

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2023**

**Tereza Zátopková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Studium účinku chlorovaných derivátů oxindolu  
na aktivitu xenobiotických receptorů AhR a PXR  
v *in vitro* lidských buněčných modelech**

**Bakalářská práce**

**Tereza Zátopková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2023**

**Vedoucí práce: Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza ZÁTOPKOVÁ**  
Osobní číslo: **R20733**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Studium účinku chlorovaných derivátů oxindolu na aktivitu xenobiotických receptorů AhR a PXR v in vitro lidských buněčných modelech.**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Studium vlivu testovaných látek na buněčnou viabilitu. Stanovení aktivity aryluhvodíkového receptoru a pregnanového x receptoru metodou reporter gene assay.
3. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Khetmalis, Y.M. et al. (2021) Oxindole and its derivatives: A review on recent progress in biological activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 141, 111842. 10.1016/j.biopha.2021.111842
2. Stepankova, M. et al. (2018) Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology* 93, 631-644. 10.1124/mol.118.112151
3. Dvořák, Z. et al. (2020) Targeting the pregnane X receptor using microbial metabolite mimicry. *EMBO Mol Med* 12, e11621. 10.15252/emmm.201911621
4. Dvorak, Z. et al. (2020) Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends Pharmacol Sci* 41, 900-908. 10.1016/j.tips.2020.09.013
5. Vyhlidalova, B. et al. (2020) Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Int J Mol Sci* 21. 10.3390/ijms21072614

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.**

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 22. března 2022  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

---

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

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 29. března 2022

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení autora:** Tereza Zátopková

**Název práce:** Studium účinků chlorovaných derivátů oxindolu na aktivitu xenobiotických receptorů AhR a PXR v *in vitro* lidských buněčných modelech

**Typ práce:** Bakalářská práce

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

**Vedoucí práce:** Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2023

**Klíčová slova:** AhR, PXR, deriváty oxindolu, biotransformace, MTT Assay, luciferázová reportérová esej

**Počet stran:** 48

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** český

**Souhrn:** Aryluhlovodíkový receptor (AhR) a pregnanový X receptor (PXR) jsou ligandem aktivované transkripční faktory, které řídí expresi mnoha cílových genů a podílí se na celé řadě fyziologických a patofyziologických dějů probíhajících v těle.

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat vztah mezi strukturou a funkcí chlorovaných derivátů 2-oxindolu s ohledem na transkripční aktivitu AhR a PXR. Transkripční aktivita AhR a PXR byla stanovena pomocí luciferázové reportérové esej po působení derivátů s chlorem v poloze 5, 6 a 7. Bylo zjištěno, že při 4- a 24-hodinovém působení látek na buněčnou linii došlo v porovnání s 2-oxindolem ke zvýšení aktivity AhR především po působení 6-chlor-2-oxindolu, který vykazoval nejvyšší účinnost i potenci. V případě studia účinku na aktivaci PXR, nejvyšší účinnost byla pozorována u 7-chlor-2-oxindolu po 24-hodinovém působení této látky.

Ze získaných výsledků je patrné, že nejúčinnější modifikací 2-oxindolu chlorem je substituce v poloze 6. 6-chlor-2-oxindol je v tomto případě nejúčinnějším aktivátorem AhR s vysokou potencí a zároveň se jedná o selektivního agonistu AhR. Tato práce doplňuje naše znalosti o vlivu začlenění atomu choru do základní struktury 2-oxindolu na aktivitu AhR a PXR.

## **Bibliographical identification**

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

**Title:** Activation of xenobiotic receptors AhR and PXR by chlorinated derivatives of oxindole in human *in vitro* models

**Type of thesis:** Bachelor

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

**Supervisor:** Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

**The year of presentation:** 2023

**Keywords:** AhR, PXR, derivatives of oxindole, biotransformation, MTT Assay, Luciferase Reporter Assay

**Number of pages:** 48

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

**Summary:** The aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the pregnane X receptor (PXR) are ligand-activated transcription factors that control the expression of many target genes and are involved in a range of physiological and pathophysiological processes taking place in the body.

The aim of this bachelor thesis was to observe the relationship between the structure and function of 2-oxindole chlorinated derivatives with regard to AhR and PXR transcription activity. The transcription activity of AhR and PXR was determined using a luciferase reporter assay after exposure to chlorine derivatives at positions 5, 6 and 7. It was found that the 4-hour and 24-hour exposure of the substances to the cellular line resulted in an increase in AhR activity compared to 2-oxindole, especially after the action of 6-chlorine-2-oxindole, which showed the highest efficacy and potency. In the study of the effect on activation of PXR, the highest efficacy was observed with 7-chlorine-2-oxindole after 24-hour action of this substance.

From the results obtained, it is apparent that the most effective modification of 2-oxindole with chlorine is the substitution in position 6. 6-chlorine-2-oxindole

is in this case the most efficient activator of AhR with high potency and at the same time is a selective agonist AhR. This work adds to our knowledge of how incorporation of a chlorine atom into the basic structure of 2-oxindole affects AhR and PXR activity.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Anety Vrzalové, Ph.D. za použití literárních zdrojů, které jsou uvedené v seznamu literatury.

V Olomouci dne: .....

.....

Tereza Zátopková



## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce, Mgr. Anetě Vrzalové, Ph.D., za její vedení, věcné připomínky, vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnovala. Také bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a farmakologie za ochotu a pomoc při práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu, trpělivost a porozumění v průběhu celého mého studia.

# OBSAH

<b>SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>viii</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>xii</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>2</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
3.1 Biotransformace .....	3
3.1.1 I. Fáze biotransformace .....	3
3.1.2 II. Fáze biotransformace .....	5
3.1.3 III. Fáze biotransformace.....	6
3.2 Arylhydroxidový receptor.....	7
3.2.1 Signalizace AhR.....	7
3.2.2 Fyziologické a patofyziologické procesy spojené s AhR.....	9
3.2.3 Ligandy AhR .....	11
3.3 Pregnanový X receptor .....	15
3.3.1 Signalizace PXR .....	16
3.3.2 Fyziologické a patofyziologické procesy spojené s PXR .....	17
3.3.3 Ligandy PXR .....	18
3.4 Receptorová teorie .....	20
3.4.1 Agonismus .....	21
3.4.2 Antagonismus .....	22
3.5 Studované sloučeniny.....	23
<b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>25</b>
4.1 Biologický materiál.....	25
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	25
4.3 Laboratorní pomůcky .....	26

4.4	Přístroje.....	27
4.5	Použité metody.....	27
4.5.1	Kultivace a pasážování buněk.....	27
4.5.2	Příprava buněk na experiment .....	28
4.5.3	Transfekce buněk .....	28
4.5.4	Aplikace derivátů 2-oxindolu a kontrol na buňky .....	29
4.5.5	MTT test .....	30
4.5.6	Test neutrální červeně .....	30
4.5.7	Luciferázová reportérová esej.....	31
4.5.8	Vyhodnocení.....	32
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>33</b>
5.1	Stanovení cytotoxických účinků chlorovaných derivátů 2-oxindolu na buněčnou linii LS174T .....	33
5.2	Vliv chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu AhR.....	35
5.3	Vliv chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu PXR .....	38
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>43</b>

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

3-HAA	3-hydroxyanthranilová kyselina
3-HK	3-hydroxykynurenin
5-HIAA	5-hydroxyindoloctová kyselina
5-HTP	5-hydroxytryptofan
ABC	ATP-binding cassette
ADP	adenosin-5'-difosfát
AF	aktivační funkce
AhR	aryluhlovodíkový receptor
AHREs	AhR responzivní element
AHRR	AhR receptorový represor
ARNT	AhR receptorový jaderný translokátor
ATP	adenosin-5'-trifosfát
AZ-AhR	stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CoA	koenzym A
COMT	katechol O-methyltransferázy
CUL4B	cullin 4B ubiquitin ligásový komplex
CYP450	cytochrom P450
DBD	DNA vazebná doména
dFICZ	6,12-diformylindolo[3,2-b]karbazol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM-CS	Dulbecco's Modified Eagle's Medium s hormonálně inaktivovaným FBS
DMSO	dimethylsulfoxid
DREs	dioxinový responzivní element
DTT	dithiotreitol
E <sub>max</sub>	maximální efektivní koncentrace
EC <sub>50</sub>	poloviční maximální efektivní koncentrace
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESR	estrogenový receptor
FBS	fetální bovinní sérum
FBS-CS	homonálně inaktivované fetální bovinní sérum
FICZ	6-diformylindolo[3,2-b]karbazol
GST	glutathion S-transferázy
HAT	histonová acetyltransferáza
HAHs	halogenované aromatické uhlovodíky
HDAC	histon deacetylázy
hPXR	lidský PXR
Hsp90	heat shock proteiny 90
IAA	indol-3-octová kyselina
IAAld	indol-3-acetaldehyd

IAld	indol-3-aldehyd
IAM	indol-3-acetamid
IBD	zánětlivá střevní onemocnění
ICZ	indol[3,2-b]karbazol
IEL	intraepiteliální T buňky
IL	interleukiny
ILA	indol-3-laktát
ILC	vrozené lymfoidní buňky
IPA	indol-3-propionová kyselina
IPYA	indol-3-pyruvátová kyselina
KD	disociační konstanta
KLF6	Kruppel-Like Faktor 6
LBD	ligand vazebná doména
LS174T	buněčná linie odvozená od karcinomu tlustého střeva
LS180	kavkazská buněčná linie odvozená od karcinomu tlustého střeva
MAP	mitogenem aktivované proteinkinázy
MB-COMT	na membránu navázané katechol O-methyltransferázy
MTT	methylnetrizoliová sůl
NADH	nikotinamin adenin dinukleotid
NAT	N-acetyltransferázy
NC-XRE	nekanonický xenobiotický responzivní element
NF-κB	jaderný faktor κB
NR	jaderný receptor
NR1I2	jaderný receptor podrodiny 1, skupiny I, člen 2
NR Assay	test neutrální červeně
OATP	transportéry organických aniontů
OCT	transportéry organických kationtů
p21 <sup>CIP1</sup>	cyklin-dependentní inhibitor kináz 1
p23	protein 23
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	Per-ARNT-Sim doména
PBS	fosfátový pufr
PEPT	peptidové transportéry
PCBs	polychlorované bifenyly
PCDDs	dibenzo- <i>p</i> -dioxiny
PCDFs	dibenzo- <i>p</i> -furany
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxizómů
PXR	pregnanový X receptor
PXRRE	PXR responzivní element
RAR	receptor kyseliny retinové
RB	retinoblastoma protein
RELA	podjednotka p65 jaderného faktoru κB
RELB	podjednotka jaderného faktoru κB

RIF	rifampicin
RXR	retinoidní X receptor
S-COMT	volné katechol O-methyltransferázy
SLC	solute carrier
SMRT	utišující mediátory retinoidních a thyroïdních receptorů
SOCS2	supresor signalačního cytokininu 2
Src	tyrosinkináza
SRC-1	koaktivátor steroidního receptoru 1
SXR	steroidní a xenobiotický receptor
SULT	sulfotransferázy
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TGF $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$
Th	pomocné T buňky
TIPARP	TCDD indukční poly-(ADP-ribósa) polymeráza
TNF $\alpha$	faktor nekrotizující nádory $\alpha$
Tregs	regulační T buňky
Ub	ubiquitin
UDP	uridin-5'-difosfát
UGT	UDP-glukuronosyltransferázy
XA	xanthurenová kyselina
XAP2	X-asociovaný protein 2
XREs	xenobiotický responzivní element

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Struktura aryluhlovodíkového receptoru (upravené podle Larigot <i>et al.</i> , 2018).....	7
<b>Obrázek 2:</b> Signalizace AhR: A – kanonickou genomickou cestou, B – nekanonickou genomickou cestou (upraveno podle Rothhammer <i>et Quintana</i> , 2019) .....	9
<b>Obrázek 3:</b> Metabolické dráhy tryptofanu (převzato a upraveno podle Roth <i>et al.</i> , 2021) .....	14
<b>Obrázek 4:</b> Struktura pregnanového X receptoru (převzato podle Sayaf <i>et al.</i> , 2022)..	15
<b>Obrázek 5:</b> Přímá aktivace PXR (převzato podle Sayaf <i>et al.</i> , 2022).....	16
<b>Obrázek 6:</b> Příklad dose-response s vyznačenou hodnotou EC <sub>50</sub> (převzato podle Kenakin, 2008).....	21
<b>Obrázek 7:</b> 2-oxindol (A) a jeho deriváty testované v této práci – 5-chlor-2-oxindol (B), 6-chlor-2-oxindol (C), 7-chlor-2-oxindol (D) (upraveno podle <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov</a> ).....	24
<b>Obrázek 8:</b> Vliv působení chlorovaných derivátů 2-oxindolu na viabilitu buněčné linie LS174T po 24-hodinové aplikaci.....	34
<b>Obrázek 9:</b> Vliv působení chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii LS174T po 4-hodinové a 24-hodinové aplikaci.....	37
<b>Obrázek 10:</b> Vliv působení chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu PXR v buněčné linii LS174T po 24-hodinové aplikaci.....	39

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Přehled exogenních a endogenních ligandů AhR .....	12
<b>Tabulka 2:</b> Přehled exogenních a endogenních ligandů PXR .....	19
<b>Tabulka 3:</b> Příprava transfekční směsi .....	28
<b>Tabulka 4:</b> Koncentrace roztoků derivátů 2-oxindolu .....	29



# 1 ÚVOD

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) a pregnanový X receptor (PXR) jsou ligandem aktivované transkripční faktory, které se podílejí zejména na metabolismu xenobiotik. Kromě detoxifikace mají také velmi důležitou roli i v jiných fyziologických procesech, jako je např. regulace buněčného cyklu, homeostáze, energetický metabolismus a imunitní odpověď. Účastní se ale také patofyziologických procesů, jako jsou zánětlivé procesy či karcinogeneze.

AhR a PXR jsou aktivovány širokým spektrem exogenních a endogenních ligandů, mezi které můžeme zařadit enviromentální polutanty, alkaloidy, flavonoidy, pesticidy, léčiva, ale také látky obsažené v potravě. U endogenních ligandů se jedná zejména o metabolity tryptofanu, cholesterolu, hemu a hormony. Výsledkem vazby ligandu na receptor je exprese cílových genů, jejichž produkty se mohou podílet na metabolismu látek v procesu biotransformace.

Biotransformace je chemický proces, který se podílí na metabolismu lipofilních látek s cílem odstranit je z těla. Biotransformační procesy jsou složeny ze tří fází, ve kterých postupně dochází k přeměně těchto sloučenin na polární produkty, snáze vylučitelné z těla ven. Tyto mechanismy probíhají za pomoci specifických enzymů, např. cytochromů P450 a mnoha dalších, jenž se účastní jednotlivých fází biotransformace a jejichž geny jsou exprimovány jadernými receptory.

## **2 CÍLE PRÁCE**

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Studium vlivu testovaných látek na buněčnou viabilitu. Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru a pregnanového X receptoru pomocí luciferázové reportérové eseje
3. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Biotransformace

Biotransformace je klíčový chemický proces odehrávající se v těle, jehož výsledkem je přeměna lipofilních exogenních nebo endogenních látek na látky polární, které lze poté snáze z těla vyloučit. Hlavním cílem biotransformace je pomocí řady enzymů deaktivace látek (hovoříme tady o biodegradaci). Látky se ale také naopak mohou stát farmakologicky aktivnější (hovoříme o bioaktivaci), u některých z nich může dojít k bioaktivaci na farmakologicky účinné formy léčiva nebo naopak ke zvýšené toxicitě, teratogenezi či karcinogenitě. V největší míře se biotransformace odehrává v játrech, ledvinách a střevech ve třech po sobě následujících fázích. V první fázi účinkem hydrolytických, redukčních a oxidačních enzymů dochází k zavedení nebo odkrytí substituentů za vzniku polárnějšího produktu, který je schopen reagovat s konjugáčnými enzymy druhé fáze metabolismu. Třetí fáze se účastní membránové transportéry, např. P-glykoproteiny (Renton, 1986; Meyer, 1996; Almazroo *et al.*, 2017).

