekováno ve svalových buňkách a zde použitá koncentrace kofeinu je pro tento účinek také příliš nízká. Není tedy zřejmé, co způsobuje zvýšení transkripční aktivity VDR kofeinem, ani z jakého důvodu se zvýšení transkripční aktivity nepromítá do změn exprese sledovaných genů.

7. Závěr

V této práci byl testován vliv kofeinu na expresi cílových genů receptoru pro vitamín D. Kofein byl použit v koncentracích 0,1; 1; 10 a 100 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, tedy v koncentracích, které je možné detekovat po běžné konzumaci kofeinu, a to vždy v kombinaci kalcitriolem o koncentraci buď 75 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ – koncentraci, jejíž dosažení se doporučuje ze zdravotního hlediska, nebo 1 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$, která představuje stav deficience vitamínu D. Testován byl vliv těchto látek na expresi genů, které se účastní inaktivace a aktivace hormonální formy vitamínu D, genů *CYP24A1* a *CYP27B1*, a dále genů souvisejících s tvorbou kostní matrix, genů *BGLAP* (protein osteokalcin), *SPPI* (protein osteopontin) a *TNFSF11* (protein RANKL). Jejich exprese byla stanovována v nádorových buněčných liniích LS180 a HOS a v kultuře lidských osteoblastů – množství mRNA bylo stanovováno metodou Real-Time PCR, množství proteinu pomocí western blottingu.

Kofein v koinkubaci s kalcitriolem neměl vliv na expresi genů v buněčné linii LS180. V případě buněčné linie HOS byly zjištěny mírné modulace exprese – snížení na úrovni mRNA u genu *CYP24A1* při použití koncentrace 1 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu s 1 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolem, a u genu *CYP27B1* při koncentraci 100 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu s 1 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolem, na úrovni proteinu pak u stejné koncentrace kofeinu bylo detekováno signifikantní zvýšení množství jedné z detekovaných forem osteopontinu. Při analýze exprese v osteoblastech byla detekována různá míra modulace exprese genů, v případě genu *SPPI* na úrovni mRNA pak bylo zaznamenáno zvýšení exprese při koncentraci 100 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ kofeinu s 1 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ kalcitriolem u jednoho z dárců. Zhodnocení vlivu kofeinu expresi genů v lidských osteoblastech vyžaduje z důvodu malého počtu opakování další výzkum.

Z dostupných údajů lze usuzovat, že exprese genů, které spadají pod regulaci receptoru pro vitamín D, není kofeinem výrazněji ovlivňována.

8. Literatura

- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175–179.
- Arai, H., Miyamoto, K.-I., Taketani, Y., Yamamoto, H., Iemori, Y., Morita, K., Tonai, T., Nishisho, T., Mori, S., Takeda, E. (1997). A Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in the Translation Initiation Codon: Effect on Protein Activity and Relation to Bone Mineral Density in Japanese Women. *Journal Of Bone And Mineral Research* 12, 915–921.
- Arbour, N. C., Prah, J. M., DeLuca, H. F. (1993). Stabilization of the vitamin D receptor in rat osteosarcoma cells through the action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Molecular Endocrinology* 7, 1307–1312.
- Arnaud, M. J. (2011). Pharmacokinetics and Metabolism of Natural Methylxanthines in Animal and Man. In *Methylxanthines* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 33–91.
- Arnaud, M. J. (1987). The pharmacology of caffeine. In *Progress In Drug Research* (Basel: Birkhäuser Basel), pp. 273–313.
- Ashihara, H., Suzuki, T. (2004). Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers In Bioscience: A Journal And Virtual Library* 9, 1864–1876.
- Barone, L. M., Tassinari, M. S., Bortell, R., Owen, T. A., Zerogian, J., Gagne, K., Stein, G. S., Lian, J. B. (1993). Inhibition of induced endochondral bone development in caffeine-treated rats. *Journal Of Cellular Biochemistry* 52, 171–182.
- Bartik, L., Whitfield, G. K., Kaczmarek, M., Lowmiller, C. L., Moffet, E. W., Furmick, J. K., Hernandez, Z., Haussler, C. A., Haussler, M. R., Jurutka, P. W. (2010). Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with implications for colon cancer chemoprevention. *The Journal Of Nutritional Biochemistry* 21, 1153–1161.
- Benowitz, N. L. (1990). Clinical Pharmacology of Caffeine. *Annual Review Of Medicine* 41, 277–288.
- Blanchard, J. (1982). Protein Binding of Caffeine in Young and Elderly Males. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 71, 1415–1418.
- Bravo, S., Paredes, R., Izaurieta, P., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., Hinrichs, M. V., Olate, J., Aguayo, L. G., Montecino, M. (2006). The classic receptor for 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃ is required for non-genomic actions of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃ in osteosarcoma cells. *Journal Of Cellular Biochemistry* 99, 995–1000.

