

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Veronika Růžičková

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



**Vliv vybraných fluorovaných derivátů
indolu na aktivitu aryl uhlovodíkového
receptoru a pregnanového X receptoru
v lidských buněčných liniích**

Bakalářská práce

Veronika Růžičková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Veronika RŮŽIČKOVÁ

Osobní číslo: R200122

Studijní program: B1501 Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Téma práce: Vliv vybraných fluorovaných derivátů indolu na aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru a pregnanového X receptoru

v lidských buněčných liniích

Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na zadané téma – aktivace AhR, PXR, role v patofyziologii, sloučeniny s indolovou strukturou
2. Stanovení cytotoxického působení vybraných sloučenin *in vitro*
3. Stanovení transkripční aktivity receptorů AhR a PXR v přítomnosti vybraných derivátů metodou reporter gene assay
4. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Dvořák Z, Poulíková K, Mani S. Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur J Med Chem.* 2021 Apr 5;215:113231.doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113231. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33582577.

Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:309-34. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828. Epub 2002 Jan 10. PMID: 12540743.

Stepankova M, Bartonkova I, Jiskrova E, Vrzal R, Mani S, Kortagere S, Dvorak Z. Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol Pharmacol.* 2018 Jun;93(6):631-644. doi: 10.1124/mol.118.112151. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29626056; PMCID: PMC5941192.

Vyhliadalova, 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

Dvořák, Z. et al. (2020) Targeting the pregnane X receptor using microbial metabolite mimicry. *EMBO Mol Med* 12, e11621. 10.15252/emmm.201911621

Dvorak, Z. et al. (2020) Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends PharmacolSci* 41, 900-908. 10.1016/j.tips.2020.09.013

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky
Datum zadání bakalářské práce: 29. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2022

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora: Veronika Růžičková

Název práce: Vliv vybraných fluorovaných derivátů indolu na aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru a pregnanového X receptoru v lidských buněčných liniích

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem vybraných fluor-indolových derivátů na aryl uhlovodíkový receptor (AhR) a na pregnanový X receptor (PXR). V teoretické části je popsána biotransformace a jaderné receptory se zaměřením na aryl uhlovodíkový receptor a pregnanový X receptor. Práce se také zaměřuje na lidskou střevní mikroflóru a na látky indolové povahy, které vznikají ve střevní mikroflóře a podílejí se na imunitní reakci proti zánětlivým onemocněním gastrointestinálního traktu.

V experimentální části se bakalářská práce zabývá sledováním cytotoxicity vybraných fluorovaných derivátů indolu na buněčnou linii LS174T-AhR pomocí MTT testu a Neutral Red Assay. Dále byly sledovány účinky vybraných fluorovaných derivátů indolu na aktivaci AhR a PXR pomocí Reporter Gene Assay.

Ze získaných výsledku je zřejmé, že nejúčinnějšími modifikace indolu jsou 4-fluoroindol a 7-fluoroindol, které mají své fluorované substituenty v poloze 4 a 7. Obě tyto látky lze považovat za silné agonisty AhR a PXR.

Klíčová slova: Biotransformace, Aryl uhlovodíkový receptor, Pregnanový X receptor, střevní mikroflóra, fluorované deriváty indolu

Počet stran: 43

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Veronika Růžičková

Title: Effects of selected fluorinated indole derivatives on the activity of the aryl hydrocarbon receptor and pregnane X receptor in human cell lines

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of cell biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

Supervisor: Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract: This bachelor's thesis deals with the influence of selected fluoro-indole derivatives on the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and on the pregnane X receptor (PXR). In the theoretical part, biotransformation and nuclear receptors are described, focusing on the aryl hydrocarbon receptor and the pregnane X receptor. The work also focuses on the human intestinal microflora and on substances of indole nature that arise in the intestinal microflora and participate in the immune response against inflammatory diseases of the gastrointestinal tract.

In the experimental part, the bachelor's thesis deals with monitoring the cytotoxicity of selected fluorinated indole derivatives on the LS174T-AhR cell line using the MTT test and the Neutral Red Assay. Furthermore, the effects of selected fluorinated indole derivatives on AhR and PXR activation were monitored using the Reporter Gene Assay.

In the experimental part, the bachelor's thesis deals with monitoring the cytotoxicity of selected fluorinated indole derivatives on the LS174T-AhR cell line using the MTT test and the Neutral Red Assay. Furthermore, the effects of selected fluorinated indole derivatives on AhR and PXR activation were monitored using the Reporter Gene Assay.

Keywords: Biotransformation, Aryl hydrocarbon receptor, Pregnane X receptor, intestinal microflora, fluorinated indole derivatives

Number of pages:

Language: Czech

Summary: 43

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářkou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Anety Grycové, Ph.D. a použila jsem jen uvedené literární zdroje.

V Olomouci dne:

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí Mgr. Anetě Grycové, Ph.D. za skvělé vedení při práci, za neutuchající trpělivost a velkou podporu. Také bych chtěla poděkovat PharmDr. Lence Zemánkové, Ph.D. za vysvětlení metod při praktické části a velkou podporu.

Obsah:

1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Biotransformace	3
3.2. Jaderné receptory.....	4
3.2.1 Aryluhlovodíkový receptor (AhR)	6
3.2.2. Pregnanový X receptor (PXR).....	Chyba! Záložka není definována.
3.3. Střevní mikrobiom.....	Chyba! Záložka není definována.
3.3.1 Onemocnění gastrointestinálního traktu.....	15
3.3.2 Metabolismus tryptofanu.....	15
3.4. Indol A jeho deriváty -dopsat	17
4 MATERIÁL A METODY	18
4.1 Materiál	18
4.1.1 Biologický materiál	18
4.2. Použité chemikálie, soupravy, roztoky.....	18
4.2.1. Použité chemikálie.....	18
4.2.2 Testované látky.....	20
4.3. Seznam laboratorních pomůcek a přístrojů	20
4.3.1 Seznam použitých laboratorních pomůcek.....	20
4.3.2 Seznam použitých přístrojů	21
4.4. Experimentální a vyhodnocovací postupy.....	21
4.4.1 Kultivace buněk.....	21
4.4.2. Pasážování buněk	21
4.4.3 Počítání buněk	22
4.4.4 Vysévání buněk	22
4.4.5 Příprava zásobních roztoků testovaných látek.....	22
4.4.6 Stanovení viability buněčné linie	23
4.4.6.1 MTT test.....	23
4.4.6.2 Neutral Red Assay.....	24
4.4.7. Reporter Gene Assay	24
4.4.7.1. Reporter Gene Assay pro AhR.....	24
4.4.7.2. Reporter Gene Assay pro PXR.....	25
5 VÝSLEDKY	26

5.1 Stanovení cytotoxických účinků fluorovaných derivátů indolu.....	26
5.2 Vliv fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu AhR.....	29
5.3 Vliv Fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu PXR.....	33
6 DISKUSE	37
7 ZÁVĚR.....	40
8 LITERATURA.....	40

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK:

5-HT	5-hydroxytryptamin
AA	Kyselina anthranilová
ADH	Alkoholdehydrogenázy
AhR	Arylhydroxidový receptor
AHRR	Represor AhR
AO	Aldehydoxidázy
ALDH	Aldehyddehydrogenázy
AKR	Aldo-ketoreduktázy
ARNT	AhR translokační jaderný protein
ATP	Adenosin-5-trifosfát
BAFF	Aktivační faktor B-buněk
bHLH	Motiv helix – smyčka – helix
BLC	Chemoaktivanty B-lymfocytů
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CAR	Konstitutivní androstanový receptor
CD	Crohnova nemoc
CCL1	CC-chemokinový ligand 1
CPR	Oxydoreduktázy cytochromu P450
COX	Acyklooxygenázy
COX 2	Cyklooxygenázy 2
CYP	Cytochrom P450
DIM	Diindolylmethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DRE	Dioxin responzivní element
E2F1	Transkripční faktor 1 vázajícího promotoru E2
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová

ERK1/ERK2	Extracelulární signálem regulovaná kináza 1 a 2
FBS	Fetální bovinní sérum
FBS-CS	Fetální bovinní sérum – Charcoal Stripped
FIZC	6 – formylino (3,2 – b)karbozol
FMO	monooxygenázy obsahující flavin
GI	Gastrointestinální trakt
HS90	Heat shock protein 90
IAC	Indol-3-akylát
IBD	Zánětlivé onemocnění střev
IC3	Indol – 3 - carbinol
ICZ	Indolykarbazol
IDO	Indol-2,3-dioxygenáza
IET	Indol-3-ethanol
ILA	Indol-3-laktát
ILC	Vrozené lymfoidní buňky
IPY	Indol-3-puryvát
KAT	Kynureninaminottransferáza
KLF6	Krüppel – like factor 6
Kna	Kyselina kynurenová
KP	Kynureninová cesta
Kyn	Kyrurenin
MAT	Histonacetyltransferáza
MAP-kinázi	Miktogenem aktivovaná proteinkináza
MDR 1	Multilékový rezistentní protein 1
MEM	Neesenciální aminokyseliny
mPXR	Myší PXR
MTT	Methyltetrazoliová sůl
NFK	N-formylkynurenin

NF – κ B	Nukleární faktor křppa – light – chain
NLRP 3	Pyrimová doména-3
NOR	Noriwbodine
NR Assay	Neutral Red Assay
P	Gylokoprotein
PAS	Per – ARNT – SIM
PBS	Dulbecco´s Phosphate Butter Saline
PKA	Proteinkináza A
PkC	Proteinkináza C
PLAC	Fosfolipáza A2
PXR	Pregnanový X receptor
P/S	Penicilin a streptomycin
RIF	Rifampicin
SRC 1	Koaktivátor steroidních receptorů 1
QR	Chinonreduktázy
VDR	Receptor pro vitamín D
UC	Ulcerozní kolitida
UDP	Uridindifosfát
TAD	C – terminální transkripční doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TDO	Tryptofan-2,3-dioxigenáza
TLR4	Mýtný receptor/Toll receptor 4
TNF- α	Faktor nekrotizující nádory α
TPH	Tryptofanová hydroxyláza
Trej	Regulační T buňky
Trp	Tryptofan
XRE	Xenobiotický rezpozivní element

SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obrázek 1: Struktura jaderného receptoru.....	5
Obrázek 2: Strukturální zobrazení AhR.....	6
Obrázek 3: Kanonická signální dráha AhR.....	7
Obrázek 4: Nekanonická signální dráha AhR.....	8
Obrázek 5: Aktivace PXR.....	12
Obrázek 6: Metabolické dráhy tryptofanu.....	16
Obrázek 7: Struktura indolu.....	17
Obrázek 8: Vliv působení vybraných fluorovaných derivátů indolu na viabilitu buněčné linie LS174T po 24 hodinách.....	28
Obrázek 9: Vliv působení 6-fluoroindolu a 7-fluoroindolu na viabilitu buněčné linie LS174T po 24 hodinové aplikaci(NR Assay).....	29
Obrázek 10: Vliv působení vybraných fluoroindolů na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii LS174T-AhRpo 4hodinové aplikaci.....	31
Obrázek 11: Vliv působení vybraných fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii LS174T po 4-hodinách.....	35

SEZNAM TABULEK:

Tabulka 1 : Exogenní a endogenní ligandy AhR.....	9
Tabulka 2: Ligandy PXR.....	13
Tabulka 3: Ředění testovaných látek.....	23

1 ÚVOD

Jaderné receptory jsou rodina transkripčních faktorů, které regulují metabolismus, reprodukci, zánět a udržují homeostázu. Tato práce se zaměřuje na aryl uhlovodíkový receptor (AhR), Pregnanový X receptor (PXR) a na jejich roli ve střevní mikroflóře a střevních zánětlivých onemocněních.

Střevní mikroflóra hraje důležitou roli pro zdraví organismu. Střevní mikrobiomy přispívají k účinnosti a spolehlivosti léčiva. Mikroflóra je velmi rozmanitá a ovlivňují ji různé faktory. Mezi tyto faktory patří strava jedince, genetika a nebo také životní styl. Střevní mikroflóra také ovlivňuje signální molekuly, které ovlivňují imunitní systém. Buňky střevního epitelu tvoří hranici mezi organismem a mikroflórou. Střevní epitel je tvořen krypty a klky. Substráty získané ze stravy ovlivňuje imunitní bariéru střeva. Z tohoto výčtu můžeme odvodit důležitost role střevního mikrobiomu v imunitních reakcích.

Změna střevní mikroflóry se podílí na různých onemocněních, mezi které patří zánětlivé onemocnění střev (IBD). IBD je chronické a nespecifické onemocnění, které zahrnuje ulcerózní kolitidu (UC) a Crohnovu nemoc (CD). Mezi faktory ovlivňující IBD patří periodické zvýšení medikace, zánět způsobený genetickými faktory, či chirurgickým zákrokem. Předchozí studie ukázaly, že AhR a PXR mají vliv na onemocnění střevní mikroflóry.

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) je transkripční faktor, který je aktivován navázáním ligandu. AhR hraje důležitou roli v metabolismu xenobiotik a podílí se na regulaci kardiovaskulárního, gastrointestinálního, nervového a imunitního systému. AhR je exprimován ve střevním epitelu, kde je důležitý pro rovnováhu vrozených lymfocytů (ILC) a reaguje na snížení indolu snížením diferenciaci mononukleárních fagocytů. Také se podílí na udržení integrity a funkce střevní bariéry a reguluje diferenciaci T buněk. Pregnanový X receptor je transkripční faktor aktivován ligandem. Patří mezi sirotčí receptory, protože zatím nebyly objeveny žádné endogenní ligandy. PXR se nachází ve vysoké koncentraci v játrech, tlustém a tenkém střevě. PXR hraje důležitou roli v řízení metabolismu xenobiotik a udržuje homeostázu žlučových kyselin, steroidů a hormonů. PXR se podílí na onemocnění kostí, zánětlivých poruchách, dyslexii a jaterní fibróze. PXR funguje jako modulátor pro střevní homeostázu.

Nejnovější studie se zabývají vlivem jaderných receptorů na střevní onemocnění. Z výzkumů vyplývá, že jejich aktivace AhR a PXR mají pozitivní na aktivaci imunitního systému a ochranu mikroflóry před zánětlivými střevními onemocněními.