#### 3.1.1 I. Fáze biotransformace

Pro fázi I biotransformace jsou důležité především oxidace prostřednictvím enzymů cytochromů P450 (CYP450) nebo další děje např. redukce nebo hydrolyzy. Primární reakcí, která se v této fázi odehrává, je oxidace, jejímž výsledkem je připojení jednoho atomu kyslíku na výchozí léčivo. Dále zde probíhá redukce za účasti dalšího enzymatického systému, a to buď NADH cytochromu-b<sub>5</sub> reductázy nebo NADH cytochromu-c reductázy. Tato cesta je důležitá pro metabolizaci aromatických nitroso, nitro a azo sloučenin. U esterů a amidů probíhá hlavně hydrolyza (Almazroo *et al.*, 2017).

Kromě CYP450 se fáze I účastní i další enzymy, a to flavin obsahující monooxygenázy, monoamin oxygenázy, alkohol dehydrogenázy, aldo-keto reductázy, molybden hydrogenázy, aldehyd dehydrogenázy a hydrolytické enzymy (Almazroo *et al.*, 2017). V průběhu první fáze biotransformace vznikají polárnější látky rozpustné ve vodě, které lze snadněji vyloučit močí.

Cytochromy P450 představují velkou skupinu monooxygenáz metabolizující exogenní látky nebo syntetizují látky tělu vlastní. V lidském genomu jich bylo nalezeno 59, z toho jsou prozkoumány především formy podílející se na metabolismu cizorodých látek včetně léčiv. Mezi nejdůležitější z nich patří CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. Nachází se zejména v játrech

a tenkém střevě, kde jsou vázané na hladkém endoplasmatickém retikulu a na membráně mitochondrií a podílí se na tvorbě žlučových kyselin a metabolismu xenobiotik. Vyskytují se také v mitochondriích ve vaječnicích, varlatech, prsou či placentě, kde syntetizují a degradují steroidní hormony. (Kousalová *et al.*, 2003)

Jedná se o skupinu enzymů, jejichž společnou vlastností je přítomnost prostetické skupiny hemu. Název cytochrom 450 vychází z faktu, že tato skupina enzymů vykazuje po redukci hemoproteinu a vazbě CO charakteristické absorpční maximum okolo 450 nm. Podle stoupající podobnosti aminokyselinové struktury byl enzymatický systém cytochromu P450 rozdělen do rodin (s podobností nejméně 40 %) a podrodin (s podobností nejméně 55 %) a označen arabskými čísly a velkými písmeny. Toto rozdělení je dáno podobností aminokyselinové struktury. Dosud je známo na 18 rodin a 44 podrodin, které se od sebe navzájem liší aminokyselinovou sekvencí, substrátovou specifitou, tkáňovou distribucí a imunitní reakcí (Manikandan *et* Nagini, 2017).

CYP450 katalyzují velké množství reakcí, z nichž nejdůležitější je pravděpodobně hydroxylace. Kromě detoxikačních reakcí může docházet i ke vzniku biologicky aktivnějších substrátů, z pozitivního hlediska se jedná např. o aktivní formy některých léčiv. Na druhou stranu mohou vznikat látky toxické, mutagenní či karcinogenní. Příkladem může být CYP1A2 podílející se na bioaktivaci řady karcinogenů, kdy se indukce může projevit zvýšenou incidencí onkologických onemocnění. Inducibilita formy CYP1A1 zase koreluje s dispozicí vzniku rakoviny plic. Naopak enzymy rodiny CYP3A hrají klíčovou úlohu v biotransformačních procesech xenobiotik i endogenních substrátů. Díky široké substrátové specifitě nás tato rodina cytochromů chrání před škodlivinami z vnějšího prostředí. Cytochromy P450, které se významně podílejí na přeměně prokarcinogenů, jsou především cytochromy P450 1A1, 1A2, 2E1 a 3E4. Cytochromy P450 1A1 a 1A2 jsou nejvýznamnější, bereme-li v úvahu jejich úlohu při aktivaci prokarcinogenů (environmentálních chemikálií, toxických látek a toxických léčiv) (Stiborová *et al.*, 1999; Dostálek *et al.*, 2006).

Některá léčiva způsobují zvýšenou enzymatickou aktivitu (indukci) nebo tuto aktivitu tlumí (inhibují), čímž může dojít ke změně metabolismu podaného léčiva s následnou změnou jeho farmakologického účinku. Případně může dojít k intoxikaci (Guengerich, 1997).

K indukci cytochromů dochází transkripčními i netranskripčními mechanismy jako je stabilizace mRNA, inhibice degradace proteinů či stabilizace enzymů. Geny patřící do rodiny cytochromů 1–4 jsou aktivovány xenobiotiky přes aryluhlovodíkový receptor (AhR), pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR) a receptory aktivované proliferátory peroxizómů (PPAR receptory). Tyto transkripční faktory kromě CYP450 aktivují i další enzymy podílející se na biotransformaci, a to např. glutathion S-transferázu nebo glukuronosyl transferázu (Manikandan *et* Nagini, 2017).

Inhibice cytochromů probíhá na základě interakcí léčivo-léčivo a jejich vzájemné kompetice o vazebné místo na enzymu, což vede k toxicitě nebo ke snížení účinku léčiva. Příkladem může být zvýšení biodostupnosti léčiva (např. cyklosporinu) zvýšením jeho pozitivních nebo negativních účinků po konzumaci grapefruitového džusu, který obsahuje bergamotin a jeho deriváty, jež působí inhibiči presystémového metabolismu léčiv v tenkém střevě (Kousalová *et al.*, 2003; Manikandan *et* Nagini, 2017).

Jejich funkce je ovlivněna mnoha fyziologickými faktory jako je věk, pohlaví, hormony, genetický polymorfismus, ale také patofyziologickými stavy kam spadá rakovina, cholestáza či záněty (Manikandan *et* Nagini, 2017).

### **3.1.2 II. Fáze biostransformace**

Během fáze II dochází k enzymatické konjugaci vzniklého biotransformačního meziprojektu z I. fáze s hydrofilními endogenními sloučeninami za pomoci transferázových enzymů, nejčastěji UDP-glukuronosyltransferáz (UGT), sulfotransferáz (SULT), N-acetyltransferáz (NAT), katechol O-methyltransferáz (COMT), glutathion S-transferáz (GST) a dalších. Výsledkem této interakce je látka velmi polární (s výjimkou acetylace), která není schopna se reabsorbovat a je proto vyloučena z organismu (Almazroo *et al.*, 2017).

UGT katalyzují konjugační reakci s kyselinou glukuronovou, jedná se o nejvýznamnější biodegradační proces druhé fáze biotransformace. Jsou známy 4 rodiny UGT – UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8, kdy nejvíce exprimovaným zástupcem je UGT1A1 metabolizující bilirubin, některé fenoly a estradioly. Další zástupci UGT metabolizují opiáty a karboxylové kyseliny. UGT jsou nejvíce exprimovány v játrech a střevech (Almazroo *et al.*, 2017).

NAT metabolizují látky na rozdíl od ostatních enzymů na produkty, které mají lipofilní povahu a mohou být dokonce více toxické než výchozí sloučeniny. Dělí se na dvě

podrodiny, na NAT1 a NAT2, které jsou lokalizovány v cytosolu a využívají acetylkoenzym A jako kofaktor pro metabolické reakce (Almazroo *et al.*, 2017).

COMT odpovídají za metylaci katecholaminů, katecholových estrogenů, včetně neurotransmiterů jako je dopamin, adrenalin a noradrenalin. Nejvíce jsou exprimované v postsynaptických neuronech. Existují dvě formy COMT. Volné (S-COMT) a na membránu vázané (MB-COMT), které se liší ve substrátové specifitě (Almazroo *et al.*, 2017).

SULT jsou důležité pro metabolismus endogenních sloučenin jako jsou steroidy, eikosanoidy, katecholamin, ale také serotoninu, dopaminu a retinolu. Stejně jako UGT jsou exprimovány téměř ve všech orgánech s převahou jater, střev, ale také plic, ledvin, krevních buněk, mozku a placentě. Celkem existuje 13 různých SULT rozdělených do 4 rodin – SLUT1, SLUT2, SLUT4 a SLUT6 (Almazroo *et al.*, 2017).

GST se účastní metabolismu exogenních i endogenních sloučenin a hrají klíčovou roli při detoxifikaci těla od volných radikálů, s čímž je spojená ochrana těla před oxidačním stresem a vznikem nádorového onemocnění (Almazroo *et al.*, 2017).

### **3.1.3 III. Fáze biotransformace**

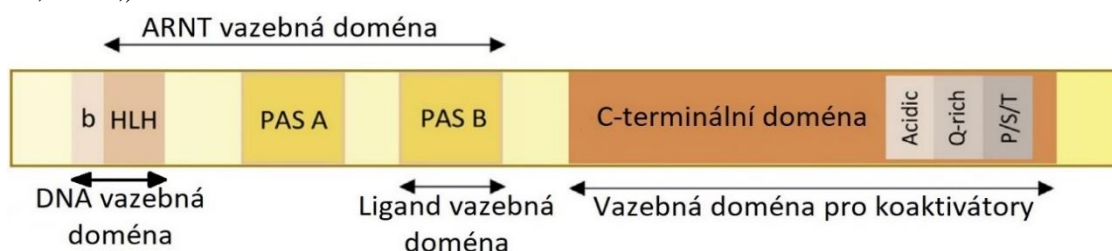
Významnou roli v absorpci, distribuci a vylučování látek hrají tzv. nosiče neboli transportéry. Tento proces transportu xenobiotika z buňky se považuje za III. fázi biotransformace. Membránové přenašeče jsou obecně děleny na dvě hlavní transportní superrodiny, ABC (ATP-binding cassette) a SLC transportéry (solute carrier). ABC transportéry pro svoji funkci potřebují energii ve formě ATP pro přenos látek přes buněčnou membránu, zatímco SLC transportéry využívají pro přenos jiné látky či ionty, na které se metabolity navážou. Transportéry lze tedy dělit podle toho, jakým způsobem přijímají energii potřebnou pro transport. Mezi primární transportéry řadíme ABC transportéry. Mezi sekundární a terciální transportní proteiny řadíme peptidové transportéry (PEPT), transportéry organických aniontů (OATP) či transportéry organických kationtů (OCT). Dále je lze dělit podle směru transportu na ty, které importují látky dovnitř buněk a na ty, které transportují látky ven z buněk, popřípadě dle epiteliální lokalizace na apikální a basolaterální transportéry (Almazroo *et al.*, 2017).

## 3.2 Aryluhlovodíkový receptor

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) neboli také dioxinový receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který byl poprvé identifikován v myších játrech Polandem a spol. jako receptor, který váže toxikant 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). V současné době je kromě TCDD známo velké množství exogenních i endogenních ligandů, které aktivují AhR receptor (Poland *et al.*, 1976; Stejskalova *et al.*, 2011).

AhR je exprimován ve všech myších tkáních, v lidských tkáních je jeho exprese vysoká zejména v brzlíku, játrech, střevech a plicích. Dále byla jeho exprese pozorovaná také v placentě či slezině (Puga *et al.*, 2009; Stejskalova *et al.*, 2011).

Skládá se z několika domén, které jsou důležité pro jeho správnou funkci (Obr. 1). První doménou je bHLH doména (basic Helix-Loop-Helix), která mu umožňuje dimerizaci s ARNT (aryluhlovodíkový receptorový jaderný translokátor), interakci s chaperony Hsp90 a navázání na DNA. Další důležitou doménou je PAS doména (Per-ARNT-Sim), která obsahuje dvě strukturní repetice A a B. Repetice A slouží k navázání na ARNT a vytvoření heterodimeru a repetice B umožňuje navázání ligandu do LBD (ligand vazebné domény). Další doménou je C-terminální doména, která slouží ko-aktivátorům a ko-represorům k interakci s AhR (Stejskalova *et al.*, 2011; Larigot *et al.*, 2018;).



**Obrázek 1:** Struktura aryluhlovodíkového receptoru (upravené podle Larigot *et al.*, 2018)

### 3.2.1 Signalizace AhR

AhR řídí transkripci široké škály genů zapojených do metabolismu xenobiotik, imunitní homeostázy, buněčného cyklu, diferenciaci buněk a energetického metabolismu několika signalizačními cestami, z nichž nejvíce prostudovanou je právě genomická cesta (Larigot *et al.*, 2018). U ní se rozlišují dvě dráhy – kanonická a nekanonická, kterými může dojít po aktivaci AhR k transkripci genů. Jednotlivé dráhy se liší svým heterodimerizačním partnerem pro AhR a následně cílovou sekvencí, na kterou se váží (Jackson *et al.*, 2015).

AhR je v neaktivní formě (bez navázaného ligandu) lokalizován v cytoplazmě,

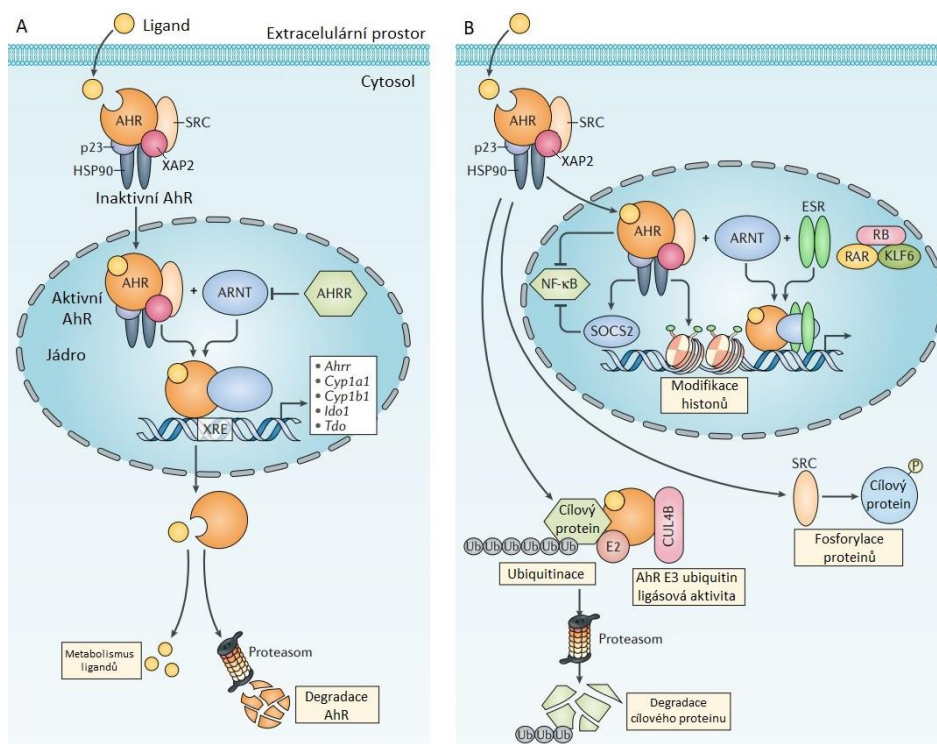
kde společně s dimerem chaperonů – heat shock proteinů 90 (Hsp90), ko-chaperony p23 a imunofilinu podobnému proteinu XAP2 (X-asociovaný protein 2) vytváří multiproteinový komplex. Studie také ukázaly přítomnost Src kináz v tomto komplexu, díky němuž je AhR stabilizován v cytosolu a není mu umožněn přechod do jádra (Petruilis *et al.*, 2003; Puga *et al.*, 2009; Larigot *et al.*, 2018).

Po navázání endogenního či exogenního ligandu se AhR uvolní z multiproteinového komplexu a je transportován do jádra. Zde dojde k navázání AhR na aryluhlovodíkový receptorový jaderný translokátor (ARNT) za vzniku heterodimeru AhR-ARNT. Vzniklý heterodimer se naváže na DNA přes AhR responzivní element (AHREs), nazývaný také jako dioxinový responzivní element (DREs) či xenobiotický responzivní element (XREs). Ten je lokalizovaný na promotoru cílového genu a má specifickou sekvenci 5'-GCGTG-3'. Po regulaci genové exprese dojde k odpojení AhR z DNA a exportu z jádra zpět do cytosolu. Zde je označen ubiquitinem a degradován v proteasomech (Obr. 2A). Tímto způsobem probíhá kanonická dráha AhR (Guyot *et al.*, 2013; Larigot *et al.*, 2018; Neavin *et al.*, 2018).