- Cashman, K. D., Dowling, K. G., Škrabáková, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtuena, J., De Henauw, S., Moreno, L., Damsgaard, C. T., Michaelsen, K. F., Molgaard, C., Jorde, R., Grimnes, G., Moschonis, G., Mavrogianni, C., Manios, Y., Thamm, M., Mensink, G. B., Rabenberg, M., Busch, M. A., Cox, L., Meadows, S., Goldberg, G., Prentice, A., Dekker, J. M., Nijpels, G., Pilz, S., Swart, K. M., van Schoor, N. M., Lips, P., Eiriksdottir, G., Gudnason, V., Cotch, M. F., Koskinen, S., Lamberg-Allardt, C., Durazo-Arvizu, R. A., Sempos, C. T., Kiely, M. (2016). Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *American Journal Of Clinical Nutrition* 103, 1033–1044.
- Cumming, R. G., Klineberg, R. J. (1994). Case-Control Study of Risk Factors for Hip Fractures in the Elderly. *American Journal Of Epidemiology* 139, 493–503.
- Daly, J. W., Shi, D., Nikodijevic, O., Jacobson, K. A. (1994). The role of adenosine receptors in the central action of caffeine. *Pharmacopsychocologia* 7, 201–213.
- Derry, C. J., Derry, S., Moore, R. A. (2014). Caffeine as an analgesic adjuvant for acute pain in adults. *The Cochrane Database Of Systematic Reviews* 1–51.
- Doepker, C., Lieberman, H. R., Smith, A. P., Peck, J. D., El-Sohemy, A., Welsh, B. T. (2016). Caffeine: Friend or Foe? *Annual Review Of Food Science And Technology* 7, 117–137.
- Drocourt, L., Ourlin, J.-C., Pascussi, J.-M., Maurel, P., Vilarem, M.-J. (2002). Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 Is Regulated by the Vitamin D Receptor Pathway in Primary Human Hepatocytes. *Journal Of Biological Chemistry* 277, 25125–25132.
- Duan, L., Yang, J., Slaughter, M. M. (2009). Caffeine inhibition of ionotropic glycine receptors. *The Journal Of Physiology* 587, 4063–4075.
- Echchgadda, I., Song, C. S., Roy, A. K., Chatterjee, B. (2004). Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase Is a Target for Transcriptional Induction by the Vitamin D Receptor. *Molecular Pharmacology* 65, 720–729.
- Esteban, L. M., Fong, C., Amr, D., Cock, T.-A., Allison, S. J., Flanagan, J. L., Liddle, C., Eisman, J. A., Gardiner, E. M. (2005). Promoter-, cell-, and ligand-specific transactivation responses of the VDRB1 isoform. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 334, 9–15.
- Fischer, T. W., Hipler, U. C., Elsner, P. (2007). Effect of caffeine and testosterone on the proliferation of human hair follicles in vitro. *International Journal Of Dermatology* 46, 27–35.
- Föcking, M., Schmiegelt, D., Trapp, T. (2005). Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 337, 435–439.
- Francis, S. H., Sekhar, K. R., Ke, H., Corbin, J. D. (2011). Inhibition of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases by Methylxanthines and Related Compounds. In *Methylxanthines* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 93–133.
- Fredholm, B. B. (1979). Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends In Pharmacological Sciences* 1, 129–132.

- Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E. E. (1999). Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Reviews* 51, 83–133.
- Fujisawa, R., Tamura, M. (2012). Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Frontiers In Bioscience* 17, 1891–1903.
- Fulgoni, V. L., Keast, D. R., Lieberman, H. R. (2015). Trends in intake and sources of caffeine in the diets of US adults: 2001–2010. *American Journal Of Clinical Nutrition* 101, 1081–1087.
- Gericke, A., Qin, C., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W. T., Sørensen, E. S., Boskey, A. L. (2005). Importance of Phosphorylation for Osteopontin Regulation of Biomineralization. *Calcified Tissue International* 77, 45–54.
- Gimba, E. R., Tilli, T. M. (2013). Human osteopontin splicing isoforms: Known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer Letters* 331, 11–17.
- Grainge, M. J., Coupland, C. A. C., Cliffe, S. J., Chilvers, C. E. D., Hosking, D. J. (1998). Cigarette Smoking, Alcohol and Caffeine Consumption, and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. *Osteoporosis International* 8, 355–363.
- Gross, C., Eccleshall, T. R., Malloy, P. J., Villa, M. L., Marcus, R., Feldman, D. (1996). The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *Journal Of Bone And Mineral Research* 11, 1850–1855.
- Grundmann, M. (2001). Lékové interakce s kofeinem I. *Interní Medicína Pro Praxi* 3, 187–188.
- Hagenau, T., Vest, R., Gissel, T. N., Poulsen, C. S., Erlandsen, M., Mosekilde, L., Vestergaard, P. (2009). Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporosis International* 20, 133–140.
- Hallström, H., Wolk, A., Glynn, A., Michaëlsson, K. (2006). Coffee, tea and caffeine consumption in relation to osteoporotic fracture risk in a cohort of Swedish women. *Osteoporosis International* 17, 1055–1064.
- Hansen, S. A., Folsom, A. R., Kushi, L. H., Sellers, T. A. (2000). Association of fractures with caffeine and alcohol in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Public Health Nutrition* 3, 253–261.
- Harter, D. L., Busnello, F. M., Dibi, R. P., Stein, A. T., Kato, S. K., Vanin, C. M. D. M. (2013). Association between low bone mass and calcium and caffeine intake among perimenopausal women in Southern Brazil: cross-sectional study. *Sao Paulo Medical Journal* 131, 315–322.
- Haussler, M. R., Haussler, C. A., Bartik, L., Whitfield, G. K., Hsieh, J.-C., Slater, S., Jurutka, P. W. (2008). Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutrition Reviews* 66, S98–S112.

- Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M., Norman, A. W. (2011b). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 : Genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25, 543–559.
- Haussler, M. R., Norman, A. W. (1969). CHROMOSOMAL RECEPTOR FOR A VITAMIN D METABOLITE. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 62, 155–162.
- Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Hsieh, J.-C., Jurutka, P. W. (2011a). Nuclear Vitamin D Receptor: Natural Ligands, Molecular Structure – Function, and Transcriptional Control of Vital Genes. In *Vitamin D* (Boston: Academic Press), pp. 137–170.
- Haussler, M. R., Myrtle, J. F., Norman, A. W. (1968). The association of a metabolite of vitamin D_3 with intestinal mucosa chromatin in vivo. *The Journal Of Biological Chemistry* 243, 4055–4064.
- Heckman, M. A., Weil, J., de Mejia, E. G. (2010). Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal Of Food Science* 75, R77–R87.
- Hofbauer, L. C. (2004). Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases. *Jama* 292, 490–495.
- Holick, M. F. (2009). Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. *Annals Of Epidemiology* 19, 73–78.
- Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P., Murad, M. H., Weaver, C. M. (2011). Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96, 1911–1930.
- Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Ganić, K. K., Iveković, D., Karlović, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry* 115, 441–448.
- Hsieh, J. C., Jurutka, P. W., Galligan, M. A., Terpening, C. M., Haussler, C. A., Samuels, D. S., Shimizu, Y., Shimizu, N., Haussler, M. R. (1991). Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 88, 9315–9319.
- Hsieh, J.-C., Dang, H. T. L., Galligan, M. A., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Jurutka, P. W., Haussler, M. R. (2004). Phosphorylation of human vitamin D receptor serine-182 by PKA suppresses $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -dependent transactivation. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 324, 801–809.