2 CÍLE PRÁCE

Vypracování rešerše na téma bakalářské práce

Sledování vlivu vybraných fluorovaných derivátů indolu na viabilitu lidské nádorové buněčné linie LS174T

Sledování účinku vybraných fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu AhR a PXR

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Biotransformace

Biotransformace je jedním z dějů zkoumaných farmakokinetikou. Biotransformace je proces, při kterém jsou cizorodé látky neboli xenobiotika, vystaveny enzymatickým modifikacím. Během enzymatických procesů dochází ke změnám původních biologických a biofyzikálních vlastností xenobiotik, což vede ke změně jejich aktivity a toxicity. To způsobuje lepší rozpustnost ve vodě a následně snadnější vylučování xenobiotik pomocí moči a stolice. Hlavním biotransformačním orgánem jsou játra. Mezi další biotransformační orgány patří trávicí trakt, plíce, kůže a ledviny. Biotransformaci můžeme rozdělit do 3 fází: fáze I, fáze II a transport (někdy označovaný jako fáze III) (Hoffmann et al., 2014; Sweeney et al., 2009; Valentová, 2023; Zhao et al., 2021).

Během fáze I probíhají oxidativní, redukční a hydrolytické reakce, které způsobují zvýšení polaritě metabolitů. A to buď pomocí vnesení polární skupiny do molekuly, odkrytím již existující polárnější funkční skupiny, nebo přeměnou méně polární skupiny na polárnější. Na modifikaci struktury xenobiotik se podílejí například enzymy z rodiny cytochromu P450 (CYP), aldehydoxidázy (AO), aldehyddehydrogenázy (ALDH), aldo-ketoreduktázy (AKR), alkoholdehydrogenázy (ADH), esterázy a monooxygenázy obsahující flavin (FMO) a acyklooxygenázy (COX) (Kazem et al., 2019).

Nejdůležitějšími enzymy fáze I jsou enzymy rodiny cytochromu P450. CYP hrají důležitou roli při udržování celkového zdraví lidského organismu. Jejich nejdůležitější rolí je funkce při metabolismu xenobiotik, odhaduje se, že oxidují okolo 75 % léčiv. CYP jsou nejdůležitější enzymovou rodinou při procesu monooxygenace lipofilních sloučenin, což znamená, že připojují hydroxylovou skupinu na xenobiotikum. Tato skupina může být následně využita ve fázi II biotransformace. Nejhojněji se CYP vyskytují v játrech, dále se nacházejí v plicích, gastrointestinálním traktu (GI) a v ledvinách. CYP jsou obvykle umístěny na endoplazmatickém retikulu, ale v menší míře je můžeme najít také v mitochondriích a lysozomech. Důležitými metabolizujícími enzymy jsou podrodiny CYP1, CYP2, CYP3 a CYP4, u některých byla zjištěna nízká substrátová specifita a metabolizují různorodé skupinami xenobiotik a hrají významnou roli při jaterní, ale také extrahepatální xenobiotické detoxikaci a eliminaci (Chen et al., 2012; Zhao et al., 2021).

Mikrosomální enzymatické komplexy, které se podílejí na fázi I a nacházejí se v hepatocytech, jsou složeny z oxidoreduktáz P450 (CPR) a monooxygenáz cytochromu P450. Pro oxidativní metabolismus CYP je důležitý mikrosomální flavoprotein oxidoreduktazy cytochromu P450 (CPR), který je donorem elektronů CYP, a je nezbytný pro fázi I. Flavoprotein CPR hraje důležitou roli při oxidativních procesech, které katalyzují oxygenázy a také při biosyntéze a metabolismu různých endogenních látek, metabolitů hormonů a tuků (Schulz et al., 2021).

Druhým významným enzymem fáze I je aldehydoxyláza (AO), která mění aldehydovou skupinu na karboxylovou. Dalšími významnými enzymy jsou ADH, který mění alkoholy na aldehydy nebo ketony, a esterázy katalyzují hydrolytické štěpení esterů na kyseliny a alkoholy (Kazem et al., 2019)

Během fáze II probíhá konjugace endogenních ligandů s elektrofilními xenobiotiky, nebo výslednými metabolity z fáze I. Konjugace probíhá primárně prostřednictvím methylace, esterace, acetylace, glukuronidace, nebo sulfatace. Produkty fáze II jsou látky hydrofilnější a snadněji vylučitelné než původní metabolity. Enzymy fáze II jsou chinonreduktázy (QR), NAD(P)H menadionreduktázy (NMO), methyltransferázy, epoxidhydrolázy (EPH), N-acetyltransferázy (NAT), glutathion S-transferázy (GST), UDP-glukoronosyltransferázy (UGT) a sulfotransferázy (SULT). Hlavním enzymem fáze II je glukoronosyltransferáza (UGT), která se nachází na membráně endoplazmatického retikula (ER), kde katalyzuje glukuronizaci endogenních a exogenních substrátů. (Kazem et al., 2019)

Transport, neboli fáze III biotransformace, také hraje důležitou roli v metabolismu xenobiotik. Migraci hydrofilních molekul přes buněčnou membránu umožňují transportéry. Ty vytváří transmembránový kanál, který je po stranách lemovaný hydrofilními aminokyselinami. Jsou známy dvě transportérové superrodiny, a to 49 ATP – binding cassette (ABC) a 362 solute carriers (SLC). V eukaryotické buňce ABC transportéry zastávají exportní funkci a vyžadují ke své činnosti energii z hydrolyzy ATP. Oproti tomu SLC transportéry usnadňují pasivní difúzi po koncentračním gradientu. (Hoffmann et al., 2014)

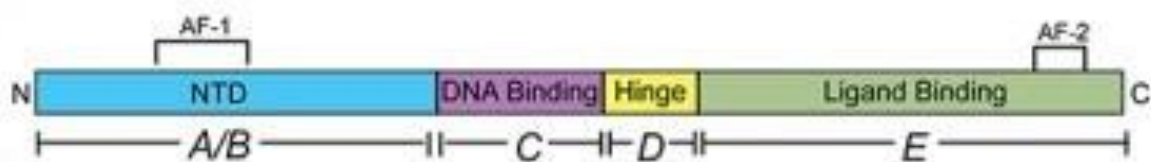
Biotransformace nemusí vést vždy k inaktivaci xenobiotik, ale naopak může produkovat farmakologicky aktivní, nebo toxické metabolity. Tento proces se nazývá metabolická aktivace. Například z alkylačního činidla yperitu cyklofosfamidu po N – dychlorethylaci zprostředkované CYP3A4 vzniká neurotoxický metabolit. (Chen et al., 2012)

Živé organismy se chrání před xenobiotiky a toxiny mimo jiné pomocí aktivace nebo inhibice jaderných receptorů. Mezi jaderné receptory xenobiotik patří aryluhlovodíkový receptor (AhR), pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní andeostanový receptor (CAR). Tyto jaderné receptory jsou také označovány jako xenoreceptory a fungují v xenobiotika-metabolizujícím systému. Jaderné receptory hlavně regulují expresi enzymů z rodiny CYP a enzymy pro fázi I a fázi II biotransformace. (Chen et al., 2012)

3.2. Jaderné receptory

Jaderné receptory jsou rodinou transkripčních faktorů, které regulují fyziologické procesy, jako například metabolismus, reprodukci, zánět, diferenciaci kmenových buněk, cirkadiální rytmus a udržování homeostázy. U lidí bylo dodnes objeveno 48 typů jaderných receptorů, ale 25 z nich považujeme za osiřelé, jelikož zatím nebyly nalezeny jejich endogenní ligandy. Mezi osiřelé receptory například patří pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR) (Cave et al., 2016; Ishigami-Yuasa et al., 2020; Jeong et al., 2009).

Jaderné receptory se vyvinuly z jednoho genu a byly klasifikovány na základě jejich strukturních a funkčních domén. Jaderné receptory se skládají z pěti domén A – E. Každá doména má svou specifickou roli ve funkci receptoru. Doména A/B neboli N – terminační doména (NTD), je vysoce neuspořádaná, ale obsahuje oblast zodpovědná za aktivaci – 1 (AF-1), která reaguje s řadou koregulačních proteinů na buněčné úrovni. Doména C neboli DNA vazebná doména (DBD), je nejkonzervovanější. Obsahuje dvě subdomény a každá z nich obsahuje čtyři cysteinové zbytky, které reagují se zinkovými ionty za vzniku zinkových prstů, které se vážou na DNA. Doména D neboli pantová oblast, je krátký, flexibilní linker mezi DNA vazebnou doménou (DBD) a Ligand vázající doménou (LBD), a obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS). Doména E neboli ligand vázající doména, je komplexní alosterická signální doména, která váže ligandy, ale také reaguje s koregulačními proteiny. LBD obsahuje oblast zodpovědnou za aktivační funkce – 2 (AF – 2) (Cave et al., 2016; Ishigami-Yuasa et al., 2020; Jeong at al., 2009).



Obrázek 1: Struktura jaderného receptoru (Převzato z: Weikum et al., 2018).

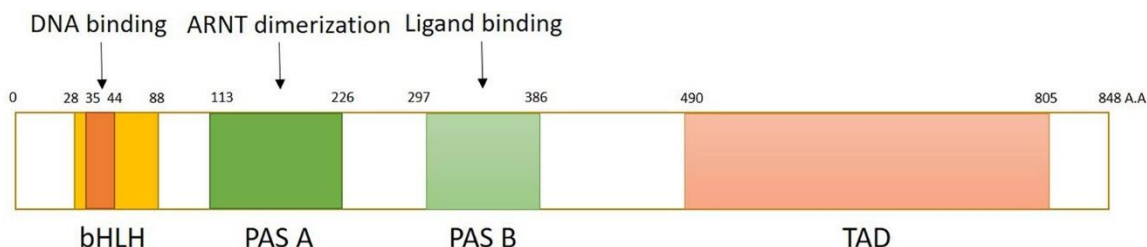
Jaderné receptory se dělí do sedmi podrodin. Podrodina 0 obsahuje receptory, které jsou atypické. Patří mezi ně Gen 1 a Krátký heterodimerní partner (SHP). Podrodina 1 je početná a její receptory jsou regulovány pomocí lipofilních signálních molekul, mezi které patří hormony štítné žlázy, mastné kyseliny, žlučové kyseliny a steroly. Patří mezi ně například tyroidní receptor (TR), receptory kyseliny retinové (RAR), receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem (PPAR), farnesoidní X receptory (FXR), receptory vitamínu D (VDR), pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR). Do podrodiny 2 patří sirotčí receptory, na které se váží mastné kyseliny. Příkladem může být retinoidní X receptor (RXR) a hepatocytární nukleární faktor 4 (HNF4). Receptor RXR je velmi důležitý, protože tvoří heterodimery s mnoha dalšími jadernými receptory. Podrodina 3 zahrnuje steroidní receptory (SR), které regulují metabolické dráhy reprodukčních a vývojových procesů a reagují s hormony odvozenými od cholesterolu, a to prostřednictvím přímé vazby. Patří mezi ně například androgenní receptor (AR), progesteronový receptor (PR), glukokortikoidní receptor (GR), mineralokortikoid receptor (MR) a estrogenový receptor (ER). Podrodina 4 obsahuje osířelé jaderné receptory, které jsou důležité pro vývoj a údržbu neuronů. Do podrodiny 5 patří receptory, které jsou regulovány fosfolipidy a jsou důležité pro vývoj a metabolismus. Do podrodiny 6 patří pouze jeden receptor, a to nukleární faktor zárodečných buněk (GCNF). GCNF je sirotčí receptor, který řídí umlčování genů (Cave et al., 2016; Weikum et al., 2018).

Když se na jaderný receptor naváže ligand, dochází k aktivaci tohoto receptoru a jeho translokaci do jádra, kde se váže do specifického místa DNA a reguluje genovou expresi cílového genu. (Molenda et al., 2003).

3.2.1 Aryluhlovodíkový receptor (AhR)

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který svými funkčními vlastnostmi zapadá do kategorie jaderných receptorů, ale patří do rodiny transkripčních faktorů obsahující motiv helix – smyčka – helix (bHLH) a Per – ARNT – SIM (PAS). Transkripční faktory rodiny bHLH/PAS významně ovlivňují genovou expresi a jsou základem mnohých fyziologických a vývojových procesů. Také se účastní odpovědi na signály z prostředí. (Zhu et al., 2019) AhR je znám pro svou důležitou roli v metabolismu xenobiotik a jeho role ve fyziologických procesech zahrnuje regulaci kardiovaskulárního, gastrointestinálního, nervového, cirkadiálního a imunitního systému, organogenezi, ovlivňování funkce slizniční bariéry, buněčného cyklu a homeostázy. (Kou et al., 2021; Larigot et al., 2018). AhR je kódován genem, který se nachází u mnoha druhů živočichů. Byl nalezen například u hlístic (*Caenorhabditis elegans*), měkkýšů (například u *Mytilus edulis*), ovocných mušek (*Drosophila melanogaster*) a u všech strunatců. AhR byl poprvé identifikován Alanem Polandem na počátku 70 let 20. století jako intracelulární protein, na který se váže 2, 3, 7, 8 tetrachlordibenzildioxin (TCDD). (Hubbard et al., 2015; Shinde et al., 2018).

Jeho primární struktura se dělí do čtyř odlišných domén: tedy na N – terminální doménu bHLH, domény PAS – A, PAS – B, a C – terminální transkripční doménu (TAD) (Kou et al., 2021).



Obrázek 2: Strukturální zobrazení AhR (převzato z: Kou et al., 2021).