AhR tak reguluje velké množství genů, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, TCDD indukční poly-(ADP-ribósa) polymeráza (TIPARP) či represor aryluhlovodíkového receptoru (AHRR). Indukcí exprese konkurenčního represoru AHRR dochází k negativní zpětnovazebné regulaci vlastní signalizace AhR, jelikož AhR soutěží o vazebné místo do ARNT právě s AHRR, který je strukturně podobný AhR. Následně může transkripčně neaktivní dimer AHRR/ARNT interagovat s DRE a tím blokovat transkripční aktivitu AhR (Larigot *et al.*, 2018; Neavin *et al.*, 2018).

Nekanonická dráha stejně jako kanonická dráha, která byla popsána výše, začíná transportem AhR z cytoplazmy do jádra po jeho aktivaci ligandem (Jackson *et al.*, 2015). Zde se neváže na ARNT, ale interaguje s jiným partnerem, např. s transkripčním faktorem NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) nebo s KLF6 (Kruppel-Like Factor 6), se kterým vytvoří heterodimer (Obr. 2B), jenž se naváže do NC-XRE vazebného místa promotoru cílového genu o repetitivní sekvenci 5'-GGGA-3'. NF- $\kappa$ B je strukturně příbuzný eukaryotický transkripční faktor, který má důležitou roli v adaptivní a buněčné odpovědi, buněčné diferenciaci, apoptóze či zánětlivých onemocnění. Je složený z několika podjednotek, zejména z RelA a RelB, se kterými interaguje AhR. Ten se přesně naváže na cílové geny, jejichž expresi indukuje, např. interleukin 6 (Vogel *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2015).





**Obrázek 2:** Signalizace AhR: A – kanonickou genomickou cestou, B – nekanonickou genomickou cestou (upraveno podle Rothhammer *et* Quintana, 2019)

CUL4B = cullin 4B ubuquitin ligasový komplex, ESR = estrogenový receptor, P = fosfor, RAR = receptor kyseliny retinové, RB = retinoblastoma protein, SOCS2, = supresor signalačního cytokininu 2, Ub = ubiquitin

Aktivita AhR může být také ovlivněna negenomickou cestou – kaskádou signalizačních událostí, které zahrnují fosforylaci proteinu prostřednictvím mnoha kináz, jako jsou např. MAP kinázy, či protein kinázy A nebo C, a regulaci hladiny vápenatých iontů (Puga *et al.*, 2009; Guyot *et al.*, 2013; Larigot *et al.*, 2018).

### 3.2.2 Fyziologické a patofyziologické procesy spojené s AhR

AhR byl dlouho považován za transkripční mediátor xenoprotektivních a léčiva metabolizujících genů. Nicméně v poslední době se řada publikací zabývá jeho rolí ve fyziologických procesech (např. vývoj orgánů, detoxikace, regulace buněčného cyklu a apoptózy, proliferace, diferenciace, imunitní odpověď a komunikace mezi hostitelem a mikrobiomem) a také patofyziologických procesech (chronický zánět, diabetes, kardiovaskulárních chorob a karcinogeneze). Bylo zjištěno, že AhR reguluje geny zapojené do výše zmíněných procesů např. p21<sup>CIP1</sup> (cyklin-dependentní inhibitor kinás 1), IL-6 (interleukin 6), IL-22 (interleukin 22) a mnoha dalších (Stejskalova *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2015; Rothhammer *et* Quintana, 2019; Lin *et al.*, 2022). Z tohoto výčtu je zřejmé, že terapeutické cílení AhR je vysoce aktuální téma.

AhR je nezbytným regulátorem vrozeného imunitního systému střeva, který je zodpovědný za funkci střevní bariéry a mikrobiální homeostázy (Chen *et al.*, 2020). AhR je exprimován různými imunitními buňkami, jako jsou intraepiteliální T buňky (IEL), regulační T buňky (Tregs), T-Helper 17 (Th17) buňky, vrozené lymfoidní buňky (ILC), makrofágy, dendritické buňky a neutrofilové. Lidská střevní mikroflóra produkuje širokou škálu mikrobiálních metabolitů aktivujících AhR, které často vykazují nízkou afinitu pro AhR. Ukázalo se, že tato nižší endogenní hladina aktivovaného AhR je prospěšná při udržování imunitního zdraví a homeostázy střeva (Vrzalová *et al.*, 2022).

AhR se účastní diferenciace různých skupin T-lymfocytů, především pomocných Th1, Th2 a Th17 buněk a navíc se podílí na regulaci rovnováhy mezi T regulačními (Treg) a Th17 lymfocyty. Aktivovaný AhR hraje významnou roli v indukci a modulaci zánětů prostřednictvím ovlivnění produkce některých prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů (interleukiny IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, faktor nekrotizující nádory TNF $\alpha$ , transformující růstový faktor TGF $\beta$ ) (Lin *et al.*, 2022).

Dále je AhR také velmi důležitý pro správný vývoj jedince, vývoj a funkci imunitního systému, s nímž souvisí již zmíněná diferenciace T-lymfocytů, ale také reakce na patogeny ať už mikrobiálního či virového původu nebo na parazity (Neavin *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2022). Účastní se též organogeneze, kdy jeho aktivace vede k uzavření *ductus venosus*, což je spojení mezi pupeční žílou a dolní dutou žílou vytvořené u plodu (Walisser *et al.*, 2004). AhR se také podílí na adhezi buněk, jejich migraci a buněčném dělení, kdy je schopný jej podpořit nebo utlumit prostřednictvím cyklinů a cyklin-dependentních kináz (Larigot *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2022).

Kromě výše zmíněných fyziologických procesů se AhR účastní také mnoha patofyziologických procesů, jako jsou různá chronická onemocnění, např. revmatoidní artritida, psoriáza nebo ateroskleróza. Za jejich rozvoj či zhoršení příznaků zodpovídají kromě genetických faktorů právě také enviromentální polutanty či cigaretový kouř obsahující ligandy AhR. Je známo, že se AhR podílí na diferenciaci keratinocytů. Jeho nevhodná aktivace dioxiny má za následek rozvoj kožního onemocnění chlorakné (Bock *et Köhle*, 2006; Neavin *et al.*, 2018).

Známý je také negativní vliv TCDD na lidský organismus, jelikož právě aktivace AhR pomocí TCDD vede k endokrinní disrupci s možným vyústěním v celou řadu toxicit v těle, jmenovitě rakovina či endometrióza. Ačkoliv působí AhR jako nádorový supresor, účastní se také samotné indukce nádorů a jejich proliferace, migrace a invaze (Bock *et*

Köhle, 2006; Lin *et al.*, 2022).

AhR se vlivem imunitních procesů podílí na zánětlivých střevních onemocněních (IBD, inflammatory bowel disease), ale také na alergických reakcích či astmatu. Mezi zánětlivá střevní onemocnění patří zejména Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida, což jsou autoimunitní onemocnění, u nichž byl zjištěn snížený obsah endogenních ligandů AhR v krevním séru pacientů oproti zdravým jedincům. AhR zde může být při léčbě použit jako terapeutický cíl, jelikož některé jeho ligandy, např. tryptofan a jeho deriváty, 6-formylindolo[3,2-*b*]karbazol (FICZ) nebo norisoboldin, mohou regulovat tato onemocnění – zmírňovat příznaky nebo dokonce působit jako prevence. Příkladem může být právě FICZ, který prostřednictvím AhR chrání před vyvinutím kolitidy snížením produkce prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-17) a zvýšením produkce protizánětlivých cytokinů (IL-22) z lymfocytů Th17 (Neavin *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2022).

### 3.2.3 Ligandy AhR

AhR je aktivován velkým množstvím ligandů, které můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin, na endogenní a exogenních. Dále je můžeme rozdělit na látky antropogenního původu, kam se řadí různé škodliviny či léčiva, a na látky přírodní, kterými jsou jak exogenní, tak i endogenní ligandy AhR (Abel *et Haarmann-Stemmann*, 2010; Stejskalova *et al.*, 2011).

#### 3.2.3.1 Exogenní ligandy AhR

Exogenní ligandy se dělí na environmentální polutanty ať už přírodní či syntetické, patří sem ale také polycyklické (PAHs) a halogenované (HAHs) aromatické uhlovodíky, pesticidy, ligandy získané z potravy, léčiva a jiné ligandy, např. syntetické flavonoidy (Abel *et Haarmann-Stemmann*, 2010; Murray *et al.*, 2014.; Neavin *et al.*, 2018; Shinde *et McGaha*, 2018).

Nejvíce obsaženou skupinou exogenních syntetických ligandů jsou si navzájem příbuzné polycyklické a halogenované aromatické uhlovodíky, které se navzájem liší svojí stabilitou. Stabilnější jsou HAHs oproti PAHs, které vykazují nižší afinitu a je jim tak k aktivaci AhR zapotřebí mnohem větší množství – jedná se o rozmezí koncentrací od  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , u HAHs o rozmezí od  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Denison *et Nagy*, 2003). Hlavním zdrojem aromatických uhlovodíků je pro člověka kontaminované jídlo, jehož prostřednictvím lze do těla dostat až 90 %. Dalšími zdroji jsou např. lesní požáry, vulkanické erupce, spalování fosilních paliv a odpadků či cigaretový kouř.

Mezi nejznámější PAHs a HAHs patří polychlorované bifenyly (PCBs), dibenzo-*p*-furany (PCDFs), dibenzo-*p*-dioxiny (PCDDs) jako je TCDD, benzo[*a*]pyren, benzo[*a*]antracen a mnoho dalších (Denison *et Nagy*, 2003; Stejskalova *et al.*, 2011; Larigot *et al.*, 2018).

Do skupiny exogenních ligandů řadíme i pesticidy jako je karbaryl a thiabendazol. Mezi přirozeně se vyskytující exogenní ligandy patří polyfenoly, a to např. flavonoidy jako je resveratrol, quercetin, kaempferol, které můžeme najít v různých druzích ovoce či zeleniny, nebo alkaloidy jako je berberin a harman. Exogenními ligandy jsou ale i léčiva, kdy příkladem může být lék diosmin používající se při léčení žilních onemocnění nebo také benzimidazolové deriváty omeprazol a lansoprazol, které se používají pro inhibici protonových pump při léčbě žaludečních vředů či gastroezofageálního refluxu. Zmíněné exogenní ligandy s dalšími příklady jsou uvedené v Tabulce 1 (Denison *et Nagy*, 2003; Abel *et Haarmann-Stemmann*, 2010; Stejskalova *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014; Larigot *et al.*, 2018;).

**Tabulka 1:** Přehled exogenních a endogenních ligandů AhR

Typy ligandů	Původ	Zástupci
Exogenní	HAHs	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)
		další dibenzo- <i>p</i> -dioxiny
		dibenzo- <i>p</i> -furany
	PAHs	3-methylchloranthren
		antracen
		benzo[ <i>a</i> ]antracen
		benzo[ <i>a</i> ]pyren
		naftalen
	Alkaloidy	berberin
		harman
	Léčiva	diosmin
		lamprazol
		omeprazol
		tranilast
	Potrava	galangin
		indol-3-karbinol
		karotenoidy
		kaempferol
quercetin		
resveratrol		
Pesticidy	tryptofan	
	karbaryl	
	thiabendazol	

Typy ligandů	Původ	Zástupci
Endogenní	Mikroflóra	3-methylindol (skatol)
		indirubin
		indol
		indol-3-acetát
		indol-3-aldehyd
		indol-3-laktát
		indol-3-pyruvát
		indolo[3,2- <i>b</i> ]karbazol (ICZ)
		malassezin
		tryptamin
	Metabolity tryptofanu	6-formylindolo[3,2- <i>b</i> ]karbazol (FICZ)
		6,12-diformylindolo[3,2- <i>b</i> ]karbazol (dFICZ)
		L-kynurenin
		kyselina kynureninová
		kyselina xanturenová
Další ligandy	bilirubin	
	biliverdin	
	equilenin	
	hemin	
	indigo	
	indirubin	
	lipoxin A4	
prostaglandiny		

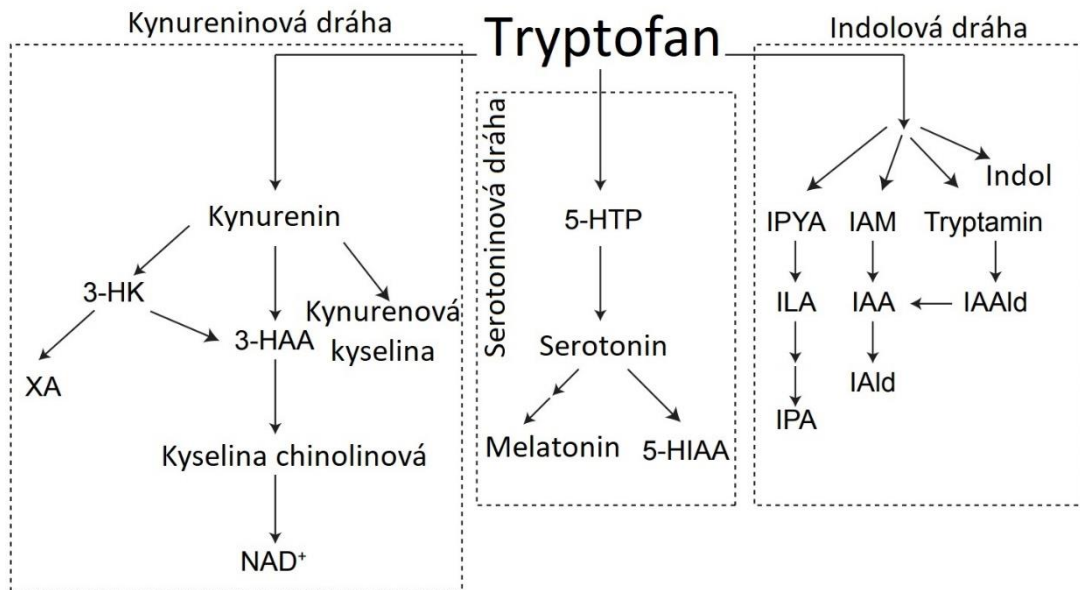
Převzato z Stejskalova *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014; Shinde *et McGaha*, 2018; Vyhlídalová *et al.*, 2020b.

### 3.2.3.2 Endogenní ligandy AhR

Endogenní ligandy jsou látky syntetizující se ve vyšších organismech mezi něž patří např. equilenin, indigoidy (indigo a indirubin detekované v lidské moči), deriváty tryptofanu, oxindoly, metabolity hemu (bilirubin, biliverdin a hemin) a eikosanoidy (lipoxin A4 s protizánětlivou rolí v organismu a metabolity kyseliny arachidonové – prostaglandiny) (Stejskalova *et al.*, 2011).

Důležitým zdrojem látek aktivujících AhR jsou mikroorganismy nacházející se ve střevech nebo na kůži. Jejich vlivem dochází k přeměně L-tryptofanu získaného z potravy. Příkladem mohou být střevní bakterie jako je *Escherichia coli* a *Lactobacillus reuteri*, které metabolizují tryptofan na indol a jeho deriváty – indol-3-acetát, indol-3-aldehyd, nebo kožní kvasinky rodu *Malassezia* syntetizující indirubin, indolo[3,2-*b*]karbazol [ICZ] a malassezin. Dále se mezi mikrobiální metabolity aktivující AhR řadí tryptamin, skatol, indol-3-laktát, indol-3-pyruvát a další ligandy uvedené v Tabulce 1 (Murray *et al.*, 2014; Rothhammer *et Quintana*, 2019).

Tryptofan je v gastrointestinálním traktu metabolizován střevní mikrobiotou třemi dráhami – kynureninovou, serotoninovou a indolovou dráhou (Obr. 3), na L-kynurenin a jeho metabolity jako kyselinu kynurenovou a xanturenovou, dále na indol a jeho deriváty a serotonin. V kůži se vlivem UV záření tryptofan mění na výše zmíněný FICZ nebo 6,12-diformylindolo[3,2-*b*]karbazol (dFICZ) (Stejskalova *et al.*, 2011; Shinde *et McGaha*, 2018; Dvořák *et al.*, 2021; Roth *et al.*, 2021).