- Huhtakangas, J. A., Olivera, C. J., Bishop, J. E., Zanello, L. P., Norman, A. W. (2004). The Vitamin D Receptor Is Present in Caveolae-Enriched Plasma Membranes and Binds $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ in Vivo and in Vitro. *Molecular Endocrinology* 18, 2660–2671.
- Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C., Goldberg, H. A. (1996). Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal* 317, 59–64.
- Cheng, W. S. C., Murphy, T. L., Smith, M. T., Cooksley, W. G. E., Halliday, J. W., Powell, L. W. (1990). Dose-dependent pharmacokinetics of caffeine in humans: Relevance as a test of quantitative liver function. *Clinical Pharmacology And Therapeutics* 47, 516–524.
- Chiang, W.-F., Liao, M.-T., Cheng, C.-J., Lin, S.-H. (2013). Rhabdomyolysis induced by excessive coffee drinking. *Human & Experimental Toxicology* 33, 878–881.
- Chin, J. M., Merves, M. L., Goldberger, B. A., Sampson-Cone, A., Cone, E. J. (2008). Caffeine Content of Brewed Teas. *Journal Of Analytical Toxicology* 32, 702–704.
- Chi, Y., Hong, Y., Zong, H., Wang, Y., Zou, W., Yang, J., Kong, X., Yun, X., Gu, J. (2009). CDK11p58 represses vitamin D receptor-mediated transcriptional activation through promoting its ubiquitin-proteasome degradation. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 386, 493–498.
- Choi, O. H., Shamim, M. T., Padgett, W. L., Daly, J. W. (1988). Caffeine and theophylline analogues: Correlation of behavioral effects with activity as adenosine receptor antagonists and as phosphodiesterase inhibitors. *Life Sciences* 43, 387–398.
- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G. (2016). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews* 96, 365–408.
- Ishigaki, S., Fukasawa, H., Kinoshita-Katahashi, N., Yasuda, H., Kumagai, H., Furuya, R. (2014). Caffeine Intoxication Successfully Treated by Hemoperfusion and Hemodialysis. *Internal Medicine* 53, 2745–2747.
- Jones, G., Prosser, D. E., Kaufmann, M. (2013). Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *Journal Of Lipid Research* 55, 13–31.
- Jones, A. W. (2017). Review of Caffeine-Related Fatalities along with Postmortem Blood Concentrations in 51 Poisoning Deaths. *Journal Of Analytical Toxicology* 41, 167–172.
- Jurutka, P. W., Bartik, L., Whitfield, G. K., Mathern, D. R., Barthel, T. K., Gurevich, M., Hsieh, J.-C., Kaczmarek, M., Haussler, C. A., Haussler, M. R. (2007). Vitamin D Receptor: Key Roles in Bone Mineral Pathophysiology, Molecular Mechanism of Action, and Novel Nutritional Ligands. *Journal Of Bone And Mineral Research* 22, V2–V10.