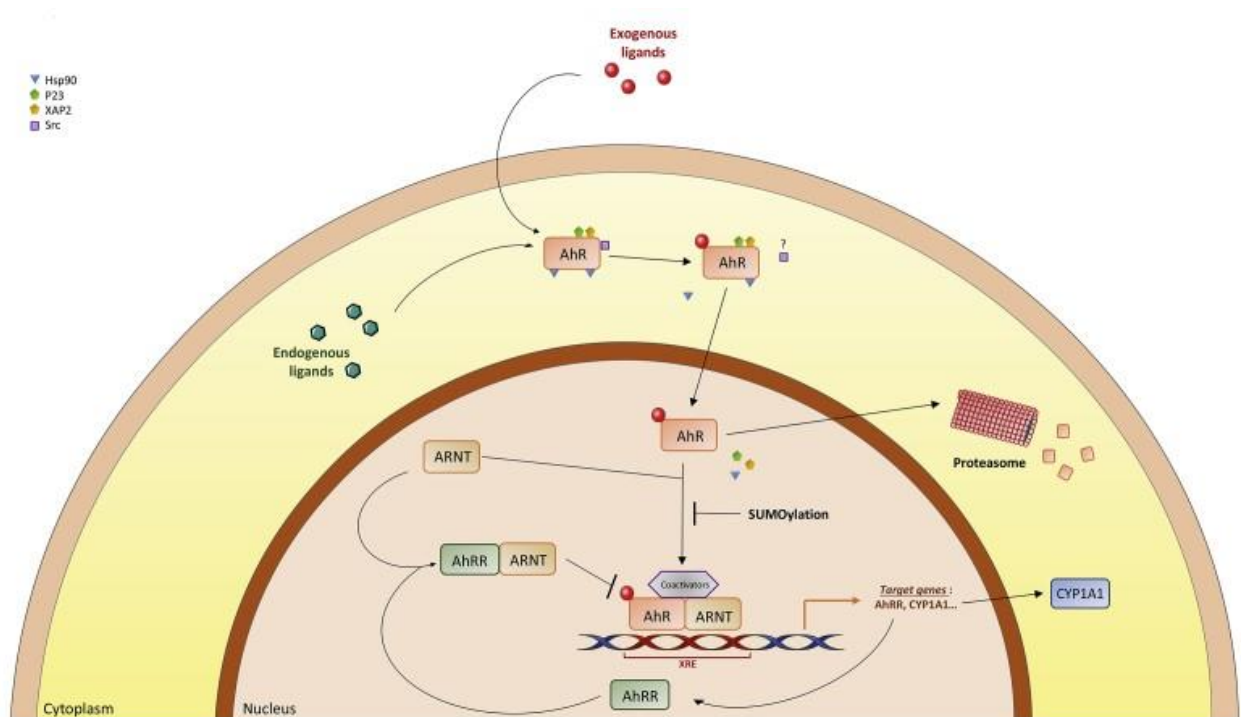
Doména PAS – A řídí specifickou heterodimerizaci s AhR translokačním proteinem (ARNT). Na doménu PAS – B se váží ligandy a funguje jako snímač xenobiotických signálů. Doména bHLH rozpoznává a reaguje s xenobiotickým responzivním elementem (XRE). (Kou et al., 2021)

AhR aktivuje signální dráhy, a to kanonické a nekanonické dráhy AhR. V neaktivní formě se nachází v cytoplasmě a vytváří komplex s množstvím chaperonů. Mezi tyto chaperony patří: Heat Shock Protein 90 (HS90), ko – chaperon p23 a proteinkinazy c – Src. Tyto chaperony zajišťují, že AhR nedegraduje. Chaperony umožňují správné rozpoznávání ligandů receptorem a nepřímo se podílí na účinném transkripčním efektu (Gutiérrez-Vázquez et al., 2018). Po vazbě ligandu na receptor dochází

ke konformační změně, která způsobí oddělení receptoru od chaperonů a komplex receptor – ligand je přemístěn z cytosolu do jádra. V kanonické transkripční regulační dráze komplex AhR – ligand heterodimerizuje v jádře s ARNT a nově vzniklý komplex se váže na specifické sekvence DNA, nacházející se v promotorových oblastech cílového genu v podobě dioxin responzivního elementu (DRE) nebo do XRE. Po exportu z jádra je AhR rychle degradován v cytoplazmatickém proteazomu. Degradace probíhá prostřednictvím kovalentního navázání ubikvitinu (Carambia et al., 2021; Gutiérrez-Vázquez et al., 2018).

V roce 2007 byl AhR identifikován jako ligand-dependentní E3 ubikvitin ligáza, která cílí na substrátové proteiny pro proteosomální degradaci. Příkladem receptoru, u které spouští degradaci je estrogenový receptor. (Gutiérrez-Vázquez et al., 2018; Luecke-Johansson et al., 2017).

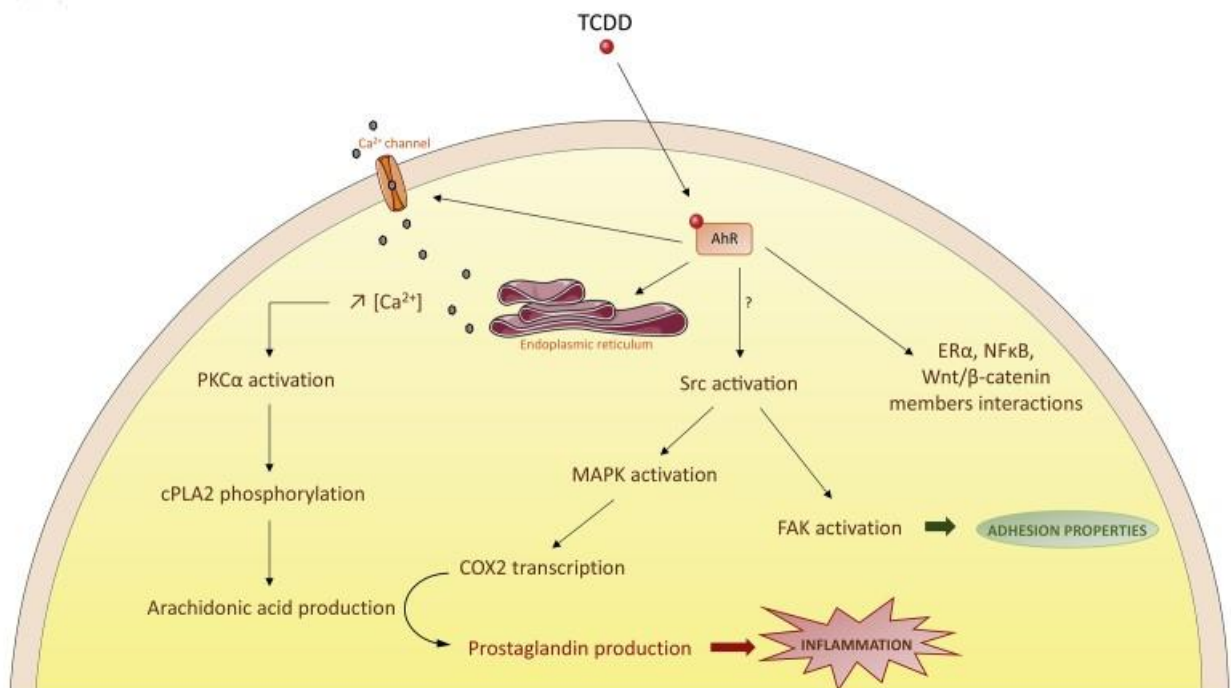
Mezi cílové geny AhR patří: geny kódující enzymy cytochromu P450 (CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1) a represor AHR (AHRR) (Kou et al., 2021).



Obrázek 3: Kanonická signální dráha AhR (převzato z: Larigot et al., 2018).

AhRR je protein podobný AhR, ale na rozdíl od něj nemůže vázat ligandy, protože neobsahuje doménu PAS – B. Liší se také tím, že C – terminální doména má transrepresní funkci, zatímco u AhR a ARNT má C – terminační doména transaktivační funkci. AhRR umožňuje vazbu korepresorů, které jsou zapojeny do negativní regulační smyčky pro AhR a také potlačuje aktivitu AhR vazbou na ARNT a XRE. AhRR je schopen ovlivňovat transkripci genů závislých na AhR. Negativní regulační smyčka AhR a proteosomální degradace AhR chrání biologický systém před nadměrnou stimulací agonisty a poskytují dočasnou kontrolu signální dráhy (Larigot et al., 2018).

V nekanonické regulační dráze komplex ligand – AhR heterodimerizuje s jinými partnerskými proteiny než s ARNT a vede k vazbě na non – XRE elementy DNA. Tímto způsobem dochází k regulaci cílových genů. Mezi partnerské proteiny patří Krüppel – like factor 6 (KLF6) a protein RelB. AhR interaguje se signální dráhou nukleárního faktoru kappa – light chain enhancer aktivovaných B buněk (NF – κ B). NF – κ B je aktivován prostřednictvím interakce AhR s RelB. Při navázání AhR a NF – κ B je tvořen heterodimer, který vede k indukci exprese cytokinů, expresi aktivačního faktoru B buněk (BAFF), chemoaktraktantů B – lymfocytů (BLC) a CC – chemokinových ligandů 1 (CCL1) (Gutiérrez-Vázquez et al., 2018). Mezi nekanonické dráhy patří proces, při kterém se na AhR naváže TCDD. Při vazbě dochází k rychlému zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku, což vede k funkční aktivaci tyrosinkinázy Src a jejímu uvolnění z AhR. Aktivace tyrosinkinázy Src může být doprovázena aktivací MAP kináz ERK1 a ERK2. Velký přísun vápníku způsobuje aktivaci proteinkinázy C (PKC α), která fosforyluje fosfolipázu A2 (cPLA2). cPLA2 začne produkovat kyselinu arachinovou. Během aktivace PKC α dochází k aktivaci MAP kinázy, která ve spolupráci tyrosinkinázou Src vede k transkripci cyklooxygenázy 2 (COX2). COX2 využívá kyselinu arachinovou k produkci prostaglandinů. Prostaglandiny mohou způsobovat zánět (Larigot et al., 2018).



Obrázek 4: Nekanonická signální dráha AhR (převzato z: Larigot et al., 2018).

Dříve byl AhR uznáván jako receptor pro dioxiny a xenobiotika, ale v posledních letech byl objeven velký počet netoxických a endogenních ligandů AhR. Nedávné studie prokázaly souvislost mezi indolovými deriváty tryptofanu, které slouží jako ligand pro AhR, a složení střevní mikroflóry. Některé

AhR ligandy hrají důležitou roli v regulaci vrozených a adaptivních imunitních odpovědí (Wang et al., 2022).

Ligandy AhR se dělí na exogenní ligandy, endogenní ligandy a dietní ligandy. Mezi dietní ligandy patří derivát glukobrassicinu indol – 3 – carbinol (IC3), který se nachází ve vysokých koncentracích u rodu *Brassica*. IC3 v kyselém prostředí podléhá dimerizaci a vytváří diindolylmethan (DIM) a indolykarbazol (ICZ), které aktivují AhR. Další dietní ligandy jsou galangin, genystein, chrysin, apigenin a kvercetin, což jsou přírodní flavonoidy nacházející se v ovoci a zelenině. Mezi endogenní ligandy patří deriváty esenciální aminokyseliny tryptofanu. UV světelnou degradací tryptofanu vzniká 6 – formylindolo (3,2 – b) karbazol (FIZC), který silně aktivuje AhR. Mezi další silně afinitní endogenní ligandy patří L – kynurenin, což je katabolický metabolit tryptofanu a mezi exogenní ligandy patří TCDD (Kou et al., 2021; Larigot et al., 2018). Další příklady ligandů AhR jsou vypsány v tabulce 1.

Tabulka 1: Exogenní a endogenní ligandy AhR

Typ ligandu	Původ	Sloučeniny
Exogenní	HAH a PAH	2,3,7,8 - Tetrachlordibenzop – dioxin (TCDD)
		3 - Methylchlolantrén
		Beta – naftoflavon
	Syntetické	4 - hydroxy – tamoxifen (4OHT)
		6 - Methyl - 1,3,8 - trichlordibenzofuran (6-MCDF)
Endogenní	Dietní	Omeprazol
		3,3' - diindolylmethan
		apigenin
		chrysin
		galangin
		genystein
		Indol - 3 - karbinol
		Indol [3,2 - b] karbazol
		krevetin
		kurkumin
	Mikrobiom	3 - methyl – indol
		indol
		indol - 3 - aldehyd
		indol - 3 - sulfát
		tryptamin

Typ ligandu	Původ	Sloučeniny
Metabolismus hostitele		5 - hydroxy – tryptofan
		6 - formylindolo [3,2 - b] karbazol
		bilirubin
		biliverin

Endogenní	Kynurenin
	kyselina kynurenová
	lipoxin A4
	Prostaglandin
Rostlinné / savčí enzymy	Indigo
	Indirubin
Kvasinky/Houby	Malassezin
	Tryptantrin

Převzato z Cella et al., 2015; Gutiérrez-Vázquez et al., 2018; Shinde et al., 2018

U AhR existuje možnost aktivace receptoru bez navázání ligandu. Tuto možnost podporuje aktivace AhR zvýšenou hladinou cyklického adeninmonofosfátu (cAMP). Dále je možná aktivace AhR bez ligandu, a to v nádorově buněčných liniích, kde je velká koncentrace AhR. AhR podléhá dynamickému nukleoplazmatickému kyvadlovému pohybu, což by mohlo způsobit heterodimerizaci AhR a ARNT bez přítomnosti ligandu. Tuto možnost lze podpořit porovnáním buněčné linie spinocelulárního karcinomu a normálních lidských keratinocytů. Heterodimerizace s ARNT bez přítomnosti ligandu má nízký heterodimerizační potenciál se zdá být neefektivní. (Murray et al., 2015).

Antagonisté AhR jsou v posledních letech zkoumáni jako terapeutická činidla. Prvním historicky popsaným antagonistou AhR je TCDD a historicky nejvíce používaným antagonistou je α naftol, který má slabou antagonistickou aktivitu při vysokých koncentracích. Mezi další popsané antagonisty patří 3 – methoxy – 4 – nitroflavon a 6,2,4 – trimethoxyflavol. (Murray et al., 2015).

Aktivace AhR má dopad na vrozenou a adaptivní funkci imunitních buněk, včetně vrozených lymfoidních buněk (ILC), T buněk, B buněk a makrofágů. U ILC hraje AhR důležitou roli u diferenciaci a jejich udržování. NK buňky ovlivňuje svou aktivací, která je závislá na ligandu a vede k podpoře protinádorovou cytotoxicitu a vede k produkci intergeronu γ (INF γ). AhR signalizace je spojena s rezistencí jaterních NK. U T buněk má AhR protizánětlivou anebo zánětlivou funkci. AhR podporuje diferenciaci protizánětlivých pomocných T buněk 17 (Th17) a podílí se na indukci T buněk. U makrofágů se zjistilo, že AhR ve spolupráci s transkripčním *c-Maf* podporuje expresi protizánětlivého cytokinu IL – 10 (Carambia et al., 2021).

3.2.2. Pregnanový X receptor (PXR)

Pregnanový receptor neboli NR1I2 je ligandem aktivovaný transkripční faktor a patří do jaderných receptorů. PXR je vysoce exprimován v játrech, tlustém a tenkém střevě. V jiných orgánech je jeho exprese nízká nebo nedetekovatelná. PXR hraje důležitou roli v řízení metabolismu xenobiotik a endobiotik k udržení homeostázy žlučových kyselin, bilirubinu, steroidů a hormonů štítné žlázy. Podílí se na glukoneogenezi a metabolismu lipidů. V patofyziologii se podílí na onemocnění kostí, zánětlivých poruchách, dyslexii, hepatotoxicitě a jaterní fibróze. PXR je sirotčí jaderný receptor, protože zatím nebyly identifikovány endogenní ligandy, které by neodpovídaly klasickým modelům pro steroidní hormony. A byl identifikován jako specifický tkáňový aktivátor (Buchman et al., 2018; Cai et al., 2021; Lv et al., 2022).