**Obrázek 3:** Metabolické dráhy tryptofanu (převzato a upraveno podle Roth *et al.*, 2021)

3-HAA = 3-hydroxyanthranilová kyselina, 3-HK = 3-hydroxykynurenin, 5-HIAA = 5-hydroxyindoloctová kyselina, 5-HTP = 5-hydroxytryptofan, IAA = indol-3-octová kyselina, IAAld = indol-3-acetaldehyd, IAld = indol-3-aldehyd, IAM = indol-3-acetamid, ILA = indol-3-laktát, IPA = indol-3-propionová kyselina, IPYA = indol-3-pyruvátová kyselina, NAD<sup>+</sup> = nikotinamid adenin dinukleotid, XA = xanthurenová kyselina

### 3.3 Pregnanový X receptor

Pregnanový X receptor (PXR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který se řadí do rodiny jaderných receptorů (NR). Jako první byl objeven v roce 1998 Kliewerem a spol. myší PXR a následně také lidský PXR (hPXR). Ten se také nazývá steroidní a xenobiotický receptor (SXR) a reaguje na odlišné ligandy než myší PXR (Kliewer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2008b; Dvořák *et al.*, 2020).

Původně byl PXR označován jako sirotčí receptor aktivovaný pouze syntetickými a přírodními steroidy. Nyní se o něm mluví jako o adoptovaném sirotčím jaderném receptoru, jelikož bylo identifikováno mnoho endogenních ligandů, které se na něj váží. Jedná se např. o žlučové kyseliny, estrogeny či vitamín K. Váže ale také exogenní ligandy, jako jsou některé léky, výživové doplňky a enviromentální škodlivé látky a reguluje jejich metabolismus indukcí biotransformačních enzymů I. a II. fáze biotransformace (Dvořák *et al.*, 2020).

PXR je exprimován zejména v játrech, tenkém a tlustém střevě, dvanáctníku a žlučníku, díky čemuž má důležitou roli při mnoha biologických dějích (Chai *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2020).

NR1I2 gen kódující PXR se nachází na chromozomu 3, konkrétně v místech 3q12-q13.3. protein PXR receptoru se skládá ze 434 aminokyselin. V rámci krystalické struktury PXR proteinu, byly identifikovány čtyři domény – N-terminální oblast s doménou s aktivační funkcí 1 (AF-1), DNA-vazebná doména (DBD) spojená pantovou oblastí s C-terminální ligand-vazebnou doménou (LBD), která obsahuje na ligandu závislou doménu s aktivační funkcí 2 (AF-2) a je zodpovědná za heterodimerizaci s retinoidním X receptorem (RXR) (Obr. 4) (Zhang *et al.*, 2008b; Xing *et al.*, 2020; Sayaf *et al.*, 2022;).



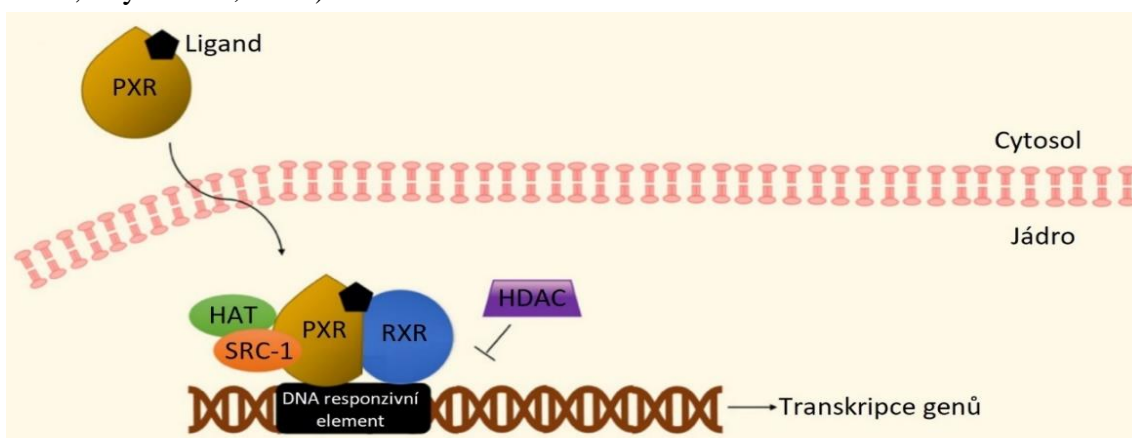
**Obrázek 4:** Struktura pregnanového X receptoru (převzato podle Sayaf *et al.*, 2022)

### 3.3.1 Signalizace PXR

Existují dva mechanismy pro aktivaci PXR. Přímá, na ligandu závislá aktivace PXR, a nepřímá, na ligandu nezávislá aktivace (Sayaf *et al.*, 2022).

Přímá aktivace u myši spočívá v translokaci PXR z cytoplazmy do jádra po navázání ligandu. Lidský PXR je lokalizován přímo v jádře a v klidovém stavu (bez navázaného ligandu) je utlumen represory, jako jsou utišující mediátory retinoidních a thyroidních receptorů (SMRT). Po navázání ligandu se PXR odpojí a na jejich místo se napojí koaktivátory, jako je např. koaktivátor 1 steroidního receptoru (SRC-1). PXR následně dimerizuje s retinoidním X receptorem  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) za vzniku heterotetramerického komplexu (Obr. 5). Poté se pomocí motivu zinkových prstů přítomných v DBD naváže na PXR responzivní element (PXRRE) DNA v promotorové oblasti cílových genů. Koaktivátory následně zaktivují sekundární koaktivátory a s chromatinem spojené enzymy, jako je např. histonová acetyltransferáza (HAT), které vytvoří multiproteinový komplex. HAT reorganizuje chromatin cílových genů a umožní přístup komponent RNA polymerázy II. Výsledkem je následná regulace exprese genů enzymů I. a II. fáze biotransformace, jmenovitě CYP3A4, CYP2B, glutathion S-transferázy a další enzymy a přenašeče metabolizující léčiva (P-glykoprotein – protein mnohočetné lékové rezistence). Cílem je ochránit tělo před zvyšující se koncentrací toxických látek a jejich následného negativního dopadu na organismus (Kodama *et Negishi*, 2013; Mackowiak *et Wang*, 2016; Rigalli *et al.*, 2021; Sayaf *et al.*, 2022).

Nepřímá aktivace PXR je založena na posttranslačních modifikacích jako je fosforylace, acetylace, ubiquitinace, sumoylace či poly-ADP-ribosylace (Xing *et al.*, 2020; Sayaf *et al.*, 2022).



**Obrázek 5:** Přímá aktivace PXR (převzato podle Sayaf *et al.*, 2022)

HDAC = histon deacetylázy



### 3.3.2 Fyziologické a patofyziologické procesy spojené s PXR

O PXR se hovoří jako o promiskuitním receptoru, který může ve své velké flexibilní ligand vazebné kapse vázat široké spektrum ligandů a kontrolovat expresi řady biotransformačních enzymů. To se považuje za jeho hlavní fyziologickou funkci. Dnes známe celou řadu fyziologických procesů, kterých se PXR účastní – homeostáze, energetický metabolismus, regulace buněčné proliferace, a také patofyziologických procesů, včetně infekce, zánětlivých onemocnění, karcinogeneze a pozastavení buněčného dělení (Oladimeji *et* Chen, 2018; Xing *et al.*, 2020; Rigalli *et al.*, 2021).

Kromě toho se PXR podílí na regulaci metabolismu glukózy a lipidů v játrech. Potlačuje expresi klíčových enzymů glukoneogeneze, glukózy-6-fosfatázy a fosfoenolpyruvát karboxykinázy, což vede ke snížení hladiny glukózy. Naopak podporuje syntézu triglyceridů a snižuje  $\beta$ -oxidaci a ketogenezi (Kodama *et* Negishi, 2013; Chai *et al.*, 2020). PXR má důležitou roli v udržování homeostázy steroidů, jehož aktivací se zvýší koncentrace aldosteronu a kortikosterolu v plasmě. Dále regulací enzymů CYP3A4 a CYP24 udržuje homeostázu vitamínu D potřebného pro správný růst a vývoj kostí. PXR také udržuje homeostázu cholesterolu a žlučových kyselin snížením exprese cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylázy (CYP7A1), čímž dochází ke zpomalení biotransformace cholesterolu na žlučové kyseliny způsobující cholestázu (Zhang *et al.*, 2008b). Jeho činností dochází k ochraně před hyperbilirubinemií způsobenou nedostatkem enzymů, např. UGT1A1, které právě PXR exprimuje. Tyto enzymy jsou důležité pro správné vylučování bilirubinu do žluče a zabránění tak možné neurotoxicitě způsobené jeho akumulací v krvi. Dále zprostředkovává protizánětlivou, protiapoptickou odpověď a ochrannou reakci proti oxidačnímu stresu a chrání buňku před poškozením DNA vyvolaným benzo-[a]-pyrenem zvýšením aktivity enzymů metabolizujících tuto látku. To vyústí v její detoxifikaci a odstranění z těla (Zhang *et al.*, 2008b; Xing *et al.*, 2020).

Kromě výše zmíněných fyziologických procesů se PXR účastní i mnoha patofyziologických procesů. Jedním z nich může být zastavení buněčného cyklu v nádorových buňkách, které tak nevykazují růst, proliferaci a migraci. Na druhou stranu se účastní proliferace a inhibice apoptózy v játrech, aby mohla proběhnout regenerace (Xing *et al.*, 2020). Hraje také roli v patogenezi zánětlivých střevních onemocnění (inflammatory bowel disease, IBD), jako je Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida, které jsou spojeny s dysfunkcí a chronickými záněty trávicího traktu. Právě aktivací PXR

dojde k inhibici jaderného faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), klíčového regulátoru zánětlivé a imunitní odpovědi, a následné zánětlivé odpovědi organismu. Vystavením PXR jeho ligandu rifampicinu může dojít k morfologickým změnám v buňce, reorganizaci aktinových filament a zvýšení buněčné migrace. Dále byla prokázána tumor podporující aktivita PXR a jeho vliv na rezistenci vůči chemoterapii nadregulací cílových genů zapojených do metabolismu léčiv a negativní změně jejich účinku (Zhang *et al.*, 2008b; Oladimeji *et Chen*, 2018; Chai *et al.*, 2020;).

### 3.3.3 Ligandy PXR

PXR je aktivován velkým množstvím ligandů, které se dělí do dvou hlavních skupin – na exogenní a endogenní. Celkově se jedná o velmi strukturně odlišné látky zahrnující léky na předpis, přírodní léčiva, enviromentální polutanty, potravinové doplňky a bakteriální metabolity (Zhang *et al.*, 2008b; Rigalli *et al.*, 2021).

#### 3.3.3.1 Exogenní ligandy PXR

Exogenními ligandy aktivující PXR jsou enviromentální polutanty, syntetická a přírodní léčiva, rostlinné ligandy a ligandy získané z potravy (Zhang *et al.*, 2008b).

Mezi léčiva aktivující PXR patří antibiotika (rifampicin, jakožto jeho nejznámější ligand, ritonavir a klotrimazol). Dalšími klinickými léčivy aktivující PXR jsou antineoplastická léčiva (paklitaxel (Taxol<sup>®</sup>), taximofen a cyklofosamid). Dále inhibitory HIV-proteáz, antivirotika (rilpivirin, efavirenz) protizánětlivá léčiva (dexametazon), sedativa (fenobarbital, glutetimid) a mnoho dalších léčiv uvedených v Tabulce 2 (Zhang *et al.*, 2008b; Cheng *et al.*, 2012; Rigalli *et al.*, 2021).

K přírodním léčivům aktivujícím PXR se řadí látky obsažené v rostlinách jako je klanopraška čínská a lékořice uralská, ty způsobují zvýšení metabolismu antikoagulantu warfarinu. Mezi rostlinné ligandy patří také hyperforin z třezalky tečkované, kava kava a gugulipid (Zhang *et al.*, 2008b; Kodama *et Negishi*, 2013).

K rostlinným ligandům se řadí flavonoidy – quercetin, tamarixetin a isorhamnetin, stejně jako sulforafan, koumestrol, nigramid a genistein. V potravě obsažené vitaminy K a E jsou také ligandy PXR (Zhang *et al.*, 2008b; Rigalli *et al.*, 2021).

Enviromentální polutanty aktivující PXR jsou polychlorované bifenyle, organochlorové pesticidy, polybromované bifenylethery a ftaláty (Zhang *et al.*, 2008b; Dvořák *et al.*, 2020).

**Tabulka 2:** Přehled exogenních a endogenních ligandů PXR

Typy ligandů	Původ	Zástupci
Exogenní	Léčiva	cyklofosamid
		dexametazon
		efavirenz
		enilkonazol
		fenobarbital
		flukonazol
		glutetimid
		gugulipid
		ketokonazol
		klotrimazol
		medazepam
		midazolam
		paklitaxel
		rifampicin
		rifamixin
	rilpivirin	
	ritonavir	
	taximofen	
	troglitazon	
	Enviromentální polutanty	ftaláty
organochlorové pesticidy		
polybromované bifenyloethery polychlorované bifenyly		
Flavonoidy	isorhamnetin	
	quercetin	
	tamarixetin	
Potrava	vitamin E	
	vitamin K	
Rostlinné ligandy	genistein,	
	koumestrol	
	sulforafan	
Hormony	estrogeny	
	progesteron	
Endogenní	Metabolity tryptofanu	indol
		indol-3-acetamid
		indol-3-acetát
		indol-3-aldehyd
		indol-3-laktát
		indol-3-pyruvát
		skatol
tryptamin		
Metabolity cholesterolu	žlučové kyseliny	

Převzato z Zhang *et al.*, 2008b; Cheng *et al.*, 2012; Kodama *et Negishi*, 2013; Dvořák *et al.*, 2020; Rigalli *et al.*, 2021.

### 3.3.3.2 Endogenní ligandy PXR

Endogenní ligandy PXR jsou látky syntetizující se ve vyšších organismech, mezi které se řadí žlučové kyseliny a jejich prekurzory, hormony a produkty metabolismu tryptofanu (Zhang *et al.*, 2008b; Dvořák *et al.*, 2020; Rigalli *et al.*, 2021).

Žlučové kyseliny jsou koncovým produktem metabolismu cholesterolu a jsou velmi důležité pro tvorbu žluči. (Zhang *et al.*, 2008b). Steroidní hormony jako jsou estrogeny a progesteron se řadí také mezi ligandy PXR. Mezi produkty L-tryptofanu aktivující PXR se řadí tryptamin, indol, skatol, indol-3-acetát, indol-3-aldehyd, indol-3-ethanol, indol-3-laktát a další deriváty indolu uvedené v Tabulce 2 (Dvořák *et al.*, 2020).

## 3.4 Receptorová teorie

Receptorová teorie popisuje vztah mezi ligandem a receptorem a má svůj základ v zákoně o aktivní hmotě. Jedná se o reakci, kdy se ligand naváže na receptor za vzniku reversibilního komplexu ligand-receptor, což má za následek změnu konformace receptoru, která vyústí ve stimulaci buňky a následnou buněčnou odpověď. Rovnice, které tuto interakci popisují, mají svůj základ v kinetice interakcí malých molekul a kinetice Michaelise a Mentenové pro studium enzymů a jejich substrátů (Kenakin, 1989; Tallarida, 1995; Berns *et al.*, 2007).

Aktivace receptoru je popsána jako mechanismus zámku a klíče, kdy ligandy mohou způsobit svým nasednutím na receptor jeho konformační změnu s následným vyvoláním buněčné odpovědi. Schopnost látky navázat se na daný receptor s určitou silou se nazývá afinita a je vyjádřena disociační konstantou  $K_D$ .  $K_D$  představuje koncentraci ligandu potřebného k obsazení 50 % populace receptoru a čím nižší je její hodnota, tím vyšší je afinita. Zde platí, že látky s vyšší afinitou mají také vyšší potenci, neboli schopnost vyvolat měřitelnou odpověď. Pro jejich navázání na receptor tak bude potřeba mnohem menší koncentrace na rozdíl od látek s nižší afinitou, které potřebují větší koncentraci (Welliver, 2013; Berg *et al.*, 2018).