- Jurutka, P. W., Hsieh, J. C., MacDonald, P. N., Terpening, C. M., Haussler, C. A., Haussler, M. R., Whitfield, G. K. (1993). Phosphorylation of serine 208 in the human vitamin D receptor. The predominant amino acid phosphorylated by casein kinase II, in vitro, and identification as a significant phosphorylation site in intact cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 268, 6791–6799.
- Kajikawa, M., Ishida, H., Fujimoto, S., Mukai, E., Nishimura, M., Fujita, J., Tsuura, Y., Okamoto, Y., Norman, A. W., Seino, Y. (1999). An Insulinotropic Effect of Vitamin D Analog with Increasing Intracellular Ca²⁺ Concentration in Pancreatic β -Cells through Nongenomic Signal Transduction. *Endocrinology* 140, 4706–4712.
- Kazanecki, C. C., Uzwiak, D. J., Denhardt, D. T. (2007). Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *Journal Of Cellular Biochemistry* 102, 912–924.
- Kerner, S. A., Scott, R. A., Pike, J. W. (1989). Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D₃. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 86, 4455–4459.
- Kiel, D. P., Felson, D. T., Hannan, M. T., Anderson, J. J., Wilson, P. W. (1990). Caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. *American Journal Of Epidemiology* 132, 675–684.
- Kim, S., Yamazaki, M., Shevde, N. K., Pike, J. W. (2007). Transcriptional Control of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand by the Protein Kinase A Activator Forskolin and the Transmembrane Glycoprotein 130-Activating Cytokine, Oncostatin M, Is Exerted through Multiple Distal Enhancers. *Molecular Endocrinology* 21, 197–214.
- Kim, S., Yamazaki, M., Zella, L. A., Shevde, N. K., Pike, J. W. (2006). Activation of Receptor Activator of NF- κ B Ligand Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Is Mediated through Multiple Long-Range Enhancers. *Molecular And Cellular Biology* 26, 6469–6486.
- Kirino, Y., Shimizu, H. (1982). Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release from Fragmented Sarcoplasmic Reticulum: A Comparison with Skinned Muscle Fiber Studies. *The Journal Of Biochemistry* 92, 1287–1296.
- Kongsbak, M., von Essen, M. R., Boding, L., Levring, T. B., Schjerling, P., Lauritsen, J. P. H., Woetmann, A., Ødum, N., Bonfeld, C. M., Geisler, C., Bradl, M. (2014). Vitamin D Up-Regulates the Vitamin D Receptor by Protecting It from Proteasomal Degradation in Human CD4⁺ T Cells. *Plos One* 9, 1–12.
- Kreutzer, K., Bassler, D. (2014). Caffeine for Apnea of Prematurity: A Neonatal Success Story. *Neonatology* 105, 332–336.
- Laizure, S. C., Meibohm, B., Nelson, K., Chen, F., Hu, Z.-Y., Parker, R. B. (2017). Comparison of caffeine disposition following administration by oral solution (energy drink) and inspired powder (AeroShot) in human subjects. *British Journal Of Clinical Pharmacology* 83, 2687–2694.

- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., Karsenty, G. (2007). Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* 130, 456–469.
- Lee, W.-P., Jena, S., Doherty, D., Ventakesh, J., Schimdt, J., Furmick, J., Widener, T., Lemau, J., Jurutka, P. W., Thompson, P. D. (2014). Sentrin/SUMO Specific Proteases as Novel Tissue-Selective Modulators of Vitamin D Receptor-Mediated Signaling. *Plos One* 9, 1–12.
- Lian, J. B., Shalhoub, V., Aslam, F., Frenkel, B., Green, J., Hamrah, M., Stein, G. S., Stein, J. L. (1997). Species-Specific Glucocorticoid and 1,25-Dihydroxyvitamin D Responsiveness in Mouse MC3T3-E1 Osteoblasts: Dexamethasone Inhibits Osteoblast Differentiation and Vitamin D Down-Regulates Osteocalcin Gene Expression. *Endocrinology* 138, 2117–2127.
- Liotta, E., Gottardo, R., Seri, C., Rimondo, C., Miksik, I., Serpelloni, G., Tagliaro, F. (2012). Rapid analysis of caffeine in “smart drugs” and “energy drinks” by microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC). *Forensic Science International* 220, 279–283.
- Lips, P. (2010). Worldwide status of vitamin D nutrition. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* 121, 297–300.
- Liu, J. (2012). Vitamin D content of food and its contribution to vitamin D status: a brief overview and Australian focus. *Photochemical & Photobiological Sciences* 11, 1802–1807.
- Makishima, M., Lu, T. T., Xie, W., Whitfield, G. K., Domoto, H., Evans, R. M., Haussler, M. R., Mangelsdorf, D. J. (2002). Vitamin D Receptor As an Intestinal Bile Acid Sensor. *Science* 296, 1313–1316.
- Marangos, P. J., Paul, S. M., Parma, A. M., Goodwin, F. K., Syapin, P., Skolnick, P. (1979). Purinergic inhibition of diazepam binding to rat brain (in vitro). *Life Sciences* 24, 851–857.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Baeza, G., Mateos, R., Bravo-Clemente, L. (2014). Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. *Food Research International* 64, 125–133.
- Masoumi, A., Goldenson, B., Ghirmai, S., Avagyan, H., Zaghi, J., Abel, K., Zheng, X., Espinosa-Jeffrey, A., Mahanian, M., Liu, P. T., Hewison, M., Mizwicki, M., Cashman, J., Fiala, M. (2009). $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ Interacts with Curcuminoids to Stimulate Amyloid- β Clearance by Macrophages of Alzheimer's Disease Patients. *Journal Of Alzheimer's Disease* 17, 703–717.
- McCusker, R. R., Goldberger, B. A., Cone, E. J. (2006). Caffeine Content of Energy Drinks, Carbonated Sodas, and Other Beverages. *Journal Of Analytical Toxicology* 30, 112–114.
- McPherson, P. S., Kim, Y.-K., Valdivia, H., Knudson, C. M., Takekura, H., Franzini-Armstrong, C., Coronadot, R., Campbell, K. P. (1991). The brain ryanodine receptor: A caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* 7, 17–25.
- Mediero, A., Cronstein, B. N. (2013). Adenosine and bone metabolism. *Trends In Endocrinology & Metabolism* 24, 290–300.