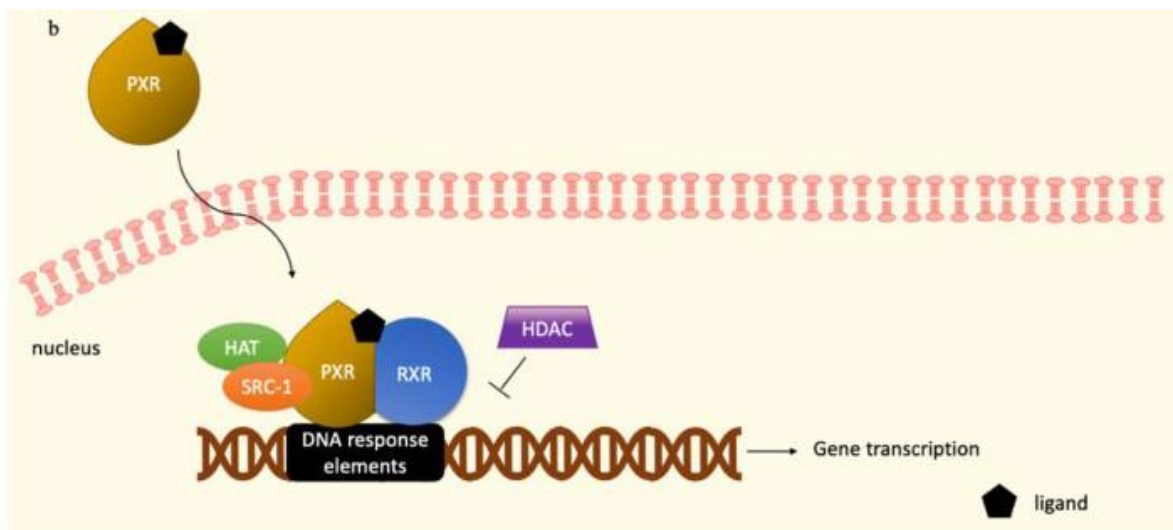
V roce 1998 byl v myších játrech objeven myší PXR (mPXR), který byl aktivován derivátů dexamethasonu a pregnenolonu. Ve stejnou dobu byl naklonován lidský PXR, který byl zapojen do regulace CYP 450 3A4 (CYP3A4) (Pavek, 2016).

PXR reguluje expresi genů pro cytochrom P450, například CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP3A5, CYP3A7, CYP4F12, CYP24 a CYP27A1 a uridindifosfát (UDF), glukuronosyltransferázy (UGT) například UGT1T1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 a UGT1A9, sulfotransferázy, glutathion S – transferázy a karboxylesterázy. A také pro lékové transportéry například P – glykoprotein, protein 2 spojený s multirezistencí a protein 3 spojený s multirezistencí. (Chang, 2009).

PXR je tvořen N – koncovou translační doménou, na které se nachází translační aktivační doména 1 (AF – 1), DNA vazebná doména (DBD), ligand vázající oblast (LBD) a C – konec. C – konec je zodpovědný za heterodimerizaci s retinoidním X receptorem (RXR). Na LBD se nachází aktivační dependentní doména 2 (AF – 2). LBD zodpovídá za rozpoznání a vázání ligandů. Vazebné místo mezi receptorem a ligandem je charakterizováno α – helikálním sendvičem. Bylo zjištěno, že PXR může být modifikován pomocí acetylace, fosforylace a ubikvitinaci. Což znamená že, posttranslační modifikace v PXR ovlivňují regulaci transkripce a metabolický detoxikační proces. (Lv et al., 2022; Rigalli et al., 2021; Sayaf et al., 2022).

PXR se objevuje ve více transkripčních variantách. Mezi ně patří PXR1, PXR2, PXR3 a PXR4. Ty reagují na agonisty a interagují s jinými proteiny a mají odlišné ovlivnění buněčné funkce. (Brewer et al., 2016).

PXR má přímou a nepřímou signální dráhu. V přímé dráze se nachází PXR, který je v neaktivní formě v cytoplasmě v komplexu tvořený receptorem a chaperonových proteinů. Mezi chaperonové proteiny patří protein teplotního šoku (Hsp90). Po navázání ligandu dojde k uvolnění receptoru z komplexu s chaperonových proteinů a dochází k přesunu receptoru do jádra. Během cesty dochází k navázání koregulátorů na specifické cílové geny pomocí aktivních transkripčních domén AF – 1 a AF – 2. Jakmile je PXR v jádře, naváže se na něj retinoidní X receptor (RXR) a vytváří s ním heterotetramerický komplex s koaktivátorem SRC – 1. Což způsobí zesílení vazby zinkových prstů v DBD a dojde k více elementární odezvě v promotorové oblasti cílové DNA. Během toho dochází ke spolupráci koaktivátoru a sekundárních koaktivátorů, které jsou spojeny s histon acetyltransferázou (HAT), na vytvoření multiproteinového koaktivátorového komplexu, který umožní vstup transkripčních složek RNA polymerázy II. Vytvořený heterotetramerický komplex PXR/RXR se váže na přímé repetitivní konce sekvence v oblastech zesilovače cílových genů mezi které patří directed repeat 3 (DRE3). Navázáním na DRE3 začne exprese například CYP3A4, CYP2B, glutathion – S – transferázy a multilékový rezistentní protein 1 (MDR1) (Sayaf et al., 2022; Lv et al., 2022).



Obrázek 5: Aktivace PXR (převzato z: Sayaf et al., 2022)

Nepřímá aktivace PXR je založena na několika signálních drahách, které mohou měnit fosforylaci PXR nebo fosforylaci asociovaných proteinů, což způsobuje modifikace receptorové aktivity. Například se zjistilo, že forskolin spouští signalizaci proteinkinázy A (PKA), která zesiluje aktivaci PXR. Tím pádem zesiluje indukci CYP3A4 v hepatocytech. PKA je zodpovědná za vazbu mezi koaktivátorem SRC – 1 a PXR. Spouští se signalizace proteinkinázy C (PKC), která způsobuje navázání korepresorů jako jaderný receptor 1 (Ncor1) a tím způsobuje inhibici PXR. (Sayaf et al., 2022).

Mezi ligandy PXR patří klinické léky, doplňky stravy, látky znečišťující prostředí, endobiotika a další chemikálie. Spousta ligandů PXR mohou aktivovat i jiné jaderné receptory jako například konstitutivní androstanový receptor (CAR) a farnesoidní X receptor (FXR). To způsobuje rozvoj cílené terapie PXR (Buchman et al., 2018; Lv et al., 2022). V tabulce 2 jsou vypsány ligandy PXR.

Tabulka 2: Ligandy PXR

Původ	Sloučeniny
Žlučové kyseliny	Kyselina 12 - ketoithocholová
	Kyselina 7 - ketoithocholová
	kyselina lithocholová
	kyselina glykocholová
	kyselina glykolithocholová
Steroidní hormony	Pregnenolon
	Progesteron
	estradiol
	mifepriston
	cyproteronacetát
Glukokortikoidy	spironolakton
	Kortikosteron
Antifungální látky	Dexamethason
	Clotrimazol
Antibiotika	Sulfadimin
	Rifampin
	Rifaximin
Protinádorové léky	Paklitaxel
	Taxol
Antikonvulziva	Fenofarbital
	Feytoin
	Karbamazepin
Enbiromentální faktory	Bifenol A
	Nonylfenol
	tributylcitrát
Vůně	Anisomycin
	Piperin

Převzato z: Lv et al., 2022

Mezi první antagonisty PXR patří polychlorované bifenyly, kamptotecin, ketonazol, flukonazol, enilkonazol, sulforatan, inhibitor HIV proteázy, metformin, sesamin, fukoxanthin a kumestrol (Mani et al., 2013).

PXR interaguje s různými signálními kaskádami imunitní odezvy za vzniku imunitního regulačního účinku. Byla zjištěna interakce PXR s nukleárním faktorem kappa B (NF- κ B), který reguluje geny zapojené do vrozené a adaptivní imunity. PXR může reciprokálně inhibovat NF- κ B, což dokazuje že exprese PXR udržuje zánětlivou odpověď způsobenou NF- κ B pod kontrolou. PXR je zodpovědný za obranu proti chemikáliím a NF- κ B je zodpovědný za vytvoření imunitní obrany. Jejich protivzájemná regulace je důležitá pro fyziologický stav organismu (Mohandas et al., 2017).

3.3. Gastrointestinální trakt a střevní mikrobiom

Gastrointestinální trakt (GI) poskytuje organismu živiny pomocí chemického a fyzického rozkladu potravy, umožňuje vstřebávání živin do krevního řečiště a eliminuje vzniklé odpady. Na GI se může pohlížet jako na jednu souvislou trubici tvořenou různými segmenty se specifickými funkcemi. GI je tvořen ústní dutinou, hltanem, jícnem, žaludkem, tenkým střevem, tlustým střevem (Kola et al., 2023).

Buňky střevního epitelu hranici mezi organismem a mikroflórou a slouží jako štít před cizorodými látkami. Střevní epitel je složený z krypt a klků v tenkém střevě a v tlustém střevě jsou protáhlé krypty. Klky tvoří prstovité výběžky, pro maximální povrch, který slouží k účinnému trávení a vstřebávání. Epitel klků je tvořen absorpčními enterocyty, pohárkovými buňkami, které tvoří mucin a enteroendokrinní buňky. Krypty vychlípují sliznici a produkují progenitorové buňky. V epitelu se nachází Panethovy buňky, které produkují antibakteriální peptidy pro sterilizaci lumenu (Oda et al., 2022).

GI obsahuje velké množství mikroorganismů, které nazýváme jako střevní mikrobiota. Střevní mikroflóra hraje důležitou roli v udržování zdraví organismu. Odhadem v jednom lidském jedinci sídlí 150 až 400 druhů mikroorganismů, mezi tyto druhy patří *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria phyla* a *Verrucomicrobia*. Zdraví střev je velmi ovlivněno stravou jedince, genetikou a životním stylem. Molekulární struktury ve stravě poskytují substráty pro hostitelský organismus a mikroflóru. To způsobuje její regulaci a ovlivňuje funkci střevní imunitní bariéry (Davenport et al., 2017).

Mikroby a jejich genomy vytvářejí metabolický fenotyp hostitele a ovlivňují jeho imunitní systém. Spojitost mezi střevní mikroflórou a imunitním systémem začíná hned od narození jedince. Mikroflóra ovlivňuje vývoj imunitního systému a imunitní systém zase utváří složení střevní mikroflóry. V průběhu života ovlivňuje střevní mikroflóra a nábor imunitních buněk a spouštění zánětu. Spojení mezi mikroby a imunitním systémem je zprostředkováno řadou molekul a signálními procesy, které způsobují ovlivnění funkce některých orgánů, například střev, jater, mozku (Gao et al., 2018).

AhR udržuje homeostázu mezi GI a hostitelským organismem, aktivuje proliferaci kmenových buněk tlustého střeva, podílí se na epiteliální bariéře a reguluje imunitní buňky, mezi které patří ROR γ , ILC3, T pomocné lymfocyty (Th 17/22) (Gasaly et al., 2021).

PXR má přímý dopad na signální molekuly, které řídí střevní integritu. RXR ve střevním mikrobiomu udržuje expresi junkčních komplexů proti mytému receptoru-4 (Toll-like receptor-4, TLR4) a inhibovat proud zánětlivých cytokinů, mezi které patří faktor nekrotizující nádory - α (TNF- α). PXR je také spojený se zvýšenou regulací genů, které podporují paracelulární transport a reguluje geny, které udržují barierové funkce (Mohandas et al., 2017).

3.3.1 Onemocnění gastrointestinálního traktu

Změna střevní mikroflóry se podílí na patogenezi různých onemocnění. Mezi tyto onemocnění patří zánětlivé onemocnění střev (IBD), průjmy spojené s antibiotiky (AAD), onemocnění s *Clostridium difficile* (CDAD), obezita a rakovina (Halfvarson et al., 2017).

Zánětlivé onemocnění střev (IBD) je recidivující, chronické a nespecifické zánětlivé onemocnění střev, které zahrnuje ulcerózní kolitidu (UC) a Crohnovu chorobu (CD). Je charakteristické při vzplanutí zánětu s periodickou potřebou zvýšené medikace nebo zánětem způsobeným genetickými faktory anebo chirurgickým zákrokem. Jednou z příčin vzniku IBD je připisována deregulaci imunitní odpovědi na dysbiózu střevního mikrobiomu (Gasaly et al., 2021).

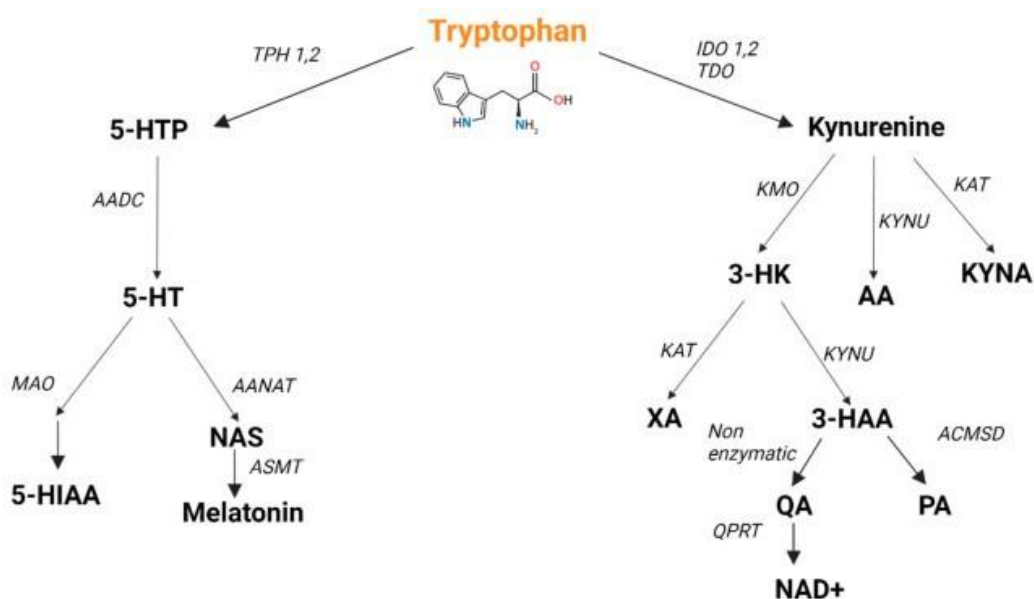
U pacientů s CD je snížena hladina exprese AhR hlavně v místech zanícené sliznice, ale u pacientů trpících UC nebyla zjištěna žádná změna exprese AhR. Celkově bylo zjištěno u pacientu s IBD, že dochází ke snížení hladiny endogenních ligandů, což znamená že aktivita AhR může souviset se symptomy IBD. Bylo dokázáno, ligandy AhR TCDD, Norioboldine (NOR) a FIZC může zmírňovat symptomy UC. TCDD potlačuje diferenciaci Th17 buněk, a to vede ke snížení exprese IL-17, NOR podporuje diferenciaci Treg a inhibuje zánět NLRP23 a FIZC chrání před rozvojem příznaků UC pomocí snížení produkce protizánětlivých cytokinů. (Neavin et al., 2018).