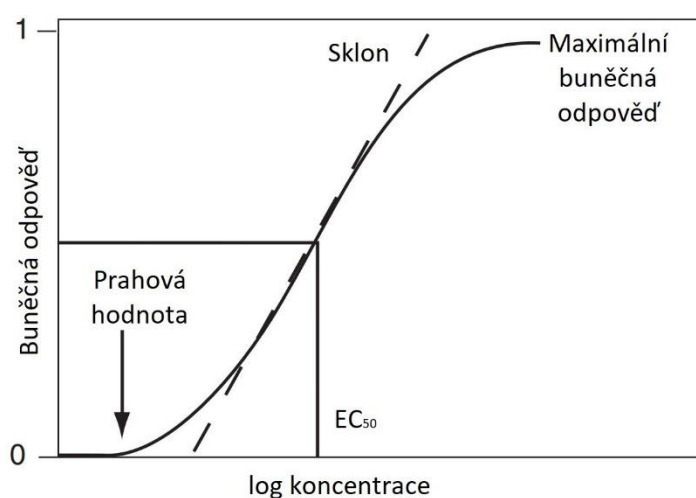
Receptorová teorie také určuje vztah mezi dávkou a odpovědí, který je vyjádřen pomocí křivky. Z ní lze získat dva parametry – hodnotu  $E_{max}$  (maximální efektivní koncentraci) a hodnotu  $EC_{50}$  (koncentrace ligandu při níž je dosaženo poloviny hodnoty  $E_{max}$ ). Čím nižší je hodnota  $EC_{50}$ , tím vyšší je účinnost ligandu způsobit měřitelnou funkční změnu. Ačkoli afinita určuje schopnost ligandu vázat se na receptor, neurčuje funkční důsledky vyplývající z této interakce. Naproti tomu účinnost zahrnuje jak

schopnost ligandu vázat se na receptor, tak vyvolat funkční odpověď. Nazývá se také vnitřní aktivitou, která vyjadřuje relativní maximální účinek látky ve srovnání s přirozeným endogenním ligandem nebo modelovým ligandem receptoru (Kenakin, 1989; Kenakin, 2008; Dvořák *et Cvek*, 2011.; Welliver, 2013; Berg *et Clarke*, 2018).

Důležité je ovšem zmínit, že po navázání dané látky nemusí dojít k aktivaci receptoru, ale také k jeho inaktivaci. Látky aktivující receptor a vyvolávající následnou buněčnou odpověď se nazývají agonisté a látky, které receptor inaktivují a buněčnou odpověď nevyvolávají, se nazývají antagonisté. Záleží ovšem na typu tkáně, jelikož v jednom typu se agonista může chovat jako full-agonista a v jiném typu může mít vlastnosti parciálního agonisty. Antagonista se naopak může chovat někde jako reversibilní antagonist a jinde jako ireversibilní nekompetitivní antagonist (Tallarida, 1995; Welliver, 2013).

### 3.4.1 Agonismus

Jak již bylo zmíněno výše, agonisté jsou látky schopné vyvolat po svém navázání na receptor buněčnou odpověď, jako je např. otevření iontových kanálů s následnou změnou polarizace membrány, či uvolnění, katalýza nebo inhibice jiných sloučenin. Citlivost receptoru na agonistu nebo také potenci agonisty znázorňuje křivka závislosti buněčné odpovědi na logaritmu koncentrace agonisty (Obr. 6). Je charakterizována třemi parametry – prahovou hodnotou, sklonem a maximální buněčnou odpovědí. Hlavním parametrem je výše zmíněná hodnota  $EC_{50}$ , která určuje koncentraci agonisty při níž došlo k 50% maximální odpovědi (Tallarida, 1995; Welliver, 2013).



**Obrázek 6:** Příklad dose-response s vyznačenou hodnotou  $EC_{50}$  (převzato podle Kenakin, 2008)

Agonisty můžeme rozdělit na full-agonisty a parciální agonisty. Full-agonisté mají vysokou účinnost, takže už jeho malá koncentrace stačí k obsazení receptoru a dosažení maximální odpovědi. U parciálních agonistů je ale maximální dosažená odpověď mnohem menší než u full-agonistů, takže pokud soutěží o společný receptor, parciální agonisté blokují efekt full-agonistů (Kenakin, 2008).

### **3.4.2 Antagonismus**

Antagonisté na rozdíl od agonistů inaktivují receptor a redukují či ruší aktivitu jiných sloučenin, právě agonistů. Je-li receptor vystaven vlivu antagonisty a agonisty současně, vazba antagonisty na receptor brání nebo redukuje vazbu agonisty na daný receptor a tím snižuje míru buněčné odpovědi. Stupeň redukce navázání agonisty souvisí s koncentrací antagonisty, na jeho afinitě k danému receptoru a také na jeho účinnosti vyvolat funkční odpověď (Tallarida, 1995; Welliver, 2013).

Antagonismus můžeme rozdělit na reversibilní a ireversibilní, kdy reversibilní antagonismus se dále dělí na kompetitivní a nekompetitivní.

Při kompetitivním antagonismu spolu dvě látky, kdy jedna je agonista a druhá je antagonist, soupeří o vazbu na stejný receptor. V obou případech se jedná o reversibilní vazbu na receptor. Přítomnost antagonisty snižuje koncentraci komplexu receptor-agonista a tím i účinek agonisty. Jedná-li se o full-agonistu, nedojde ke snížení jeho účinku snížením množství jeho komplexu s receptorem pomocí antagonisty, pokud nemá dostatečně vysokou koncentraci. Na sílu jejich účinku má tedy vliv jejich koncentrace, ale také afinita k danému receptoru, jelikož při vysoké afinitě antagonisty může dojít ke snížení účinku agonisty už při nízké koncentraci. Nekompetitivní antagonismus nastane, když navázaný antagonist zablokuje přístup agonisty k receptoru (Tallarida, 1995; Kenakin, 2008).

Ireversibilní antagonismus nastává, když se antagonist naváže na receptor pomocí kovalentní vazby, čímž se může snížit množství receptorů pro navázání agonisty na nulu a efekt agonisty se neprojeví (Tallarida, 1995).

### 3.5 Studované sloučeniny

2-oxindoly jsou třída heterocyklických aromatických organických sloučenin složených z benzenového kruhu spojeného s pyrolovým kruhem, který má v pozici 2 karbonylovou skupinu ( $-C=O$ ). Správný chemický název 2-oxindolu je tedy 1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on a existuje ve dvou hydroxylových tautomerních formách. Také může být označován jako 2-indolinon, jelikož se jedná o derivát indolu (Kaur *et al.*, 2016; Khetmalis *et al.*, 2021).

Přirozeně se vyskytují v gastrointestinálním traktu jako tryptofanové deriváty, kde vznikají působením bakterií střevní mikroflóry metabolizujících L-tryptofan na indol, jenž je následně metabolizován na 2-oxindol (Obr. 7) za přítomnosti enzymů tryptofánáz. Proto také bývá nazýván jako „lidský metabolit indolu“ (Riggio *et al.*, 2010; Khetmalis *et al.*, 2021).

2-oxindoly mohou být produkovány a nalezeny i v mnoha dalších tkáních a tělních tekutinách, např. v mozku. Jelikož se jedná o látky všudypřítomné, v přírodě je můžeme najít také v bakteriích, v bezobratlých a v rostlinách jako alkaloidy (Kaur *et al.*, 2016; Riggio *et al.*, 2010).

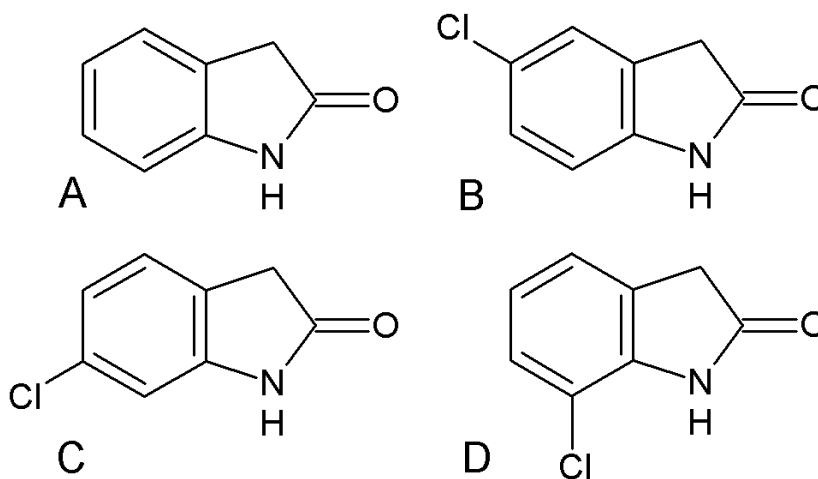
První známý 2-oxindol byl extrahován z rostliny řemdihák plstnatý, známý též jako kočičí dráp. Jedná se o dřevnatou liánu rostoucí v Amazonských deštných pralesích a dalších částech Jižní Ameriky (Kaur *et al.*, 2016; Khetmalis *et al.*, 2021).

Jelikož je 2-oxindol produktem metabolismu tryptofanu působením střevních mikroorganismů, které se podílí na vývoj imunitního systému a tkáňové a metabolické homeostáze, má společně s dalšími jeho deriváty, jmenovitě indol, indol-3-aldehyd, 3-methyl-indol a tryptamin, důležitou roli právě v homeostáze, imunitní odpovědi a správné funkci střevní bariéry. Proto se 2-oxindoly používají při léčbě infekce, artritidy, rakoviny, žaludečních vředů a dalších zánětlivých onemocnění, včetně tradiční medicíny (Kaur *et al.*, 2016; Khetmalis *et al.*, 2021; Vrzalová *et al.*, 2022).

Kromě přírodních, je známá i celá řada syntetických derivátů 2-oxindolu, které se mohou používat při léčbě různých onemocnění pro své protirakovinné, antioxidační, antibakteriální, neuroprotektivní a analgetické účinky. Působí i jako inhibitory kinázové aktivity a agonisté  $\beta_3$  adrenergního receptoru (Kaur *et al.*, 2016).

Deriváty 2-oxindolu substituované v různých pozicích, zejména v pozicích C3, C4, C5 a N1, vykazují odlišné vlastnosti a biologickou aktivitu. Zejména spiro-oxindoly a deriváty se substituenty v 3. a 5. pozici na benzenovém kruhu mají vysokou

farmakologickou aktivitu. Deriváty se substituovanými halogeny, jako je brom a chlor, na uhlíku v pozici 4 a 5 mají značnou antibakteriální aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím. Také substituce na pyrolovém kruhu v pozici 3 zvyšují antibakteriální účinky těchto látek (Kaur *et al.*, 2016; Khetmalis *et al.*, 2021).



**Obrázek 7:** 2-oxindol (A) a jeho deriváty testované v této práci – 5-chlor-2-oxindol (B), 6-chlor-2-oxindol (C), 7-chlor-2-oxindol (D) (upraveno podle <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)



## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Pro stanovení cytotoxicity derivátů 2-oxindolu byla použita adherentní buněčná linie LS174T (ATCC, kat. č. CL-188; 7 000 3535) odvozená od karcinomu tlustého střeva. Pro hodnocení transkripční aktivity AhR byla použita stabilně transfekovaná linie LS174T-AhR. Tato linie byla připravena stabilní transfekcí buněčné linie LS174T plazmidem pGL-4.27-DRE, který nese gen pro rezistenci na hygromycin.

Pro hodnocení transkripční aktivity PXR byla linie LS174T transientně transfekovaná plazmidem pSG5-hPXR a reportérovým vektorem p3A4-luc.

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

- 0,04% roztok trypanové modři v H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, kat. č. T6146)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, kat. č. T4049)
- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, ULTRA Scientific, 48599)
- 2-oxindol (Sigma-Aldrich, kat. č. 59-48-3)
- 5-chlor-2-oxindol (Sigma-Aldrich, kat. č. 127485)
- 6-chlor-2-oxindol (Sigma-Aldrich, kat. č. 636215)
- 7-chlor-2-oxindol (Sigma-Aldrich, kat. č. 691712)
- dimethylsulfoxid (DMSO, Lach:ner, kat. č. 20022-CT0-M1000-1)
- fosfátový pufr (PBS, Serana, kat. č. BDL-001)
- FUGENE HD (Promega, kat. č. E231A)
- hygromycin B (SantaCruz Biotechnology, SC-29067)
- kultivační médium DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s přísadkami:
  - 5 ml L-glutaminu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540)
  - 5 ml neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)
  - 5 ml roztoku antibiotik (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333)
  - 50 ml fetálního bovinního séra (FBS; Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, kat. č. F6178)
- kultivační médium DMEM-CS: Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s přísadkami:
  - 5 ml L-glutaminu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540)
  - 5 ml neesenciálních aminokyselin (Gibco, kat. č. 11140-035)

- 5 ml roztoku antibiotik (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333)
- 50 ml hormonálně inaktivního fetálního bovinního séra (FBS-CS; Fetal Bovine Serum Charcoal Stripped, Sigma-Aldrich, kat. č. F6765)
- lyzační pufr (5X Reporter Lysis Buffer; Promega, kat. č. E397A)
- methylnitrotetrazoliová sůl (MTT, Sigma-Aldrich, kat. č. M2128)
- Neutral Red Assay Kit – Cell Viability (Abcam, kat. č. ab234039)
- oktylfenol etoxylát (Triton X-100, Serva, kat. č. 37240)
- Opti-MEM (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546)
- rifampicin (RIF, Sigma-Aldrich, kat. č. R3501)
- substrát pro luciferázu:
  - 1,23 mg kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, Sigma-Aldrich, kat. č. E6511)
  - 1,32 ml trisacetát-EDTA pufr  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (pH 7,8) (Sigma-Aldrich, kat. č. T8280)
  - 5 mg D-luciferin (Sigma-Aldrich, kat. č. L9504)
  - 6,83 mg koenzym A (CoA, Sigma-Aldrich, kat. č. C4282)
  - 9,6 mg adenosin-5'-trifosfát (ATP, Sigma-Aldrich, kat. č. A6419)
  - 30,3 mg heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich, kat. č. M5921)
  - 168 mg dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, kat. č. 43819)
  - doplněné do 30 ml deionizovanou vodou

### 4.3 Laboratorní pomůcky

- 96-jamková bílá destička na měření luminiscence (NUNC)
- 96-jamková černá destička na měření luminiscence (NUNC)
- 96-jamkové kultivační destičky (TPP)
- automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5  $\mu\text{l}$ , 0,5 – 10  $\mu\text{l}$ , 10 – 100  $\mu\text{l}$ , 20 – 200  $\mu\text{l}$ , 100 – 1000  $\mu\text{l}$  (Eppendorf)
- buničina (Tork)
- Bürkerova komůrka (Assistent)
- krycí sklička 22x22mm (Menzel Gläser)
- mikrozkušavky o objemech 0,5 ml, 1,5 ml, 5 ml (BIOplastics)

- multikanálové pipety v rozsahu 0,5 – 10  $\mu$ l, 10 – 100  $\mu$ l, 30 – 300  $\mu$ l (Eppendorf)
- nastavitelná multikanálová pipeta 15 – 300  $\mu$ l (Eppendorf)
- Petriho misky o objemech 40 ml a 60 ml (TPP)
- pipetor FastPette (Labnet)
- plastová nádobka o objemu 125 ml (TPP)
- plastové kultivační lahve 75 ml a 150 ml (TPP)
- plastové stojany na zkumavky a mikrozkušavky
- plastové špičky v rozsahu 0,1 – 10  $\mu$ l, 2 – 200  $\mu$ l, 20 – 300  $\mu$ l, 100 – 1000  $\mu$ l (Eppendorf)
- plastové zkumavky o objemech 15 ml a 50 ml (TPP)
- sterilní plastové pipety o objemech 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)

#### 4.4 Přístroje

- aspirátor FTA-1 (Biosan)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (N-Biotek)
- hlubokomrazicí box (Green Line)
- laminární box Labculture (ESCO)
- multifunkční modulární reader Infinite M200 (Tecan)
- světelný mikroskop (Novel Optics)
- třepačka Mini-Rocker Shaker MR-12 (Biosan)
- vodní lázeň LCB 11D (Daihan Labtech)
- vortex Reax top (Heidolph)

#### 4.5 Použité metody

##### 4.5.1 Kultivace a pasážování buněk

Buňky LS174T byly kultivovány v kultivační láhvi v inkubátoru při 37 °C v 95% vlhkosti a atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Samotné pasážování probíhalo za přísně sterilních podmínek v laminárním boxu. Buňky byly kultivovány pomocí DMEM média ohřátým společně s fosfátovým pufrům (PBS) a 0,25% trypsinem ve vodní lázni na 37 °C. Po odsátí média z kultivační láhve byly buňky opláchnuty 5 ml PBS. Po odsátí PBS byl na buňky napipetován 1 ml 0,25% trypsinu a buňky byly umístěny na 5 minut do inkubátoru k trypsinizaci při 37 °C. Po trypsinizaci následovalo rozsuspendování

buněk 9 ml média o dno kultivační láhve a jejich přepipetování do plastové zkumavky. Z ní byly zpět do láhve odebrány 2 ml resuspendovaných buněk společně s 18 ml média a láhev byla umístěná do inkubátoru. Buňky byly pasážovány vždy v rozpětí 3 až 4 dnů.