- Menegaz, D., Barrientos-Duran, A., Kline, A., Silva, F. R. M. B., Norman, A. W., Mizwicki, M. T., Zanello, L. P. (2010). $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* 119, 127–134.
- Moore, D. D., Kato, S., Xie, W., Mangelsdorf, D. J., Schmidt, D. R., Xiao, R., Kliewer, S. A. (2006). International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I Receptors: Constitutive Androstane Receptor, Pregnane X Receptor, Farnesoid X Receptor, Farnesoid X Receptor beta, Liver X Receptor, Liver X Receptor beta, and Vitamin D Receptor. *Pharmacological Reviews* 58, 742–759.
- Mosavin, R., Mellon, W. S. (1996). Posttranscriptional Regulation of Osteocalcin mRNA in Clonal Osteoblast Cells by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 332, 142–152.
- Mumford, G. K., Benowitz, N. L., Evans, S. M., Kaminski, B. J., Preston, K. L., Sannerud, C. A., Silverman, K., Griffiths, R. R. (1996). Absorption rate of methylxanthines following capsules, cola and chocolate. *European Journal Of Clinical Pharmacology* 51, 319–325.
- Myrtle, J. F., Haussler, M. R., Norman, A. W. (1970). Evidence for the biologically active form of cholecalciferol in the intestine. *The Journal Of Biological Chemistry* 245, 1190–1196.
- Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., Higashio, K. (1998). RANK Is the Essential Signaling Receptor for Osteoclast Differentiation Factor in Osteoclastogenesis. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 253, 395–400.
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives And Contaminants* 20, 1–30.
- Nemere, I., Farach-Carson, M. C., Rohe, B., Sterling, T. M., Norman, A. W., Boyan, B. D., Safford, S. E. (2004). Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)₂D₃ membrane binding protein (1,25D₃-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 101, 7392–7397.
- Neve, A., Corrado, A., Cantatore, F. P. (2013). Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. *Journal Of Cellular Physiology* 228, 1149–1153.
- Noda, M., Vogel, R. L., Craig, A. M., Prah, J., DeLuca, H. F., Denhardt, D. T. (1990). Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 87, 9995–9999.
- Norman, A. W., Mizwicki, M. T., Norman, D. P. G. (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 27–41.