PXR slouží jako modulátor pro udržení střevní homeostázy. Na tom se podílí gen multilékové rezistence -1 (*MDR – 1*), který způsobuje expresi transmembránového P-glykoproteinu (P – gp). P-gp při přítomnosti ATP vytlačuje toxiny z hlenu do lumenu střeva, to způsobuje akumulaci multirezistenčních léků v buňkách, a to udržuje střevní homeostázu. Nepřítomnost PXR je jednou z hnacích sil pro narušení epiteliální střevní bariéry a dochází ke zvýšení permeability u IBD. PXR může inhibovat zánětlivé reakce související se signální dráhou NF- κ B závislou na ligandu. U pacientů s IBD byla zjištěna snížená exprese *P-gp*, kterou mohl způsobit polymorfismus genu *Mdr-1*. Při použití rifaximinu byla exprese *P-gp* zvýšena (Mohandas et al., 2017).

3.3.2 Metabolismus tryptofanu

Tryptofan (Trp) je esenciální aromatická aminokyselina, která byla objevena 1901 Sirem Frederickem Gowland Hopkinsem během hydrolyzy mléčného kaseinu. Trp se nachází v potravinách bohatých na bílkoviny, mezi které patří maso, ryby, vejce, mléko, sýr, mléčné výrobky, fazole, ořechy, sezamová semínka, krůtí maso, tofu, sója a čokoláda. Metabolity Trp ovlivňují lidskou fyziologii. Abnormální metabolismus je spojován s řadou onemocnění (Melhem et al., 2021; Tombari et al., 2019).

Trp je degradován dvěma metabolickými cestami: kynureninovou cestou (KP) a serotoninovou cestou. V játrech probíhá KP tak, že Trp je katalyzován tryptofan-2,3-dioxygenásou (TDO) na N-formylkynurenin (NFK). NFK je hydrolyzován na Kynurenin (Kyn). Kyn následně podléhá působení více enzymů. Například když je Kyn vystaven působení kynureninasy, vzniká kyselina anthranilová (AA), nebo když na Kyn působí kynureninaminotransferáza (KAT), vzniká kyselina kynurenová (Kna). KP také probíhá v extrahepatálních tkáních, kde na Trp působí indol-2,3-dioxygenáza (IDO) (Barik, 2020).



Obrázek 6: Metabolické dráhy tryptofanu (Převzato z Correia et al., 2022)

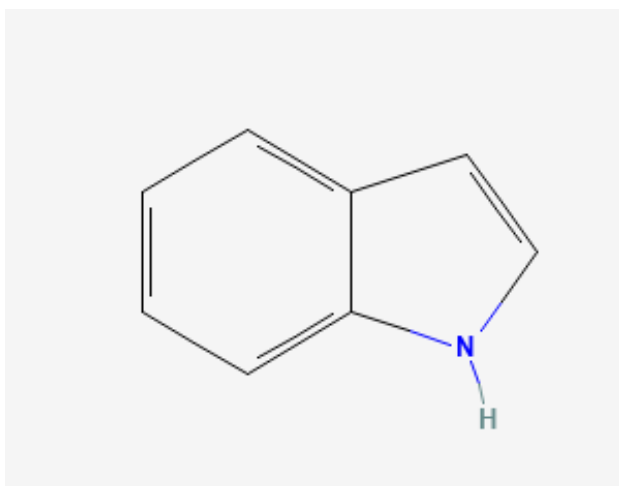
Při serotoninové cestě je Trp přeměněn na serotonin neboli 5-hydroxytryptamin (5-HT). 5-HT je syntetizován dvoustupňovou reakcí, kdy na Trp působí tryptofanovouhydroxyláza (TPH) a dekarboxyláza aromatických kyselin. 5-HT se vyskytuje v GI, krevních destičkách a centrální nervové soustavě. Melatonin se získává z 5-HT působením dvoustupňové reakce, acetylace a methylace. Melatonin se syntetizuje hlavně v epifýze, ale i v GI, v kůži a leukocytech. Endogenní metabolity Trp hrají důležitou roli při regulaci střevní imunitní homeostázy (Melhem et al., 2021).

Trp je ve střevním mikrobiomu transformován na indolové deriváty, které mají schopnost aktivovat AhR. Jeho aktivace vede k sekreci střevních imunitních buněk, například interleukinu-22 (IL-22), který působí protizánětlivě. Mezi metabolity Trp aktivující AhR patří indol, tryptamin a skatol (Gao et al., 2018; Melhem et al., 2021)

3.4. Indol a jeho deriváty

Indoly patří mezi heterocyklické sloučeniny podílející se na biochemických procesech života. Indol je základní látkou pro velké množství sloučenin, které se vyskytují v přírodě. Indol je bílá krystalická látka, která má nepříjemný zápach ve vysokých koncentracích, ale při nízkých koncentracích voní po jasmínu. Indol produkují grampozitivní a gramnegativní bakterie, například *Escherichia coli*. V posledních letech se zjistilo, že indoly hrají významnou roli v komunikaci mezi střevním mikrobiomem a hostitelem. Mezi střevní metabolity s indolovou strukturou jsou indol-3-pyruvát (IPY), indol-3-láktát (ILA), indol-3-akrylát (IAC), indol-3-ethanol (IET), indol-3-aldehyd (IA) (Chimerel et al., 2013; Kaushik et al., 2013; Vyhlídalová et al., 2020).

Deriváty indolu jsou velmi rozmanité a mají různorodou funkci. Deriváty indolu mají biologické účinky, protizánětlivé účinky a antimikrobiální aktivity. Deriváty, které mají elektrofilní substituenty mohou být prospěšné ve farmakokinetice a farmakodynamice a mohou být použity jako léčiva. Elektrofilní deriváty indolu vznikají nitrací (působení indolu kyselinou dusičnou), halogenací (působí na indol halogeny), sulfonací (působí na indol kyselina sírová nebo oleeum), alkylací a acylací. Indoly vzniklé nitrací jsou nitroderiváty indolu např. 4, 5 6-nitroindol, deriváty vzniklé halogeny jsou halogen deriváty indolu například 4, 5, 6, 7-fluoroindol a sulfonací jsou sulfoderiváty indolu. (Loakes et al., 1994; Ibrahim et al., 2020).



Obrázek 7: Struktura indolu (Převzati z : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/798>)

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1. Biologický materiál

Pro stanovení cytotoxicity fluorovaných derivátů indolu byla použita adherentní buněčná linie LS174T (ATCC, kat. č. CL – 188, 7000 3535), která je odvozená od karcinomu tlustého střeva. Pro stanovení transkripční aktivity AhR byla použita stabilně transfekovaná buněčná linie LS174T – AhR, která byla připravena stabilní transfekcí buněčné linie LS174T plazmidem pGL-4.27 – DRE. Tento plazmid nese gen pro rezistenci na hygromycin B. Pro stanovení transkripční aktivity PXR byla použita buněčná linie LS174T, která byla transfekována plazmidem pSG5-hPXR a reportérovým vektorem p3A4-luc nesoucí oblasti XX a XX z promotoru genu *CYP3A4*.

4.2. Použité chemikálie, soupravy, roztoky

4.2.1. Použité chemikálie

- 0,04% roztok tryptofanové modři ve vodě (Sigma-Aldrich, kat. č. T6146)
- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, ULTRA Scientific kat. č.48599)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach:ner,kat. č. 20022 – CTO – M1000 - 1)
- Fosfátový pufr (PBS, Serena, kat. č.BDL_001)
- Fugene HD (Promega, kat. č. E231A)
- Hygromycin B (SantaCruz Biotechnology, CS – 29067)

- Kultivační médium DMEM: Dubelcco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) do kterého bylo přidáno:
 - 10 % fetální bovinního séra (FBS, Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, kat. č. F6178)
 - 2 mM L-glutaminu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540)
 - 1 % neesenciálních aminokyselin (MEM, Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)
 - Roztok o 100 µg/ml penicilinu a 100 U/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333)
- Kultivační médium DMEM–CS: Dulbecco's Modified Eagle's Medium–high glucose (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) do kterého bylo přidáno:
 - 10 % hormonálně inaktivního fetálního bovinního séra (FBS–CS. Fetal Bovine Serum Charcoal Stripped, Sigma-Aldrich, kat. č. F6765)
 - 2 mM L-glutaminu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540)
 - 1 % neesenciální aminokyseliny (MEM, Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)
 - roztoku antibiotik koncentraci 100 µg/ml penicilinu a 100U/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333)
- Lyzační pufr: 5X Reporter Lysis Butter (Promega, kat. č. E397A)
- Methanol (Penta, kat. č. 21210-20005)
- Methyltetrazoliová sůl (MTT) (Sigma-Aldrich, kat. č. M 2128-5G)
- Neutral Red Assay Kit–Cell Viability (Abcam, kat. č. 234039)
- Opti–MEM (Sigma-Aldrich, kat. č. R6546)
- Oktylfenol etoxylát (Triton X-100, Serva, kat. č. 37240)
- Rifampicin (RIF, Sigma-Aldrich, kat. č. R3501)
- Substrát pro luciferázu:
 - 5 mg D-Luciferinu (Sigma-Aldrich, kat. č. L9504)
 - 10 mg Adenosin–5–trifosfát (ATP, Sigma-Aldrich, kat. č. A2383-56)
 - 5 mg Koenzymu A (CoA, Sigma-Aldrich, kat. č. C 4780)
 - 1,32 ml Trisacetátu – EDTA pufru 1 mol·l⁻¹(Sigma-Aldrich, kat. č. A6419)
 - 1,23mg/6,6 µl 0,5 mol·l⁻¹ ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, Sigma-Aldrich kat. č. E9884-100G)

- 3,03 mg/1,23 ml 100 mmol·l⁻¹ Heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO₄ ·7H₂O, LACHEMA)
- Celkový objem =30 ml, doplnění deonizovanou vodou
- Trypsin (Sigma-Aldrich, kat. č.59428)

4.2.2 Testované látky

- 4-fluorindol (4-FI) (Sigma-Aldrich, kat. č. 457396)
- 5-fluorindol (5-FI) (Sigma-Aldrich, kat. č. F9108)
- 6-fluorindol (6-FI) (Sigma-Aldrich, kat. č. 349593)
- 7-fluorindol (7-FI) (Sigma-Aldrich, kat. č. 740764)

4.3. Seznam laboratorních pomůcek a přístrojů

4.3.1 Seznam použitých laboratorních pomůcek

- 96 – Jamková bílá destička na měření luminiscence (NUNC)
- 96 – Jamková černá destička na měření luminiscence (NUNC)
- 96 – Jamková kultivační destička (TPP)
- Automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)
- Buničina (Tork)
- Bürkerova komůrka (Assastent)
- Krycí sklíčka 22x22 mm (Menzel Gläser)
- Mikrozkušavky o objemu 0,5 ml, 1,5 ml, 5 ml (BIOplastic)
- Multikanálové pipety v rozsahu 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 30 – 300 µl (Eppendorf)
- Nastavitelná multikanálová pipeta 15 – 300 µl (Eppendorf)
- Petriho misky o objemech 40 ml a 60 ml (TPP)
- Pipetor FastPette (Labnet)
- Plastová nádobka o objemu 125 ml (TPP)
- Plastová kultivační láhve o objemech 75 ml a 150 ml (TPP)
- Plastové pipety o objemech 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)

- Plastové stojany na zkumavky a mikrozukavky
- Plastové špičky v rozsahu 0,1–10 μ l, 2–200 μ l, 20 – 300 μ l, 100 – 1000 μ l (Eppendorf)
- Plastové zkumavky o objemech 15 ml a 50 ml (TPP)

4.3.2 Seznam použitých přístrojů

- Aspirátor FTA-1 (Biosan)
- CO₂ inkubátor (N-Biotek)
- Hlubokomrazicí box (Green Line)
- Laminární box Labculture (ESCO)
- Multifunkční modulární reader Infinite M200 (Tecas)
- Světelný mikroskop (Novel Optics)
- Třepačka Mini-Rocker Shaker MR-12 (Biosan)
- Vodní lázeň LCB 11 D (Daihan Labtech)
- Vortex Reax top (Heidolph)

4.4. Experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Kultivace buněk

Adherentní buněčná linie LS174T-AhR byla kultivována v kultivační láhvi s médiem DMEM, které bylo obohaceno o fetální bovinní sérum, L-glutamin, neesenciální aminokyseliny, penicilin a streptomycin. Hygromycin B je antibiotikum, které bylo aplikováno pro udržení reportérového plasmidu v buňkách. Aplikováno bylo každou třetí pasáž v koncentraci 0,2 mg/ml. Kultivační láhev s buněčnou linií byla inkubována v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

4.4.2. Pasážování buněk

Buněčná linie byla pasážována jednou za 3-4 dny. Kultivační medium bylo ohřáto na 37 °C ve vodní lázni. První krok při pasážování bylo vytažení kultivační láhve s buňkami z inkubátoru a následná kontrola pod mikroskopem, kde byla zhodnocena konfluencí buněk. Následně byla kultivační láhev přesunuta do sterilního laminárního flowboxu, kde bylo provedeno samotné pasážování. Staré médium bylo odsáto pomocí odsávačky, následně bylo do láhve napipetováno 5 ml fosfátového pufru, který sloužil k oplachu buněk a následovalo odsátí fosfátového pufru a napipetování 1 ml proteázového trypsinu, který sloužil k uvolnění adherovaných buněk ze dna kultivační láhve. Následně byla láhev vložena na 3-5 minut do inkubátoru. Po uplynutí této doby byla lahev vrácena do laminárního flowboxu,

kde do ní bylo přidáno 9 ml média (DMEM) a pomocí 10ml sterilní plastové pipety byly buňky resuspendovány a přeneseny do 50 ml zkumavky. Následně bylo odebráno 10 μ l suspenze a těchto 10 μ l bylo použito ke spočítání buněk v suspenzi. Po spočítání buněk byl vrácen 1 ml suspenze o koncentraci 2 milióny buněk/1 ml zpět do lahve spolu s 15 ml média (DMEM) a láhev byla vrácena zpět do inkubátoru.

4.4.3 Počítání buněk

Buňky byly počítány pomocí trypanové modři, Bürkerovy komůrky a světelného mikroskopu. Trypanová modř byla přidána do suspenze buněk pro odlišení živých buněk od neživých. Živé buňky nebyly obarveny, protože měly nenarušenou membránu, zatímco mrtvé buňky obarveny byly, protože jejich membrána byla narušena, což umožnilo proniknutí trypanové modři do buněk.