#### 4.5.2 Příprava buněk na experiment

Při přípravě buněk na experiment byly buňky zpasážovány a resuspendovány. Následně byla suspenze přenesena do plastové zkumavky, z níž bylo přepipetováno 10  $\mu$ l suspenze buněk do mikrozukavky, do které bylo připipetováno 90  $\mu$ l 0,04% trypanové modři. Po promíchání byla směs nanesena do Bürkerovy komůrky pro zjištění množství buněk, ze kterého byla vypočítána jejich hustota. Buněčná suspenze byla po naředění DMEM médiem, u luciferázové reportérové eseje DMEM-CS médiem, napipetována do 96-jamkové destičky. U testu neutrální červeně bylo potřebné, aby jedna jamka obsahovala 20 000 buněk v 200  $\mu$ l kultivačního média, u MTT testu 40 000 buněk a u luciferázové reportérové eseje 80 000 buněk pro 4-hodinový test a 40 000 buněk pro 24-hodinový test. Buňky byly u všech testů vysety přímo na 96-jamkovou destičku, pouze u luciferázové reportérové eseje pro PXR receptor byly buňky před vysetím transientně transfekované. Následně byly destičky s vysetými buňkami umístěny do inkubátoru k 24-hodinové inkubaci při 37 °C, 95% vlhkosti a atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaci bylo médium z jamek odsáto a byly aplikovány testované látky.

#### 4.5.3 Transfekce buněk

Buňky LS174T byly pro luciferázovou reportérovou esej při testování receptoru PXR transfekovány plazmidem pSG5-hPXR a reportérovým vektorem p3A4-luc pomocí transfekčního činidla FUGENE HD. Transfekční směs byla připravena na základě množství jednotlivých látek na jednu jamku uvedeného v Tabulce 3 a celkového počtu transfekovaných jamek pro daný experiment.

**Tabulka 3:** Příprava transfekční směsi

Jednotlivé látky	Množství na 1 jamku
Optimem	6,33 $\mu$ l
FUGENE HD	0,40 $\mu$ l
PXR	0,03 $\mu$ g
p3A4-luc	0,10 $\mu$ g

Nejdříve bylo smícháno činidlo FUGENE HD s Optimem. Za jejich následné 5-minutové inkubace byl smíchán plazmid pSG5-hPXR s reportérovým vektorem p3A4-luc. Po pěti minutách byla tato směs plazmid – vektor přidána do směsi FUGENE HD – Optimem a 20 minut inkubována. Takto připravená transfekční směs byla smíchána se suspenzí buněk naředěnou DMEM-CS médiem a vyseta na 96-jamkovou destičku. Destička byla poté umístěna do inkubátoru k 24-hodinové inkubaci při 37 °C, 95% vlhkosti a atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaci bylo médium z jamek odsáto za následné aplikace testovaných látek.

#### 4.5.4 Aplikace derivátů 2-oxindolu a kontrol na buňky

Deriváty 2-oxindolu (5-chlor-2-oxindol, 6-chlor-2-oxindol a 7-chlor-2-oxindol) byly rozpuštěny v DMSO a naředěny na zásobní roztoky o koncentracích uvedených v Tabulce 4. Tyto zásobní roztoky se poté při aplikaci látek na 96-jamkové destičky ředily DMEM médiem 1000x na koncentrace uvedené v Tabulce 4, u luciferázové eseje pro stanovení aktivity PXR receptoru se látky ředily depletovaným DMEM médiem.

**Tabulka 4:** Koncentrace roztoků derivátů 2-oxindolu

Zásobní roztoky	1 000x ředěné roztoky
1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
200 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Pro MTT test a test neutrální červeně bylo použito DMEM médium s 0,1% DMSO jako negativní kontrolou a s 2% Tritonem jako pozitivní kontrolou. Látky byly společně s kontrolami aplikovány v tetraplikátu, u testu neutrální eseje v pentaplikátu, po 200  $\mu\text{l}$  na jamku a destička byla následně umístěna do inkubátoru na 24 hodin.

U luciferázové reportérové eseje pro testování aktivity AhR bylo jako negativní kontrola použito depletované DMEM médium s 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola depletované DMEM médium s 10 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD, v jednom testu s 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  2-oxindolem. Pro testování aktivity PXR receptoru bylo jako negativní kontrola použito depletované DMEM médium s 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola

depletované DMEM médium s  $10\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  RIF. Látky byly společně s kontrolami aplikovány na 96-jamkovou destičku v pentaplikátu a umístěny do inkubátoru na 4 a 24 hodin u testování aktivity AhR receptoru, na 24 hodin u testování aktivity PXR receptoru.

#### 4.5.5 MTT test

MTT test slouží ke studiu vlivu látek na buňky, kdy se sleduje, při jakých koncentracích jsou dané látky pro buňky toxické. Test je založený na redukcí žlutě zbarvené methylnitrotetrazoliové soli na fialový formazan pomocí dehydrogenáz. Dehydrogenázy jsou aktivní v mitochondriích pouze u živých nepoškozených buněk. Sleduje se tedy viabilita buněk, jelikož množství vzniklého fialového produktu je přímo úměrné životnosti buněk. Vyhodnocení je spektrofotometrické při 595 nm, kdy se měří intenzita vzniklého zbarvení na jejímž základě se stanoví viabilita buněk.

Po 24-hodinové inkubaci buněk s testovanými látkami, byly látky vyklepnuty z 96-jamkové destičky, která byla osušena buničinou. Následně byly jamky promyty 100  $\mu\text{l}$  PBS po jehož vyklepnutí a opětovném osušení destičky bylo do jamek napipetováno 100  $\mu\text{l}$  MTT naředěného DMEM médiem na výslednou koncentraci  $0,3\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Destičky byly následně umístěny do inkubátoru k inkubaci na 20 minut do vytvoření modro-fialově zbarvených krystalků. Po 20 minutách byla destička opět vyklepnuta, osušena a do jamek bylo napipetováno 70  $\mu\text{l}$  DMSO. Destičky byly jemně protřepány a po rozpuštění krystalků byla pomocí spektrofotometru Infinite 200 změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Z výsledných hodnot byla následně stanovena viabilita buněk, a to ve formě procent vztažených k DMSO jako k negativní kontrole, která představovala 100% životnost buněk.

#### 4.5.6 Test neutrální červeně

Test neutrální červeně (NR assay) je test viability buněk, který je založený na principu hromadění červeného barviva 3-amino-7-dimethylamino-2-methylefenazin hydrochloridu v lysozomech živých buněk. Množství červeného barviva uloženého v lysozomech je tak přímo úměrné životnosti buněk. Vyhodnocení je spektrofotometrické při 540 nm, kdy se měří intenzita vzniklého zbarvení na jejímž základě se stanoví viabilita buněk.

Po 24-hodinové inkubaci buněk s testovanými látkami byly látky vyklepnuty z 96-jamkové destičky, která byla osušena buničinou. Následně byly jamky promyty

200 µl 1X promývacího roztoku po jehož vyklepnutí a opětovném osušení destičky bylo do jamek napipetováno 150 µl roztoku neutrální červení naředěné s DMEM médiem v poměru 1:99. Destičky byly následně umístěny do inkubátoru k inkubaci na 2 hodiny. Po uplynulé době byla destička opět vyklepnuta, osušena a jamky byly propláchnuty 250 µl 1X promývacího roztoku. Roztok byl následně vyklepnut a osušená destička byla ponechána k vyschnutí. Poté bylo do jamek napipetováno 150 µl solubilizačního roztoku a destička byla umístěna na kývačku na 20 minut. Následně byla pomocí spektrofotometru Infinite 200 změřena absorbance při vlnové délce 540 nm. Z výsledných hodnot byla stanovena viabilita buněk ve formě procent vztažených k DMSO jako k negativní kontrole, která představovala 100% životnost buněk.

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

Luciferázová reportérová esej je metoda jejíž pomocí se zjišťuje vliv látek na aktivitu jaderných receptorů měřením množství emitovaného světla vzniklého oxidací substrátu luciferinu. Princip spočívá v navázání aktivního receptoru na promotor a následné expresi genu pro enzym luciferázu, jež katalyzuje oxidaci luciferinu. Množství emitovaného světla je tedy přímo úměrné aktivitě receptorů.

Pro navázání aktivovaného receptoru se musí do dané buněčné linie transfekovat reportérový vektor p3A4-luc se zaklonovaným promotorem pro vazbu receptoru a genem pro luciferázu. Jelikož pro měření aktivity receptoru AhR byla použita již transfekovaná linie LS174T-AhR, byla potřebná pouze transfekce linie LS174T pro měření aktivity receptoru PXR.

Po 4-hodinové a 24-hodinové inkubaci buněk s testovanými látkami, byly látky vyklepnuty z 96-jamkové destičky, která byla osušena buničinou. Následně byly jamky promyty 80 µl PBS po jehož vyklepnutí a opětovném osušení destičky bylo do jamek napipetováno 20 µl 1X reportérového lyzačního pufru. Destička byla následně umístěna do skříňového mrazícího boxu při  $-80^{\circ}\text{C}$  k zamražení minimálně na 20 minut. Po 20 minutách byla destička umístěna na třepačku k rozmražení a poté bylo 6 µl lyzátu přepipetováno na bílou 96-jamkovou desku pro měření aktivity AhR receptoru nebo na černou 96-jamkovou desku pro měření aktivity PXR receptoru. K lyzátu bylo připipetováno 30 µl substrátu pro luciferázu a pomocí spektrofotometru Infinite 200 v programu I-Controll byla změřena luminiscence. Naměřené hodnoty ze všech opakování byly zprůměrovány a jako fold indukce u agonistického módu z nich byla vyjádřena luciferázová aktivita vztažená k DMSO jako k negativní kontrole.

Luciferázová aktivita byla v antagonistickém módu vyjádřena jako procenta vztažená k TCDD či RIF jako k pozitivní kontrole, která představovala 100 %.

#### **4.5.8 Vyhodnocení**

MTT test byl proveden ve čtyřech na sebe nezávislých experimentech, test neutrální červeně byl proveden pouze jednou a luciferázová reportérová esej byla provedena ve třech experimentech pro AhR i PXR receptor. Pomocí studentského *t*-testu byly stanovené statisticky průkazné rozdíly výsledků v porovnání s kontrolami. Tyto rozdíly byly signifikantní na hladině pravděpodobnosti  $p < 0,05$ .



## 5 VÝSLEDKY

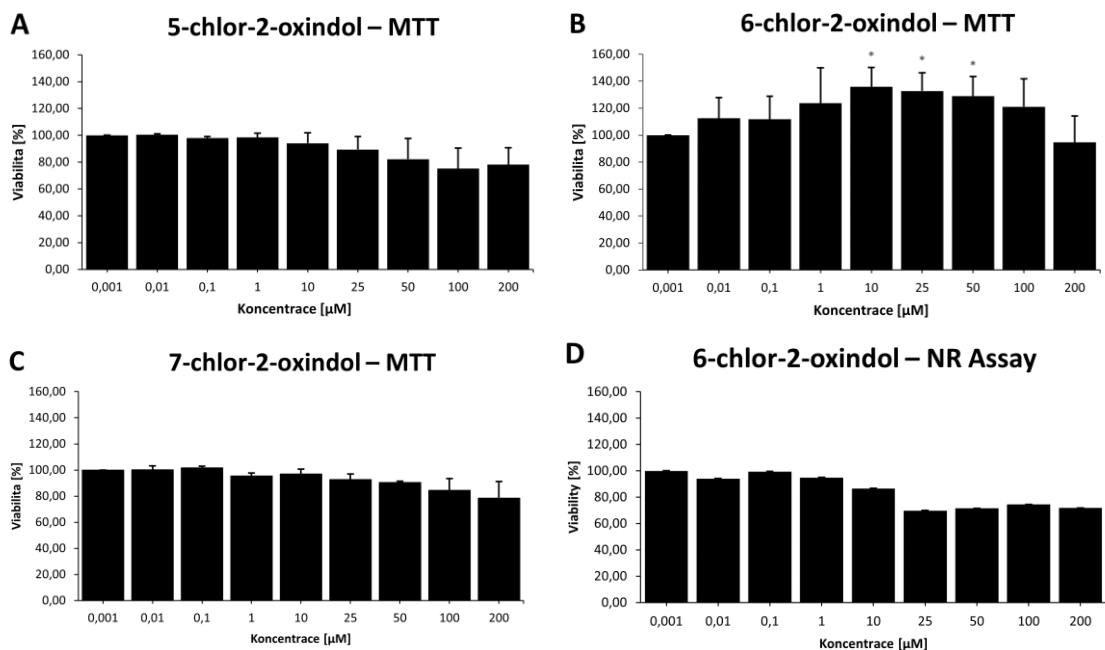
### 5.1 Stanovení cytotoxických účinků chlorovaných derivátů 2-oxindolu na buněčnou linii LS174T

Cytotoxické účinky chlorovaných derivátů 2-oxindolu na buněčnou linii LS174T byly stanoveny pomocí MTT testu. Z výsledků vyplývá, že ani u jednoho z chlorovaných derivátů 2-oxindolu nedošlo k poklesu viability buněk pod 70 % (Obr. 8A-C). U 6-chlor-2-oxindolu ovšem došlo ve třech nezávislých měření k výraznému nárůstu viability buněk nad 100 % (Obr. 8B), zejména u koncentrace  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kdy viabilita byla  $135,86 \pm 14,3 \%$  a u koncentrace  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kdy viabilita byla  $132,68 \pm 13,6 \%$ .

Z tohoto důvodu byl vliv 6-chlor-2-oxindolu na buňky otestován pomocí testu neutrální červeně pro ověření, zda daná látka potencionálně zvyšuje viabilitu na buněčné úrovni nebo působí pouze na mitochondriální dehydrogenázy.

Z výsledků je zřejmé, že viabilita buněk po působení 6-chlor-2-oxindolu byla u testu neutrální červeně při všech koncentracích nižší než 100 % (Obr. 8D). Z čehož můžeme usoudit, že 6-chlor-2-oxindol pravděpodobně ovlivňuje aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz. Z tohoto pozorování vyplývá, že při použití MTT testu na otestování viability buněk u této látky může dojít ke zkreslení výsledků.

Na základě těchto zjištění můžeme konstatovat, že vybrané chlorované deriváty 2-oxindolu neměly cytotoxický účinek na buněčnou linii LS174T, a proto mohly být následně použity pro testování jejich vlivu na transkripční aktivitu AhR a PXR.