- Norman, A. W., Okamura, W. H., Hammond, M. W., Bishop, J. E., Dormanen, M. C., Bouillon, R., van Baelen, H., Ridall, A. L., Daane, E., Khoury, R., Farach-Carson, M. C. (1997). Comparison of 6-s-cis - and 6-s-trans-Locked Analogs of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Indicates That the 6-s-cis Conformation Is Preferred for Rapid Nongenomic Biological Responses and That Neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-Locked Analogs Are Preferred for Genomic Biological Responses. *Molecular Endocrinology* 11, 1518–1531.
- Norman, A. W., Myrtle, J. F., Midgett, R. J., Nowicki, H. G., Williams, V., Popják, G. (1971). 1,25-dihydroxycholecalciferol: identification of the proposed active form of vitamin D₃ in the intestine. *Science* 173, 51–54.
- Ohyama, Y., Ozono, K., Uchida, M., Shinki, T., Kato, S., Suda, T., Yamamoto, O., Noshiro, M., Kato, Y. (1994). Identification of a vitamin D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene. *The Journal Of Biological Chemistry* 269, 10545–10550.
- Peleg, S., Nguyen, C. V. (2010). The importance of nuclear import in protection of the vitamin D receptor from polyubiquitination and proteasome-mediated degradation. *Journal Of Cellular Biochemistry* 110, 926–934.
- Perera, V., Gross, A. S., Xu, H., McLachlan, A. J. (2011). Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology* 63, 1161–1168.
- Pietras, R. J., Nemere, I., Szego, C. M. (2001). Steroid Hormone Receptors in Target Cell Membranes. *Endocrine* 14, 417–428.
- Price, P. A., Otsuka, A. A., Poser, J. W., Kristaponis, J., Raman, N. (1976). Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 73, 1447–1451.
- Rapuri, P. B., Gallagher, J. C., Kinyamu, H. K., Ryschon, K. L. (2001). Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *The American Journal Of Clinical Nutrition* 74, 694–700.
- Rapuri, P. B., Gallagher, J. C., Nawaz, Z. (2007). Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)₂D₃ stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* 103, 368–371.
- Rebsamen, M. C., Sun, J., Norman, A. W., Liao, J. K. (2002). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Induces Vascular Smooth Muscle Cell Migration via Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Circulation Research* 91, 17–24.
- Rogers, A., Eastell, R. (2005). Circulating Osteoprotegerin and Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand: Clinical Utility in Metabolic Bone Disease Assessment. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90, 6323–6331.

- Ross, A. C., Manson, J. A. E., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., Clinton, S. K., Durazo-Arvizu, R. A., Gallagher, J. C., Gallo, R. L., Jones, G., Kovacs, C. S., Mayne, S. T., Rosen, C. J., Shapses, S. A. (2011). The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96, 53–58.
- Ryan, J. W., Anderson, P. H., Morris, H. A. (2015). Pleiotropic Activities of Vitamin D Receptors – Adequate Activation for Multiple Health Outcomes. *The Clinical Biochemist Reviews* 36, 53–61.
- Safran, J. B., Butler, W. T., Farach-Carson, M. C. (1998). Modulation of osteopontin post-translational state by 1,25-(OH)₂-vitamin D₃. Dependence on Ca²⁺ influx. *The Journal Of Biological Chemistry* 273, 29935–29941.
- Schmid, A., Walther, B. (2013). Natural Vitamin D Content in Animal Products. *Advances In Nutrition: An International Review Journal* 4, 453–462.
- Sigl, V., Penninger, J. M. (2014). RANKL/RANK – From bone physiology to breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25, 205–214.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.-L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89, 309–319.
- Snyder, S. H., Katims, J. J., Annau, Z., Bruns, R. F., Daly, J. W. (1981). Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 78, 3260–3264.
- Sodek, J., Ganss, B., McKee, M. D. (2000). Osteopontin. *Critical Reviews In Oral Biology And Medicine: An Official Publication Of The American Association Of Oral Biologists* 11, 279–303.
- St. Arnaud, R. (2011). CYP24A1: Structure, Function, and Physiological Role. In *Vitamin D* (Boston: Academic Press), pp. 43–56.
- Steitz, S. A., Speer, M. Y., McKee, M. D., Liaw, L., Almeida, M., Yang, H., Giachelli, C. M. (2002). Osteopontin Inhibits Mineral Deposition and Promotes Regression of Ectopic Calcification. *The American Journal Of Pathology* 161, 2035–2046.
- Su, S.-J., Chang, K.-L., Su, S.-H., Yeh, Y.-T., Shyu, H.-W., Chen, K.-M. (2013). Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition* 64, 429–436.
- Sunn, K. L., Cock, T.-A., Crofts, L. A., Eisman, J. A., Gardiner, E. M. (2001). Novel N-Terminal Variant of Human VDR. *Molecular Endocrinology* 15, 1599–1609.