Nejprve bylo odebráno 10 μ l buněčné suspenze a přidáno 90 μ l trypanové modři, ty byly promíchány a výsledná směs byla napipetována do Bürkerovy komůrky, která byla vložena pod mikroskop a bylo spočítáno množství buněk v 10 komůrkách. Z tohoto množství byl vypočítán průměr, který byl vynásoben 10^5 a výsledkem výpočtu byla koncentrace živých buněk v 1 ml suspenze.

4.4.4 Vysévání buněk

Pro metody určující cytotoxicitu, což jsou MTT test a Neutral Red Assay, a také pro Gene Reporter Assay pro receptor AhR byly připravovány 96 - jamkové destičky. V každé jamce bylo vyseto 40 000 buněk ve 200 μ l média. U Gene Reporter Assay pro PXR byly připravovány 96 - jamkové desky a v každé jamce bylo vyseto 30 000 buněk v 200 μ media. Po vysetí byly desky uloženy na 24 hodin do inkubátoru, aby buňky narostly do potřebné konfluence.

4.4.5 Příprava zásobních roztoků testovaných látek

Prvně byla vypočítána navážka pro 200 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ daného fluorovaného derivátu indolu. Navážka byla rozpuštěna v dimetylsulfoxidu (DMSO) a další roztoky o nižších koncentracích byly připraveny pomocí postupného ředění na požadované koncentrace dle tabulky (viz tabulka 1).

Tabulka 3: Ředění testovaných látek.

Testovaná látka	Molární hmotnost	Koncentrace [mmol · l ⁻¹]	Objem dané látky [μl]	Objem DMSO [μl]	Celkový objem [μl]
4-fluorindol	134,14	200			100
	(návážka:27,028 mg)	100	50	50	100
		50	50	50	100
		25	50	50	100
		10	40	60	100
		1	10	90	100
		0,1	10	90	100
		0,01	10	90	100
		0,001	10	90	100
		0,01	10	90	100
	0,001	10	90	100	

4.4.6 Stanovení viability buněčné linie

Pro stanovení viability buněčné linie LS174T AhR byly použity MTT test a NR Assay. Na buněčnou linii LS174 AhR bylo působeno testovanými látkami 4FI, 5FI, 6FI a 7FI, které byly 1000x zředěny ze zásobních roztoků do média.

4.4.6.1 MTT test

MTT test je test viability buněk založený na metabolismu mitochondriální dehydrogenázy, který probíhá u živých buněk, ale u mrtvých nikoliv. Při této metodě je žlutý MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) přeměněn na tmavě fialové krystalky formazánu ((E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan). Když je buňka mrtvá, nedochází k této reakci.

Prvním krokem testu bylo vyšetí buněčné linie LS174T AhR do 96 - jamkové destičky, kde v jedné jamce bylo vyseto 40 000 buněk a deska byla 24 hodin kultivována v inkubátoru. Po 24 hodinách byla deska vytažena a mikroskopicky bylo zkontrolováno, zda nedošlo ke kontaminaci a zda je konfluence buněk v pořádku. Další kroky byly prováděny v laminárním flowboxu. Zde bylo z jednotlivých jamek odsáto médium a místo něj bylo přidáno 200 μl testovaných rozpuštěných látek. Jako pozitivní kontrola byl použit Triton X-100 a jako negativní kontrola bylo použito DMSO. Kontroly byly ředěny 1000x. Deska byla následně vrácena na 24 hodin do inkubátoru. Po 24 hodinách byly roztoky v jamkách vyklepnuty a nahrazeny 100 μl nesterilního PBS sloužícího k oplachu. To bylo následně také vyklepnuto. Dále bylo do každé jamky napipetováno 100 μl MTT, které bylo 10x zředěno médiem. Po napipetování byla deska vložena na 20 minut do inkubátoru. Po 20 minutách se žluté MTT přeměnilo na fialové krystalky formazánu. Médium s MTT bylo opatrně vyklepnuto a následně bylo do každé jamky napipetováno 70 μl DMSO, které rozpustilo krystalky formazánu. Následovalo měření na spektrofotometru při 540nm.

4.4.6.2 Neutral Red Assay

Neutral Red Assay slouží k zjištění cytotoxicity u buněčných linií. Je založena na hromadění červeného barviva (3-amini-7-dimethylamino-2-methylfenazin hydrochlorid) v lysozomech živých buněk. V mrtvých buňkách se barvivo nehromadí a tím pádem jsou bezbarvé.

Neutral Red Assay byla provedena přesně podle protokolu od výrobce kitu (Neutral Red Assay Kit – Cell Viability). Do 96 - jamkové destičky byly první den vysety buňky v koncentraci 40 000 buněk na jednu jamku a následovala 24hodinová inkubace. Druhý den bylo medium odsáto a do jamek bylo napipetováno 200 μ l media s testovanými látkami. Jako pozitivní kontrola sloužil Triton X-100 a jako negativní kontrola sloužilo DMSO. Následně byla deska inkubována 24 hodin v inkubátoru. Po uplynutí této doby byly roztoky z desky vyklepnuty a do jamek bylo napipetováno 150 μ l roztoku neutrální červeně naředěné médiem v poměru 1:99. Následovala 2hodinová inkubace, a po inkubaci byl roztok vyklepnut a buňky opláchnuty 250 μ l promývacího roztoku. Následovalo vyklepnutí promývacího roztoku a deska byla ponechána vyschnout. Po vyschnutí bylo do jamek napipetováno 150 μ l solubilizačního roztoku a deska byla dána na kývačku. Po zreagování byla měřena absorbance roztoku v jednotlivých jamkách ve spektrofotometru při 540 nm.

4.4.7. Reporter Gene Assay

Reporter Gene Assay je bioluminiscenční metoda, která sleduje genovou expresi na úrovni transkripce. Používají se při ní buněčné linie, které jsou transfekovány reportérovým plazmidem. Pokud je aktivován příslušný receptor, transferovaný plazmid produkuje enzym luciferázu. Po aktivaci se přidává substrát D-Luciferin a dochází k jeho přeměně na oxyluciferin za vzniku záření, které je přímo úměrné aktivitě receptoru. Záření bylo měřeno na spektrofotometru.

4.4.7.1. Reporter Gene Assay pro AhR

Na 96 - jamkovou desku byla vyseta koncentrace 40 000 buněk na jamku. Po vysetí byla deska vložena na 24 hodin do inkubátoru. Dále následoval přesun do laminárního boxu, testované látky byly 1000x ředěny do média, jako negativní kontrola bylo použito DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit TCDD. Pro porovnání aktivity vzhledem k testovaným látkám byl použit indol. Naředěné látky byly napipetovány do jamek a desky byly vloženy na 4, nebo 24 hodin do inkubátoru. Po uplynutí dané doby bylo TCDD odpipetováno do speciální nádoby a ostatní roztoky byly z desky vyklepnuty. Do jamek bylo napipetováno 30 μ l lyzačního pufru, následovalo zamražení desky při -80°C po dobu 15-45 minut, dokud nebyl lyzační pufr zcela zamražen. Po zamražení byla deska vytažena a dána na třepačku, dokud nebyl roztok zcela rozmražen. Po rozmražení bylo do jamek 96 – jamkové, bílé, luminiscenční desky napipetováno 6 μ l lyzačního pufru a 30 μ l D-Luciferinu. Absorbance byla změřena pomocí spektrofotometru.

4.4.7.2. Reporter Gene Assay pro PXR

Prvním krokem byla transfekce receptoru PXR do buněčné linie LS174T. Při tomto experimentu bylo použito DMEM médium s PBS-CS. Celá práce byla prováděna v laminárním flowboxu. Nejprve bylo do skleněné zkumavky napipetováno 1,8 ml OPT - MEM a 108 μ l FuGENE HD. Směs byla inkubována po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 26,5 μ l reportérového plasmidu a 12,33 μ l expresního vektoru a směs byla inkubována po dobu 25 minut. Po uplynutí dané doby byla směs přidána do připravené desky s buňkami, kde byla koncentrace 30 000 buněk na jamku.

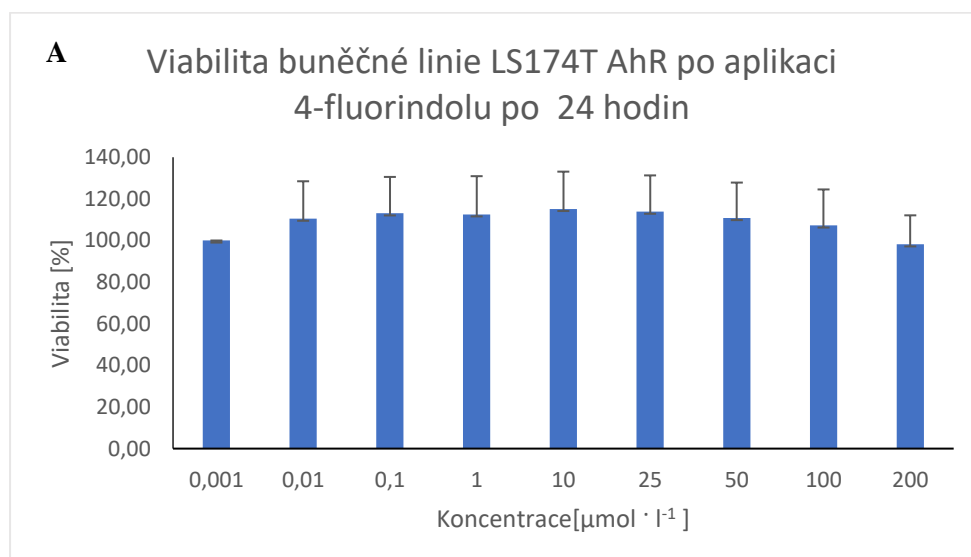
Do 96 - jamkové destičky byly vysety buňky v koncentraci 30 000 buněk na jamku a byly 24 hodin inkubovány. Jednotlivé kroky postupu byly prováděny v laminárním boxu. Nejprve bylo z jamek odsáto medium a bylo nahrazeno 1000x zředěnými testovanými látkami. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO a jako pozitivní kontrola RIF. Pro porovnání aktivity vzhledem k testovaným látkám byl použit indol. Následně byla deska vložena na 24 hodin do inkubátoru. Po inkubaci byly roztoky z desky vyklepnuty, do jamek byl napipetován lyzační pufr a deska byla vložena do mrazáku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 15-45 minut, dokud nebyl lyzační pufr zcela zamražen. Po úplném zmražení byla deska vytáhnutá a položena na kývačku do chvíle, kdy zcela rozmrzla. Po rozmrznutí bylo do jamek 96 - jamkové černé luminiscenční desky napipetováno 6 μ l lyzátu, a následně bylo přidáno 30 μ l substrátu. Luminiscence byla změřena pomocí spektrofotometru.

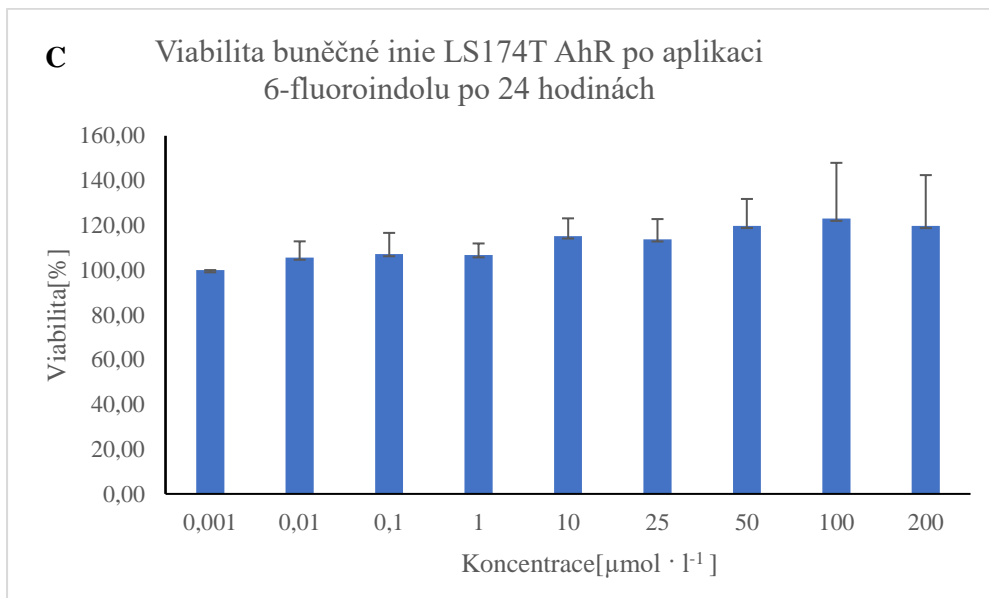
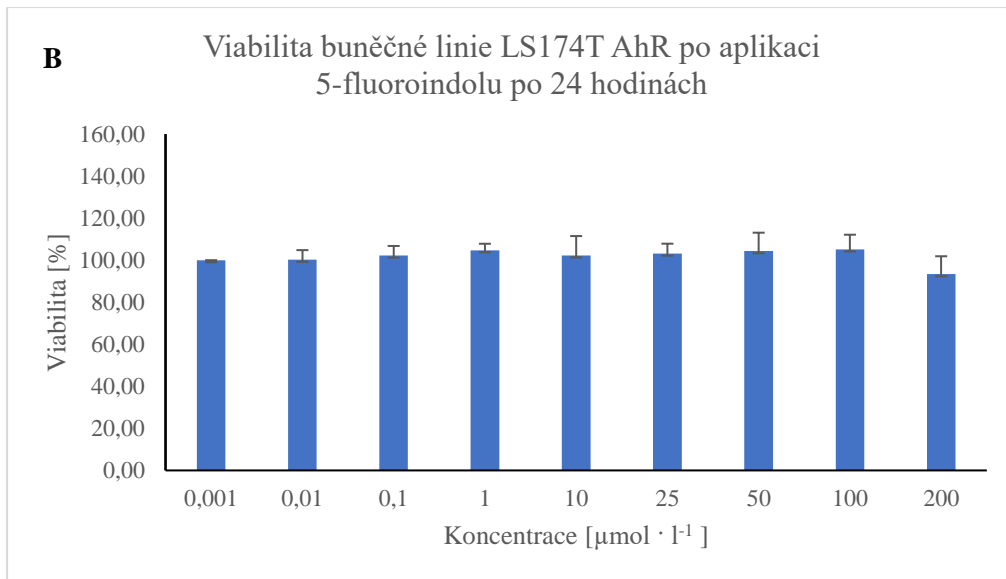
5 VÝSLEDKY