**Obrázek 8:** Vliv působení chlorovaných derivátů 2-oxindolu na viabilitu buněčné linie LS174T po 24-hodinové aplikaci

Buněčná linie byla inkubovaná se studovanými látkami o různých koncentracích. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola 2% Triton. Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci  $0,001 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , která představovala 100 %. Výsledné hodnoty uvedené v grafu jsou u MTT průměrem ze čtyř na sobě nezávislých experimentů, u MTT 6-chlor-2-oxindolu průměr ze tří na sobě nezávislých testů a u NR assay se jedná o reprezentativní experiment. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu a \* označuje hodnoty statisticky signifikantní.

## 5.2 Vliv chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu

### AhR

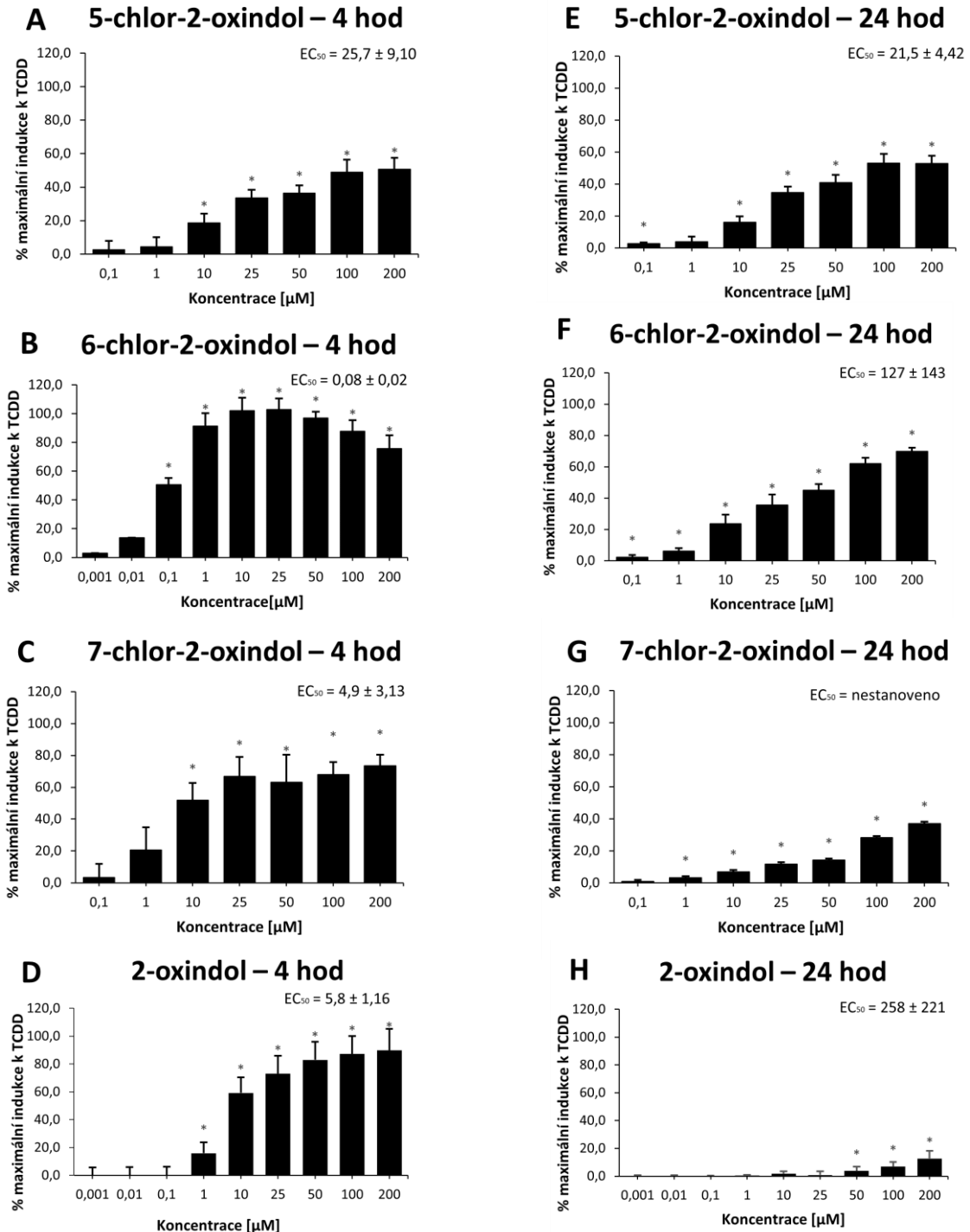
Transkripční aktivita AhR byla stanovena pomocí luciferázové reportérové eseje. Z výsledků měření vyplývá, že při 4-hodinovém působení v porovnání s pozitivní kontrolou TCDD (při koncentraci  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  indukuje 6,9x), která zde představuje 100% aktivaci AhR, aktivuje 2-oxindol AhR od koncentrace  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 9D), kdy už tato hodnota je signifikantní. Nejvyšší aktivita byla při koncentraci  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $89,8 \pm 15,4 \%$ . Hodnota  $EC_{50}$  pro 2-oxindol je  $5,8 \pm 1,16 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Testované látky 5-chlor-2-oxindol, 6-chlor-2-oxindol a 7-chlor-2-oxindol (Obr. 9A-C) v porovnání s 2-oxindolem měly vliv na transkripční aktivitu AhR ve všech koncentracích. Látka 7-chlor-2-oxindol (Obr. 9C) vykazuje podobný účinek na transkripční aktivitu AhR v porovnání s 2-oxindolem, kdy hodnoty  $EC_{50}$  jsou si velmi podobné,  $5,8 \pm 1,16 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u 2-oxindolu a  $4,9 \pm 3,13 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u 7-chlor-2-oxindolu. Pokles v účinku na transkripční aktivitu AhR byl pozorován v případě 5-chlor-2-oxindolu (Obr. 9A), kdy účinnost u nejvyšší koncentrace  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  klesla z 90 % na 50 %, což se projevilo i na hodnotě  $EC_{50}$ , která je pro tuto látku  $25,7 \pm 9,10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Naopak výrazné zvýšení účinnosti v porovnání s 2-oxindolem je možné pozorovat v případě působení 6-chlor-2-oxindolu (Obr. 9B). Tato látka měla nejvyšší účinek na aktivitu AhR již při koncentraci  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to 103 %, čemuž odpovídá i výrazně nižší hodnota  $EC_{50}$ ,  $0,08 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Při 24-hodinovém působení v porovnání s pozitivní kontrolou TCDD (při koncentraci  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  indukuje 14,2x), která zde představuje 100% aktivaci, aktivuje 2-oxindol AhR od koncentrace  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 9H). Nejvyšší aktivita byla při koncentraci  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to  $12,7 \pm 5,4 \%$ . Hodnota  $EC_{50}$  pro 2-oxindol je  $258 \pm 221 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , tato hodnota je pouze orientační. Testované látky 5-chlor-2-oxindol, 6-chlor-2-oxindol a 7-chlor-2-oxindol (Obr. 9E-G) v porovnání s 2-oxindolem měly vliv na transkripční aktivitu AhR ve všech koncentracích. Navýšení v účinku na transkripční aktivitu AhR v porovnání s 2-oxindolem bylo pozorováno u 7-chlor-2-oxindolu (Obr. 9G), kdy účinnost u nejvyšší koncentrace  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  stoupla z 13 % na 37 %. Hodnotu  $EC_{50}$  pro tuto látku nebylo možné stanovit. Podobné zvýšení účinnosti oproti 2-oxindolu je možné pozorovat v případě působení 5-chlor-2-oxindolu (Obr. 9E), kdy účinnost u nejvyšší koncentrace  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  stoupla z 13 % na 53 %, což se projevilo na hodnotě  $EC_{50}$ , která je pro tuto látku  $21,5 \pm 4,42 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Nejvýraznější zvýšení účinnosti v porovnání s 2-oxindolem je možné pozorovat v případě působení 6-chlor-2-oxindolu (Obr. 9F), kdy u nejvyšší koncentrace  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  stoupla účinnost z 13 % na 70 %. Orientační hodnota  $\text{EC}_{50}$  je pro tuto látku  $127 \pm 143 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Porovnáme-li mezi sebou míru aktivace AhR při 4- a 24-působení, u 2-oxindolu (Obr. 9D, H), pozorujeme výrazné snížení v transkripční aktivitě AhR, u 5-chlor-2-oxindolu (Obr. 9A, E) se aktivita AhR příliš nezměnila, u 6-chlor-2-oxindolu (Obr. 9B, F) aktivita AhR u koncentrací 10 a  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  klesla téměř 4x, u nejvyšší koncentrace došlo k nepatrnému snížení aktivity AhR a u 7-chlor-2-oxindolu (Obr. 9C,G) klesla aktivita AhR na polovinu.

Na základě těchto zjištění je možné konstatovat, že všechny tři testované látky byly schopné indukovat transkripční aktivitu AhR při 4- i 24-hodinovém experimentu. Nejúčinnějším aktivátorem se jeví 6-chlor-2-oxindol při 4-hodinovém působení na buňky (Obr. 9B), jelikož u něj byla detekována nejvyšší aktivita AhR už při nízkých koncentracích v porovnání s ostatními látkami.



**Obrázek 9:** Vliv působení chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii LS174T po 4-hodinové a 24-hodinové aplikaci

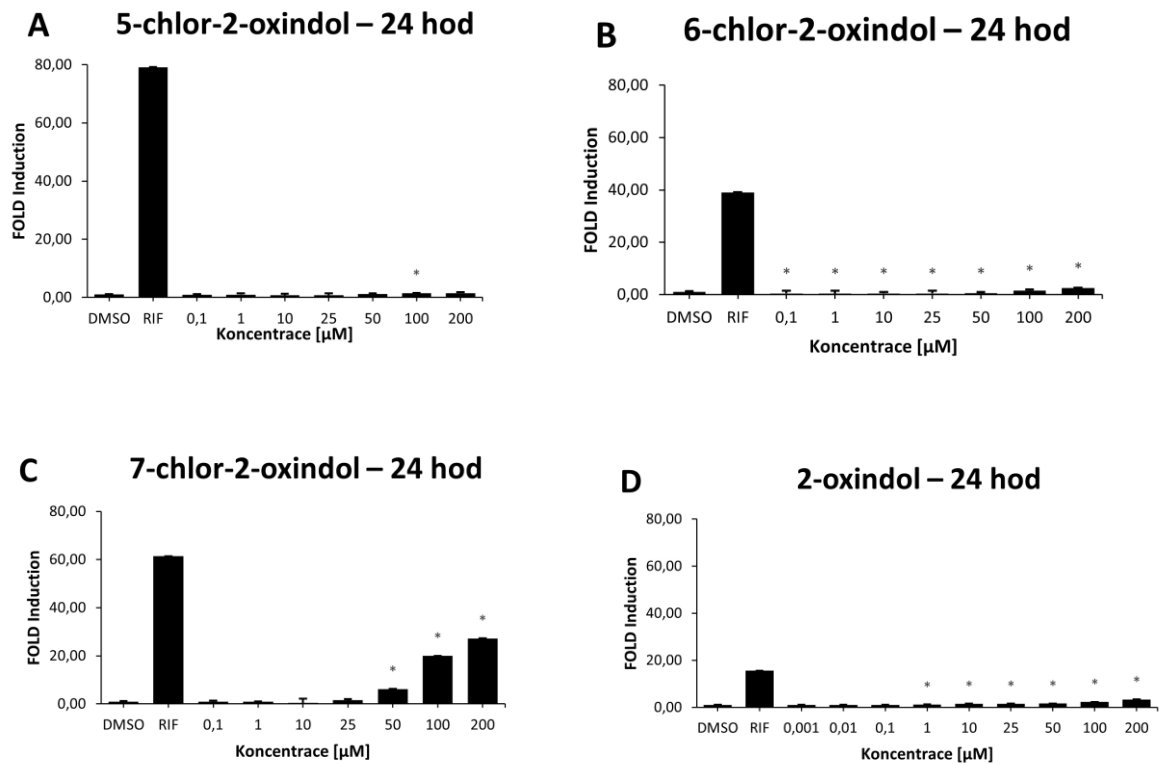
Buněčná linie byla inkubovaná se studovanými látkami o různých koncentracích. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola  $10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD. Aktivita AhR byla vztažena k pozitivní kontrole, která představuje 100 %. Výsledné hodnoty uvedené v grafu jsou u 4-hodinového experimentu průměrem ze čtyř na sobě nezávislých experimentů, u 24-hodinového experimentu ze tří nezávislých experimentů. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu a \* označuje hodnoty statisticky signifikantní. Hodnoty  $EC_{50}$  byly vypočítány pomocí GraphPad Prism 9 s pomocí vedoucí bakalářské práce.

### 5.3 Vliv chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu

#### PXR

Transkripční aktivita PXR byla stanovena pomocí luciferázové reportérové eseje a vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) vztažený k negativní kontrole DMSO. Z výsledků měření vyplývá, že při 24-hodinovém působení 2-oxindolu na transkripční aktivitu PXR (Obr. 10D) v porovnání s pozitivní kontrolou RIF (fold indukce 15,6x), která zde představuje 100% aktivaci, má 2-oxindol nízkou míru indukce. Při koncentraci  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  indukuje to 3,4x (účinnost vůči RIF je 22%) v porovnání s negativní kontrolou DMSO (Obr. 10D). Podobně nízký vliv na aktivitu PXR jako 2-oxindol měly i látky 5-chlor-2-oxindol a 6-chlor-2-oxindol. 5-chlor-2-oxindol (Obr. 10A) měl nejvyšší násobek indukce při koncentraci  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to 1,5x, pro 6-chlor-2-oxindol (Obr. 10B) byl násobek indukce při této koncentraci 2,5x. Navýšení v účinku na transkripční aktivitu PXR v porovnání s 2-oxindolem bylo pozorováno u 7-chlor-2-oxindolu (Obr. 10C), kdy násobek indukce u nejvyšší koncentrace  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  stoupl z 3,4x na 27,3x (účinnost vůči RIF je 50%).

Na základě těchto zjištění je možné konstatovat, že látky 5-chlor-2-oxindol (Obr. 10A) a 6-chlor-2-oxindol (Obr. 10B) nebyly schopné indukovat transkripční aktivitu PXR. Nejúčinnějším aktivátorem se jeví 7-chlor-2-oxindol (Obr. 10C), jelikož byla u něj detekována nejvyšší aktivita PXR v porovnání s ostatními testovanými látkami.



**Obrázek 10:** Vliv působení chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu PXR v buněčné linii LS174T po 24-hodinové aplikaci

Buněčná linie byla inkubovaná se studovanými látkami o různých koncentracích. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola  $10\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  RIF. Aktivita PXR byla vztažena k negativní kontrole, která představuje hodnotu indukce 1. Jedná se o reprezentativní experimenty. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Studentova t-testu a \* označuje hodnoty statisticky signifikantní.

## 6 DISKUZE

V posledních letech je velká pozornost věnována studiu metabolitů střevní mikroflóry a jejich účinku na aktivitu receptorů AhR a PXR. Ty ovlivňují expresi řady genů podílejících se nejen na metabolismu xenobiotik, ale také na těch, které modulují řadu dalších fyziologických a patofyziologických procesů. Hlavním zájmem těchto studií byl zejména vliv derivátů tryptofanu v souvislosti s gastrointestinálními potížemi (Stepankova *et al.*, 2018; Illés *et al.*, 2020; Vyhlídalová *et al.*, 2020b).

V této bakalářské práci byl sledován vztah mezi strukturou a funkcí derivátů 2-oxindolu s ohledem na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru a pregnanového X receptoru. Pro tuto studii byla vybrána buněčná linie LS174T odvozená od karcinomu tlustého střeva, kdy pro testování transkripční aktivity AhR byla použita stabilně transfekovaná linie LS174T-AhR. Pro testování transkripční aktivity PXR bylo potřeba linii LS174T transfekovat. Pro testování byly vybrány látky 5-chlor-2-oxindol, 6-chlor-2-oxindol a 7-chlor-2-oxindol.

V první části experimentu byl studován vliv testovaných látek na viabilitu buněčné linie LS174T. Výsledky MTT testu ukázaly, že ani u jedné látky nedošlo k výraznému poklesu viability, u 6-chlor-2-oxindolu ale došlo k mírnému navýšení. Po provedení testu neutrální červeně se viabilita pohybovala kolem 100 %, z čehož lze usoudit, že 6-chlor-2-oxindol pravděpodobně ovlivňuje aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz, čímž může zkreslit výsledky MTT testu.