- Taft, J. L., French, M., Danks, J. A., Larkins, R. G. (1984). Opposing actions of methylxanthines and dibutyryl cyclic AMP on 1,25 dihydroxyvitamin D₃ production and calcium fluxes in isolated chick renal tubules. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 121, 355–363.
- Tassinari, M. S., Gerstenfeld, L. C., Stein, G. S., Lian, J. B. (1991). Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. *Journal Of Bone And Mineral Research* 6, 1029–1036.
- Teekachunhatean, S., Tosri, N., Rojanasthien, N., Srichairatanakool, S., Sangdee, C. (2013). Pharmacokinetics of Caffeine following a Single Administration of Coffee Enema versus Oral Coffee Consumption in Healthy Male Subjects. *Isrn Pharmacology* 2013, 1–7.
- Thompson, P. D., Jurutka, P. W., Kerr Whitfield, G., Myskowski, S. M., Eichhorst, K. R., Encinas Dominguez, C., Haussler, C. A., Haussler, M. R. (2002). Liganded VDR induces CYP3A4 in small intestinal and colon cancer cells via DR3 and ER6 vitamin D responsive elements. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 299, 730–738.
- Thorn, C. F., Aklillu, E., McDonagh, E. M., Klein, T. E., Altman, R. B. (2012). PharmGKB summary: caffeine pathway. *Pharmacogenetics And Genomics* 22, 389–395.
- Thummel, K. E., Brimer, C., Yasuda, K., Thottassery, J., Senn, T., Lin, Y., Ishizuka, H., Kharasch, E., Schuetz, J., Schuetz, E. (2001). Transcriptional Control of Intestinal Cytochrome P-4503A by 1 α ,25-Dihydroxy Vitamin D₃. *Molecular Pharmacology* 60, 1399–1406.
- Ting, H.-J., Yasmin-Karim, S., Yan, S.-J., Hsu, J.-W., Lin, T.-H., Zeng, W., Messing, J., Sheu, T.-J., Bao, B.-Y., Li, W. X., Messing, E., Lee, Y.-F. (2012). A Positive Feedback Signaling Loop between ATM and the Vitamin D Receptor Is Critical for Cancer Chemoprevention by Vitamin D. *Cancer Research* 72, 958–968.
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., Higashio, K. (1997). Isolation of a Novel Cytokine from Human Fibroblasts That Specifically Inhibits Osteoclastogenesis. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 234, 137–142.
- Wang, Y., Zhu, J., DeLuca, H. F. (2012). Where is the vitamin D receptor? *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 523, 123–133.
- Wiese, R. J., Uhland-Smith, A., Ross, T. K., Prah, J. M., DeLuca, H. F. (1992). Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. *The Journal Of Biological Chemistry* 267, 20082–20086.
- Yeh, J. K., Aloia, J. F. (1986). Differential effect of caffeine administration on calcium and vitamin D metabolism in young and adult rats. *Journal Of Bone And Mineral Research* 1, 251–258.
- Yi, J., Yan, B., Li, M., Wang, Y., Zheng, W., Li, Y., Zhao, Z. (2016). Caffeine may enhance orthodontic tooth movement through increasing osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells under compression. *Archives Of Oral Biology* 64, 51–60.

- Zanello, L. P., Norman, A. W. (2004). Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 101, 1589–1594.
- Zhou, Y., Guan, X. X., Zhu, Z. L., Guo, J., Huang, Y. C., Hou, W. W., Yu, H. Y. (2010). Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *British Journal Of Pharmacology* 161, 1542–1552.
- Zierold, C., Darwish, H. M., DeLuca, H. F. (1994). Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D_3) 24-hydroxylase gene. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 91, 900–902.
- Zou, A., Elgort, M. G., Allegretto, E. A. (1997). Retinoid X Receptor (RXR) Ligands Activate the Human 25-Hydroxyvitamin D_3 -24-hydroxylase Promoter via RXR Heterodimer Binding to Two Vitamin D-responsive Elements and Elicit Additive Effects with 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 . *Journal Of Biological Chemistry* 272, 19027–19034.
- Zulli, A., Smith, R. M., Kubatka, P., Novak, J., Uehara, Y., Loftus, H., Qaradakhi, T., Pohanka, M., Kobylak, N., Zagatina, A., Klimas, J., Hayes, A., La Rocca, G., Soucek, M., Kruzliak, P. (2016). Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research. *European Journal Of Nutrition* 55, 1331–1343.
- Ženata, O., Vrzal, R. (2017). Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by post-transcriptional and post-translational modifications. *Oncotarget* 8, 35390–35402.