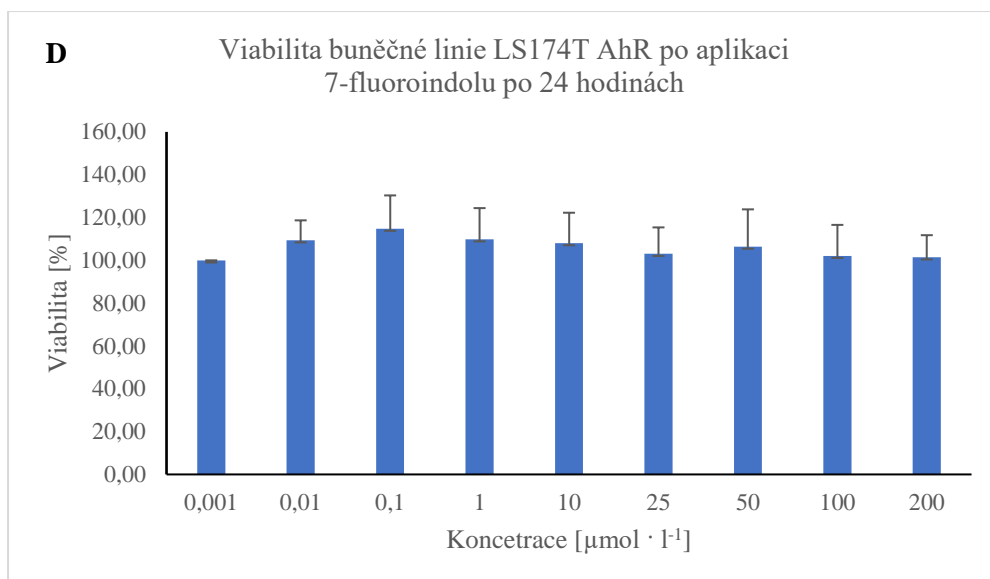
5.1 Stanovení cytotoxických účinků fluorovaných derivátů indolu

Cytotoxické účinky fluorovaných derivátů indolu na buněčnou linii LS174T byly stanoveny pomocí MTT testu. Testované látky byly 4-fluorindol, 5-fluorindol, 6-fluorindol a 7-fluorindol. Z vyhodnocených měření vyplývá, že u 4-fluorindolu v koncentraci 200 μM způsobilo snížení na $98,16 \pm 13,93 \%$. U zbývajících koncentrací se viabilita pohybovala od 100 % a výše. U zbývajících testovaných látek jsme nepozorovali významný pokles viability. (Obr. 8 A-D).

Látky 6-fluorindol a 7-fluorindol způsobily zvýšení buněčné viability téměř na 120 %, což může být způsobeno ovlivněním mitochondriální dehydrogenázy. Z tohoto důvodu jsme provedli stanovení cytotoxicity u 6-fluorindolu a 7-fluorindolu pomocí metody Neutral Red Assay. Z výsledků vyplývá, že se viabilita buněk po působení 6-fluorindolu a 7-fluorindolu nezvyšovala a u většiny koncentrací byla pod 100 % (Obr. 8 A, B). Je pravděpodobné, že látky ovlivňují aktivitu mitochondriální dehydrogenázy při MTT testu a nejsou cytotoxické pro buněčnou linii LS174T.

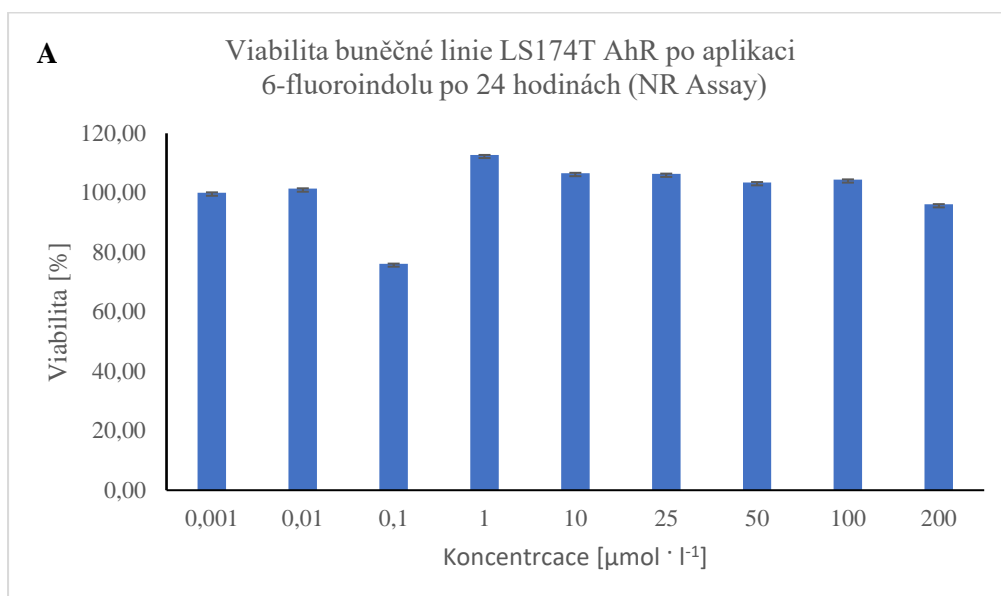


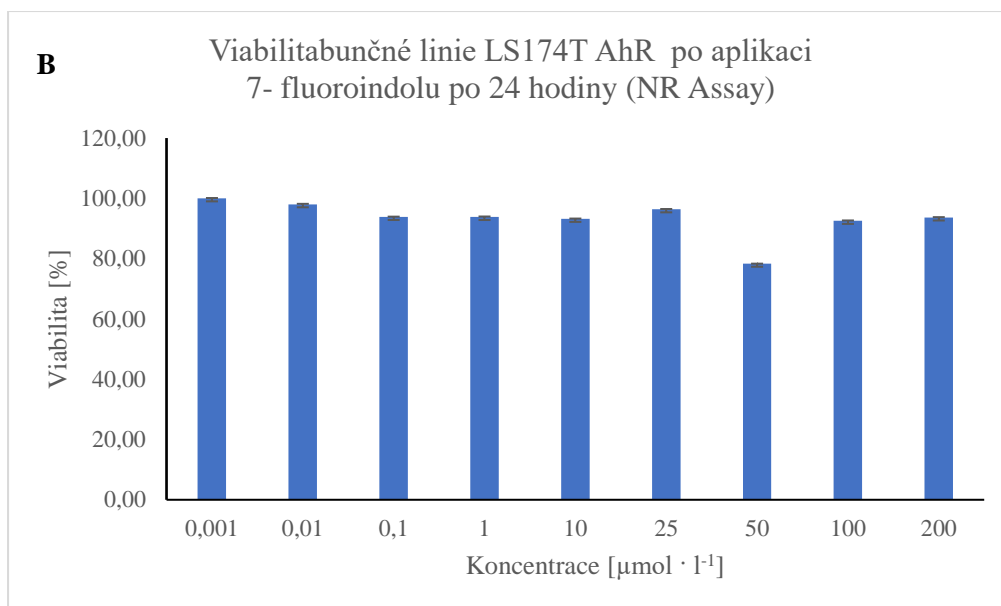




Obrázek 8: Vliv působení vybraných fluorovaných derivátů indolu na viabilitu buněčné linie LS174T po 24 hodinách.

Buněčná linie LS174T byla inkubována se studovanými látkami o koncentracích ($0,001 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). 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 průměr čtyř na sobě nezávislých experimentů.





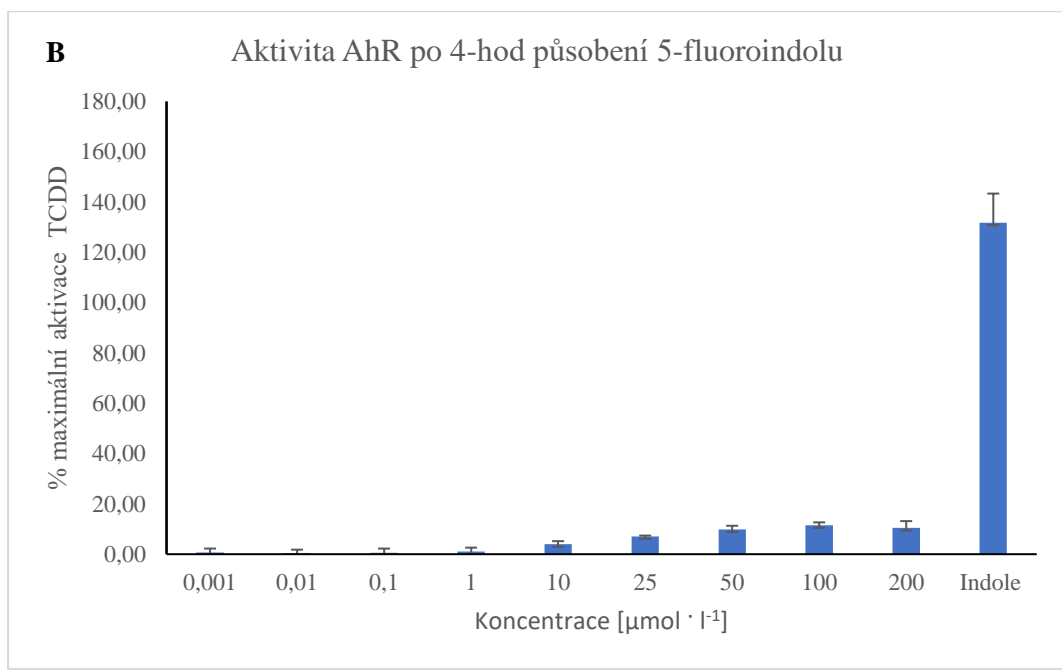
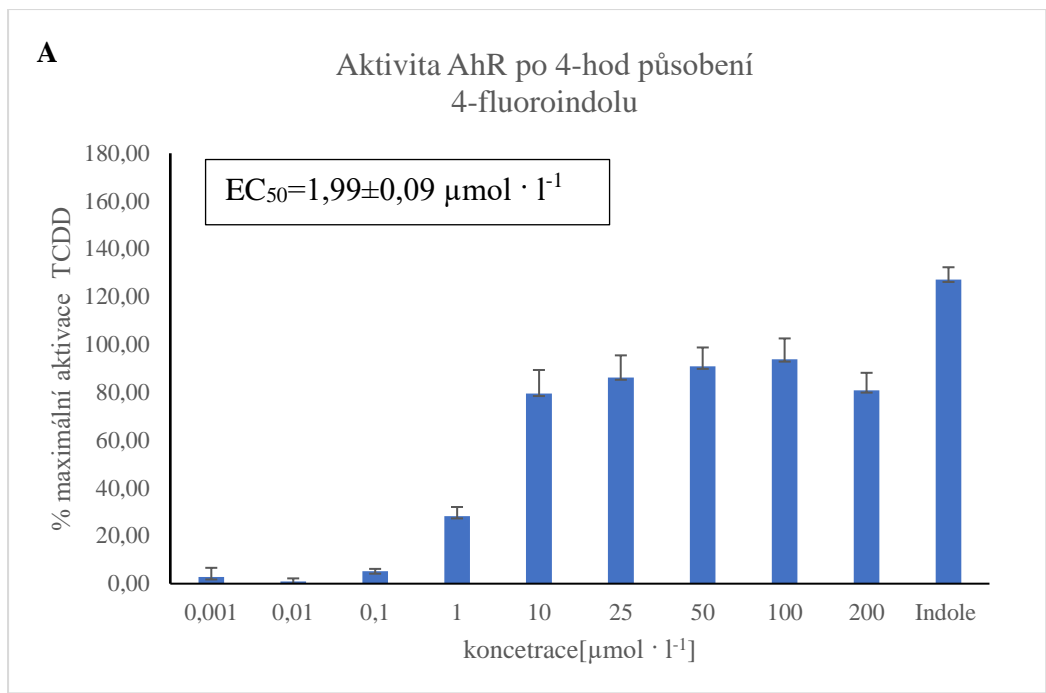
Obrázek 9: Vliv působení 6-fluoroindolu a 7-fluoroindolu na viabilitu buněčné linie LS174T po 24 hodinové aplikaci (NR Assay)

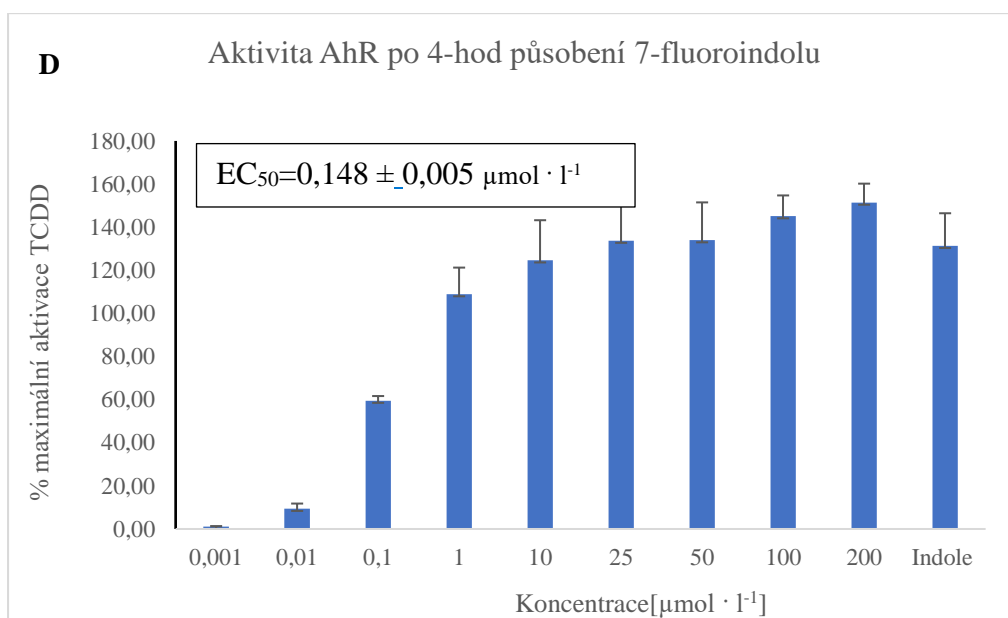
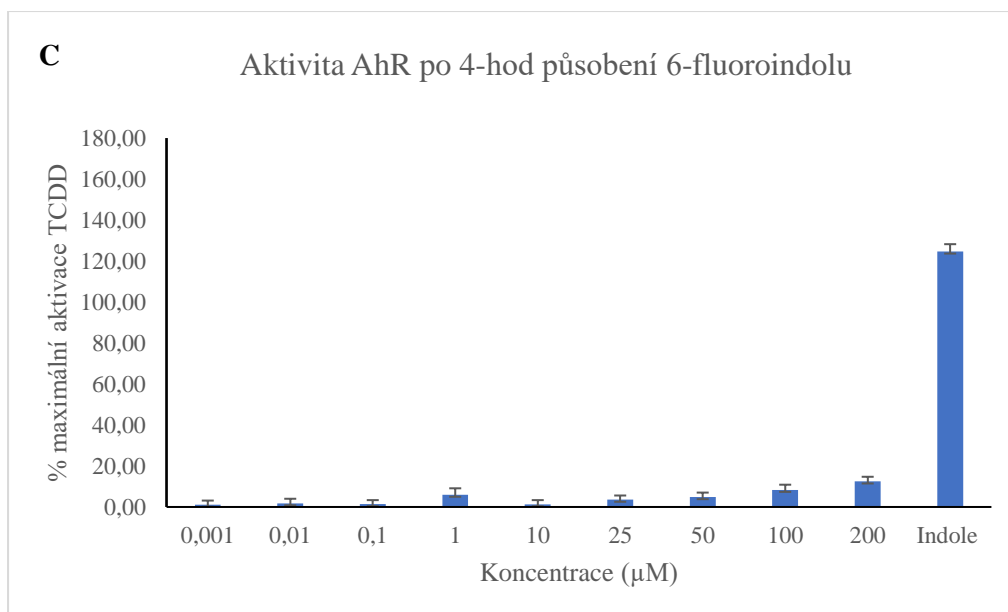
Buněčná linie byla inkubovaná s 6-fluoroindolu a 7-fluoroindolu o koncentracích ($0,001 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Jako negativní kontrola byla použita 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton. Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci $0,001 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, která představovala 100 %. Výsledné grafy jsou z jednoho testu NR Assay.