Ve druhé části experimentu se testovala transkripční aktivita AhR a PXR pomocí luciferázové reportérové eseje, kdy modelovým ligandem pro AhR bylo TCDD a pro PXR rifampicin. Po 4- a 24-hodinovém působení testovaných látek na AhR byla nejvyšší aktivita zaznamenána u 6-chlor-2-oxindolu. Právě modifikace chlorem k pozici 6 měla významný vliv na zvýšení účinnosti transkripční aktivity AhR a také na snížení hodnoty  $EC_{50}$  oproti ostatním látkám. V dřívějších studiích byl pozorován vliv mikrobiálních derivátů tryptofanu, např. indolu, 3-methylindolu a indol-3-acetamidu, na aktivitu AhR v buněčné linii AZ-AhR při 4-hodinové kultivaci (Vrzalová *et al.*, 2022). Autoři v této práci zjistili, že nejúčinnějšími agonisty AhR byly indol-3-acetamid a indol s účinností 84 % a 66 %. Nejvyšší potence byla pozorována u indol-3-acetamidu a 3-methylindolu s hodnotami  $EC_{50}$   $4,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $8,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro porovnání s 6-chlor-2-oxindolem byla u této látky zjištěna účinnost 102 % a hodnota  $EC_{50}$   $0,08 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Indol a indol-3-acetamid byli nejúčinnějšími agonisty, ovšem s velmi nízkou potencí, i ve studii



Vyhlídalové a spol., ve které se ale jednalo o 24-hodinový experiment (Vyhlídalová *et al.*, 2020b). Z pozorování účinků studovaných látek na aktivitu AhR za 4 a 24 hodin je patrné, že po 24-hodinovém působení klesá účinnost 2-oxindolu pravděpodobně v důsledku metabolismu aplikované sloučeniny. Na druhou stranu je zde pozorována stabilizace halogenem vedoucí ke zpomalení zmiňovaného metabolismu. Účinnost 6-chlor-2-oxindolu byla po 24 hodinách 70%. V jiné práci byl sledován vliv methylovaných a methoxylovaných derivátů indolu na buněčnou linii AZ-AhR při 8 a 24-hodinovém působení, kdy nejúčinnějšími agonisty byly za 24 hodin 4-methylindol, 6-methylindol a 7-methoxyindol s 134%, 91% a 80% účinností (Stepankova *et al.*, 2018).

Po 24-hodinovém působení testovaných látek na aktivitu PXR byla zaznamenána nejvyšší aktivita u 7-chlor-2-oxindolu, z čehož lze vyvodit, že modifikace v pozici 7 má vliv na zvýšení aktivity PXR. Účinnost působení této látky na aktivitu PXR v porovnání s modelovým ligandem rifampicinem byla asi 50%, látku lze tedy zařadit mezi slabší agonisty, stejně jako např. indol. Mnohem vyšší účinek na aktivitu PXR, srovnatelný s rifampicinem, byl pozorován např. u indol-3-acetamidu v buněčné linii LS180 (Illés *et al.*, 2020). Pozornost byla zaměřena také na aktivitu methylovaných indolů v pozicích 1 až 7 (Vyhlídalová *et al.*, 2020a). V této práci byla pozorována poměrně nízká schopnost 7-methylindolu indukovat aktivitu PXR, v porovnání se 7-chlor-2-oxindolem. I když u obou látek došlo k substituci v pozici 7, relativní účinnost pro 7-methylindol byla 34%, zatímco pro 7-chlor-2-oxindol 50% v porovnání s rifampicinem.

Porovnáním působení testovaných látek na aktivitu AhR a PXR při 24-hodinovém experimentu je zřejmé, že 5-chlor-2-oxindol a 6-chlor-2-oxindol jsou selektivní agonisté AhR, jelikož vlivem jejich působením nedošlo k významné aktivaci PXR. Pouze modifikace chlorem v pozici 7 měla vliv na transkripční aktivitu PXR i AhR.

Pro lepší charakterizaci účinku testovaných látek na PXR by bylo vhodné sledovat jejich vliv za kratší časový interval, např. při 8-hodinovém působení. Dále se nabízí sledovat expresi cílových genů AhR a PXR na úrovni RNA např. pomocí kvantitativní PCR a pomocí ligand vazebné eseje prokázat vazbu látky 6-chlor-2-oxindol na AhR.

## 7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl zkoumáný vliv chlorovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu AhR a PXR v lidské buněčné linii LS174T odvozené od karcinomu tlustého střeva. Testovány byly celkem tři deriváty 2-oxindolu, a to 5-chlor-2-oxindol, 6-chlor-2-oxindol a 7-chlor-2-oxindol.

V literárním přehledu byly popsány jednotlivé fáze procesu biotransformace xenobiotik včetně enzymů, které se těchto procesů účastní. Dále zde byly popsány receptory AhR a PXR regulující expresi genů těchto enzymů, s důrazem na jejich mechanismus aktivace, úlohu ve fyziologických a patofyziologických procesech a na jejich exogenní a endogenní ligandy. V jeho závěru byla zmíněna receptorová teorie a popis studovaných sloučenin.

V experimentální části byla nejdříve zjišťována cytotoxicita studovaných látek na danou buněčnou linii při 24-hodinovém působení pomocí MTT testu. Ani jedna z koncentrací testovaných látek nebyla pro buňky toxická, proto je bylo možné použít v druhé fázi experimentální části. Jelikož ale u 6-chlor-2-oxindolu došlo k nárůstu viability buněk, byl jeho vliv otestován pomocí testu neutrální červeně, kde hodnoty viability klesly pod 100 %. Z tohoto pozorování lze vyvodit možný vliv 6-chlor-2-oxindolu na aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz s možným zkreslením výsledků.

Ve druhé fázi experimentální části byl sledován vliv látek na transkripční aktivitu AhR při 4- a 24-hodinovém experimentu a na aktivitu PXR při 24-hodinovém experimentu metodou luciferázové reportérové eseje. Největší vliv na aktivitu AhR měl 6-chlor-2-oxindol, kdy nejvyšší naměřená aktivita AhR byla při koncentraci  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to 103% v porovnání s pozitivní kontrolou TCDD od čehož se odvíjí i hodnota  $EC_{50}$ , která je  $0,08 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Metabolicky stálým se jeví 5-chlor-2-oxindol, jelikož u něj po 24 hodinách došlo k nepatrnému snížení účinku na AhR. Na aktivitu PXR měl výrazný vliv pouze 7-chlor-2-oxindol, kdy nejvyšší aktivita byla zaznamenaná u koncentrace  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to 50 %, s násobkem indukce 27,3x oproti negativní kontrole.

Na základě získaných výsledků je nejúčinnějším ligandem AhR 6-chlor-2-oxindol, který je také společně 5-chlor-2-oxindolem jeho selektivním ligandem, a pro PXR je nejúčinnějším ligandem 7-chlor-2-oxindol. Tato práce doplňuje naše znalosti o tom, které sterické polohy chloru mají vliv na aktivitu AhR a PXR,

## 8 LITERATURA

- Abel, J., Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological Chemistry* 391: 1235–1248.
- Almazroo, O. A., Miah, M. K., Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease* 21: 1–20.
- Berg, K. A., Clarke, W. P. (2018). Making sense of pharmacology: Inverse agonism and functional selectivity. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 21: 962–977.
- Berns, G. S., Capra, C. M., Noussair, C. (2007). Receptor theory and biological constraints on value. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1104: 301–309
- Bock, K. W., Köhle, C. (2006). Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical Pharmacology* 72: 393–404
- Denison, M. S., Nagy, S. R. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43: 309–334
- Dvořák, Z., Cvek, B. (2011). Vybrané kapitoly z buněčné biologie. Skripta. Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká Fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc
- Dvořák, Z., Poulíková, K., Mani, S. (2021). Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry* 215: 113231
- Dvořák, Z., Sokol, H., Mani, S. (2020). Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends in pharmacological sciences* 41: 900–908
- Guengerich, F. P. (1997). Role of Cytochrome P450 Enzymes in Drug-Drug Interactions. *Advances in Pharmacology* 43
- Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., Coumoul, X. (2013). The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discovery Today* 18: 479–486
- Huang, G., Elferink, C. J. (2012). A novel nonconsensus xenobiotic response element capable of mediating aryl hydrocarbon receptor-dependent gene expression. *Molecular Pharmacology* 81: 338–347
- Chai, S. C., Lin, W., Li, Y., Chen, T. (2019). Drug discovery technologies to identify and

- characterize modulators of the pregnane X receptor and the constitutive androstane receptor. *Drug Discovery Today* 24: 906–915
- Chai, S. C., Wright, W. C., Chen, T. (2020). Strategies for developing pregnane X receptor antagonists: Implications from metabolism to cancer. *Medicinal Research Reviews* 40: 1061–1083
- Chen, J., Haller, C. A., Jernigan, F. E., Koerner, S. K., Wong, D. J., Wang, Y., Cheong, J. E., Kosaraju, R., Kwan, J., Park, D. D., Thomas, B., Bhasin, S., De, R. C., Rosa, L., Premji, A. M., Liu, L., Park, E., Moss, A. C., Emili, A., Bhasin, M., Sun, L., Chaikof, E. L. (2020). Modulation of lymphocyte-mediated tissue repair by rational design of heterocyclic aryl hydrocarbon receptor agonists. *Science Advances* 6
- Cheng, J., Shah, Y. M., Gonzalez, F. J. (2012). Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* 33: 323–330
- Illés, P., Krasulová, K., Vyhlídalová, B., Poulíková, K., Marcalíková, A., Pečínková, P., Sirotová, N., Vrzal, R., Mani, S., Dvořák, Z. (2020). Indole microbial intestinal metabolites expand the repertoire of ligands and agonists of the human pregnane X receptor. *Toxicology Letters* 334: 87–93
- Jackson, D. P., Joshi, A. D., Elferink, C. J. (2015). Ah receptor pathway intricacies; signaling through diverse protein partners and DNA-motifs. *Toxicology Research* 4: 1143–1158
- Kaur, M., Singh, M., Chadha, N., et Silakari, O. (2016). Oxindole: A chemical prism carrying plethora of therapeutic benefits. In *European Journal of Medicinal Chemistry* 123: 858–894
- Kenakin T. P. (1989). Challenges for receptor theory as a tool for drug and drug receptor classification. *Principles* 10
- Kenakin, T., (1999). Efficacy in drug receptor theory: outdated concept or under-valued tool?. *Principles* 20
- Kenakin, T. (2008). Overview of receptor interactions of agonists and antagonists. *Current Protocols in Pharmacology* 42
- Khetmalis, Y. M., Shivani, M., Murugesan, S., Chandra Sekhar, K. V. G. (2021). Oxindole and its derivatives: A review on recent progress in biological activities. *Biomedicine et Pharmacotherapy* 141: 111842
- Kliwer, S. A., Moore, J. T., Wade, L., Staudinger, J. L., Watson, M. A., Jones, S. A.,

- Mckee, D. D., Oliver, B. B., Willson, T. M., Zetterström, R. H. (1998). An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a Novel Steroid Signaling Pathway. *Cell* 92: 73–82
- Kodama, S., Negishi, M. (2013). PXR cross-talks with internal and external signals in physiological and pathophysiological responses. *Drug Metabolism Reviews* 45: 300–310
- Kousalová, L., Baranová, J., Anzenbacher, P. (2003). Lékové interakce na úrovni cytochromů P450-Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Přehledové články klinické farmakologie* 17: 151–157
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7: 1–9
- Lin, L., Dai, Y., Xia, Y. (2022). An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the Last two decades (2002–2022): A medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* 244: 114845
- Mackowiak, B., Wang, H. (2016). Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochimica et Biophysica Acta* 1859: 1130–1140
- Manikandan, P., Nagini, S. (2017). Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: A Review. *Current Drug Targets* 19: 38–54
- Meyer, U. A. (1996). Overview of Enzymes of Drug Metabolism. In *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 24
- Murray, I. A., Patterson, A. D., Perdew, G. H. (2014). Ah receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer* 14: 801–814
- Neavin, D. R., Liu, D., Ray, B., Weinshilboum, R. M. (2018). The role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in immune and inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 19
- Oladimeji, P. O., Chen, T. (2018). PXR: More than just a master xenobiotic receptor. *Molecular Pharmacology* 93: 119–127
- Petrulis, J. R., Perdew, G. H. (2002). The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chemico-Biological Interactions* 141: 25–40
- Poland, A., Glover, E., Kende, A. S. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. *The Journal Of Biological Chemistry* 251: 4936–4946
- Puga, A., Ma, C., Marlowe, J. L. (2009). The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with

- multiple signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology*, 77: 713–722
- Renton, K. W. (1986). Factors Affecting Drug Biotransformation. *Clinical Biochemistry* 19
- Rigalli, J. P., Theile, D., Nilles, J., Weiss, J. (2021). Regulation of PXR function by coactivator and corepressor proteins: Ligand binding is just the beginning. *Cells* 10: 3137
- Riggio, O., Mannaioni, G., Ridola, L., Angeloni, S., Merli, M., Carl, V., Salvatori, F. M., Moroni, F. (2010). Peripheral and splanchnic indole and oxindole levels in cirrhotic patients: A study on the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *American Journal of Gastroenterology* 105: 1374–1381
- Rothhammer, V., Quintana, F. J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 19: 184–197
- Sayaf, K., Zanotto, I., Russo, F. P., Gabbia, D., De Martin, S. (2022). The nuclear receptor PXR in chronic liver disease. *Cells* 11
- Shinde, R., McGaha, T. L. (2018). The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. *Trends in Immunology* 39: 1005–1020
- Stejskalova, L., Dvorak, Z., Pavek, P. (2011). Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor: Current State of Art. *Current Drug Metabolism* 12: 198–212
- Stepankova, M., Bartonkova, I., Jiskrova, E., Vrzal, R., Mani, S., Kortagere, S., Dvorak, Z. (2018). Methylindoles and methoxyindoles are agonists and antagonists of human aryl hydrocarbon receptor. *Molecular Pharmacology* 93: 631–644
- Stiborová, R. M., Hudeček, J., Hodek, P., et Frei, E. (1999). Význam cytochromů p450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy* 93: 229–237
- Tallarida, R. J. (1995). Receptor discrimination and control of agonist-antagonist binding. *American Physiological Society* 269: 379–391
- Vogel, C. F. A., Matsumura, F. (2009). A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF- $\kappa$ B family. *Biochemical Pharmacology*, 77: 734–745
- Vrzalová, A., Pečinková, P., Illés, P., Gurská, S., Džubák, P., Szotkowski, M., Hajdúch, M., Mani, S., Dvořák, Z. (2022). Mixture Effects of Tryptophan Intestinal Microbial Metabolites on Aryl Hydrocarbon Receptor Activity. *International Journal of*

Molecular Sciences 23: 10825

- Vyhlídalová, B., Bartoňková, I., Jiskrová, E., Li, H., Mani, S., Dvořák, Z. (2020a). Differential activation of human pregnane X receptor PXR by isomeric mono-methylated indoles in intestinal and hepatic in vitro models. *Toxicology Letters* 324: 104–110
- Vyhlídalová, B., Krasulová, K., Pečinková, P., Marcalíková, A., Vrzal, R., Zemánková, L., Vančo, J., Trávníček, Z., Vondráček, J., Karasová, M., Mani, S., Dvořák, Z. (2020b). Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: A detailed characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 2614
- Walisser, J. A., Bunger, M. K., Glover, E., Bradfield, C. A. (2004). Gestational exposure of Ahr and Arnt hypomorphs to dioxin rescues vascular development. *Pharmacology* 101: 16677–16682
- Welliver, M. (2013). Receptor theory and its role in drug therapy. *Gastroenterology Nursing* 36: 283–285
- Xing, Y., Yan, J., Niu, Y. (2020). PXR: a center of transcriptional regulation in cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 10: 197–206
- Zhang, B., Xie, W., et Krasowski, M. D. (2008b). PXR: A xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 9: 1695–1709