Na základě zjištěných výsledků můžeme konstatovat, že vybrané fluorované deriváty indolu v koncentracích $0,001 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ nemají toxické účinky na buněčnou linii LS174T a mohly být použity pro sledování vlivu na transkripční aktivitu AhR a PXR.

5.2 Vliv fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu AhR

Transkripční aktivita AhR po působení fluorovaných derivátů indolu byla stanovena luciferázovou reportérovou esejí. TCDD v koncentraci $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl použit jako pozitivní kontrola a transkripční aktivita AhR po jeho působení byla považována jako 100 %. Indol jako parentní látka testovaných derivátů aktivoval AhR oproti pozitivní kontrole TCDD s účinností přibližně 130 %. Z výsledných grafů vyplývá, že 4-fluorindol po 4 hod způsobil zvýšení transkripční aktivity AhR v závislosti na rostoucí koncentraci. Nejvyšší aktivita byla pozorována v koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a dosáhla téměř 94% aktivace TCDD, v koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je pozorováno mírné snížení aktivity AhR (Obr. 9A). 5-fluorindol a 6-fluorindol aktivovaly AhR pouze slabě. Maximální luciferázová aktivita byla naměřena v nejvyšších testovaných koncentracích $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a odpovídala 11% účinnosti pro 5-fluorindol a 12,5 % účinnosti pro 6-fluorindol. Nejsilnější aktivace AhR po 4 hod byla pozorována u 7-fluorindolu, který již v koncentraci $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ způsobil indukci luciferázové aktivity odpovídající 109 % maximální aktivace TCDD. V porovnání s indolem, 4-fluorindol aktivoval AhR s nižší účinností a 7-fluorindol způsobil aktivaci AhR s vyšší účinností než indol.



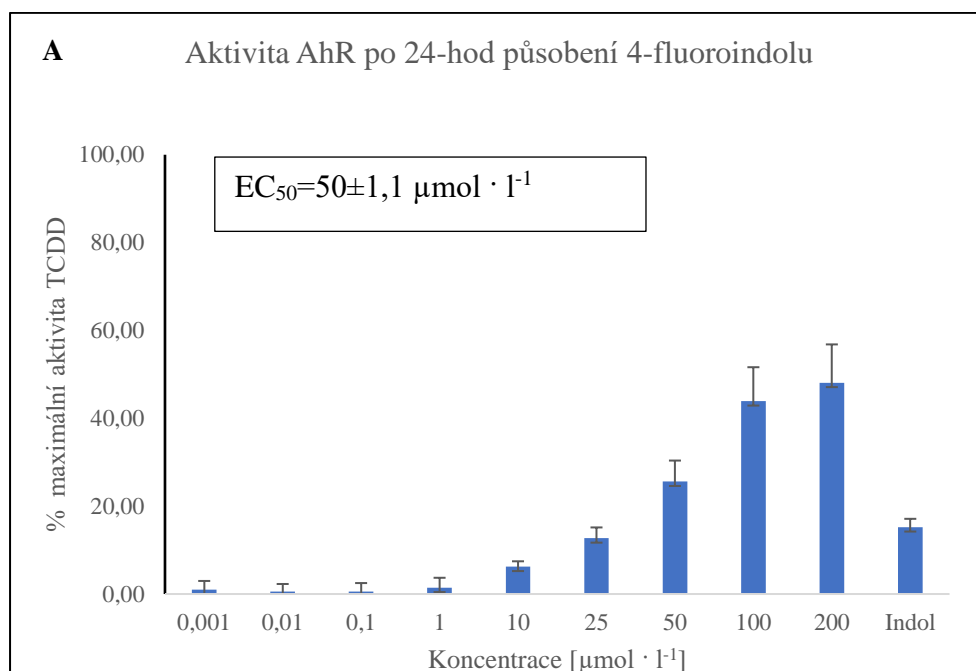


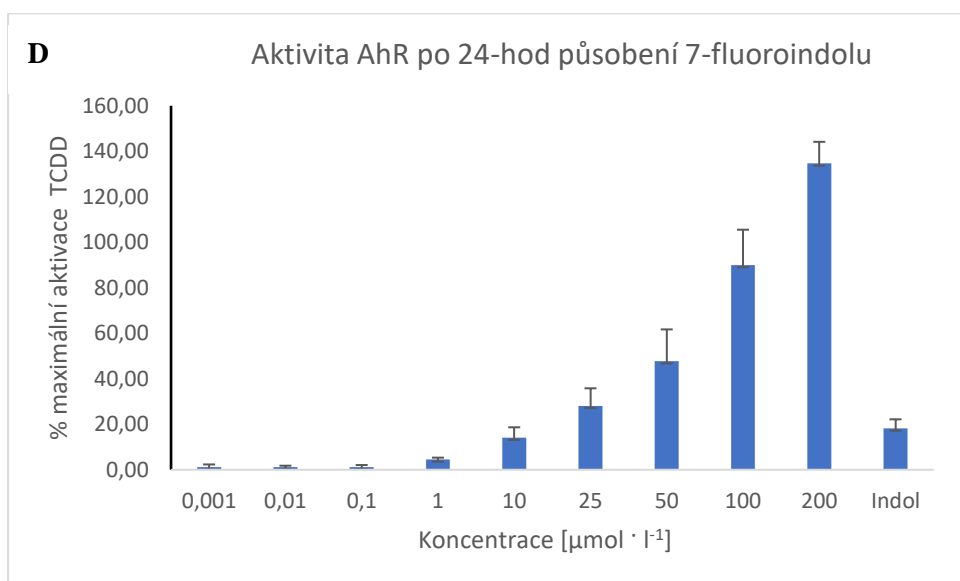
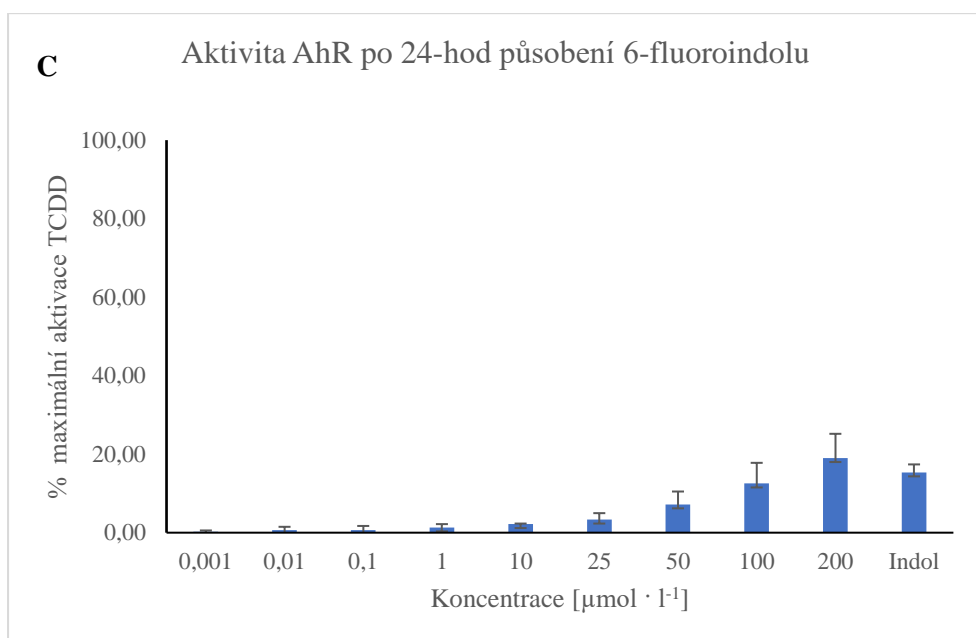
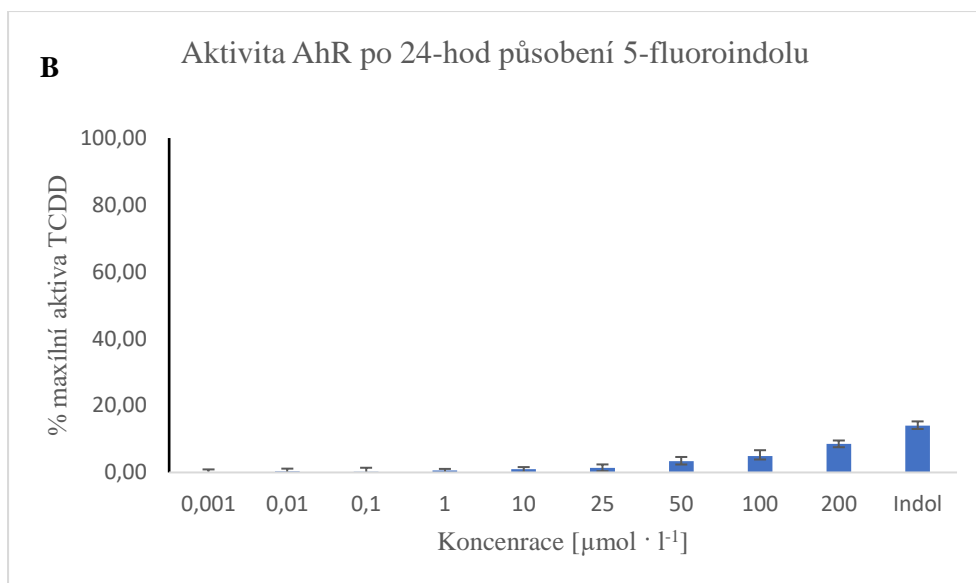
Obrázek 10: Vliv působení vybraných fluoroindolů na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii LS174T-AhR po 4 hodinové aplikaci.

Buněčná linie byla inkubována se studovanými látkami o koncentracích (0,001 µmol · l⁻¹ – 200 µmol · l⁻¹). Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 10 nmol · l⁻¹ TCDD. Pro porovnání aktivity byl použit indol o koncentraci 200 µmol · l⁻¹. Výsledky byly vztaženy k pozitivní kontrole, která představuje 100 % aktivaci. Výsledné grafy jsou průměrem třech na sobě nezávislých experimentů. Hodnoty EC₅₀ byly vypočítány pomocí AATBioquest

24hodinové působení indolu při koncentraci 200 µmol · l⁻¹ způsobilo snížení transkripční aktivity AhR přibližně o 115% v porovnání se 4hodinovým experimentem. 4-fluoroindol po 24hodinovém působení indukoval luciferázovou aktivitu v závislosti na rostoucí koncentraci, avšak podobně jako u indolu došlo ke snížení transkripční aktivity AhR. Maximální aktivace AhR bylo dosaženo v koncentraci 200

$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a dosahovala hodnoty $48,10 \pm 8,73$ % účinnosti TCDD (Obr. 11A), kdežto po 4hodinovém působení byla zaznamenána maximální účinnost při koncentraci $25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, která odpovídala 90% aktivace TCDD. 5-fluorindol a 6-fluorindol aktivovaly AhR po 24hodinovém působení pouze slabě, s maximální účinností okolo 10 % aktivace TCDD (Obr. 10B, C). 7-fluorindol zvyšoval transkripční aktivitu AhR po 24hodinovém působení v závislosti na rostoucí koncentraci. Maximální účinnosti $134,7 \pm 9,5$ % bylo dosaženo po působení látky v koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 10D). Nicméně v porovnání se 4hodinovým experimentem, 7-fluorindol aktivoval AhR se 100% účinností v nižší koncentraci ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Z uvedených výsledků je patrné, že substituce fluorem na indolu v poloze 7 má největší vliv na aktivaci AhR ať po 4, nebo po 24 hodinách v porovnání s ostatními fluorovanými deriváty.





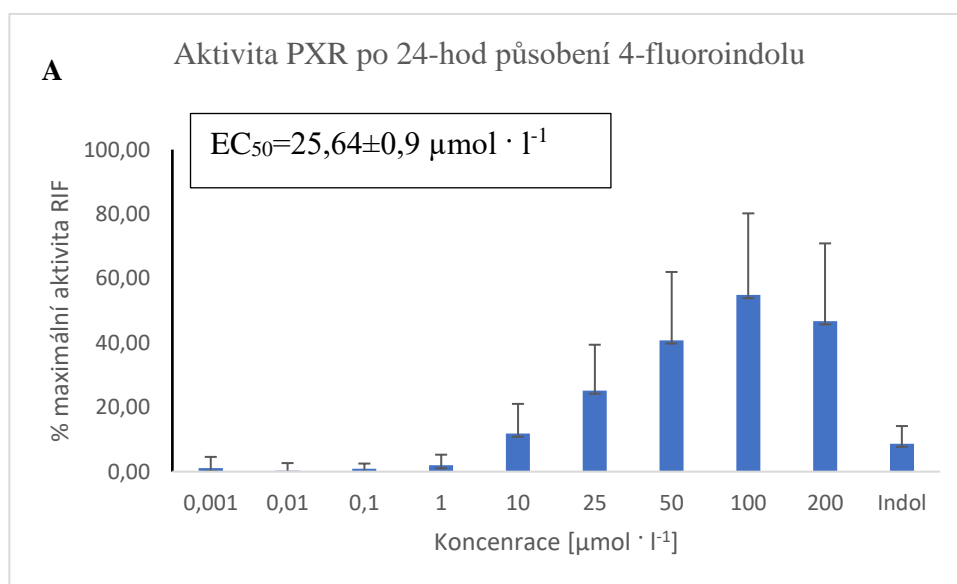
Obrázek 11: Vliv působení vybraných fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii LS174T po 24-hodinách

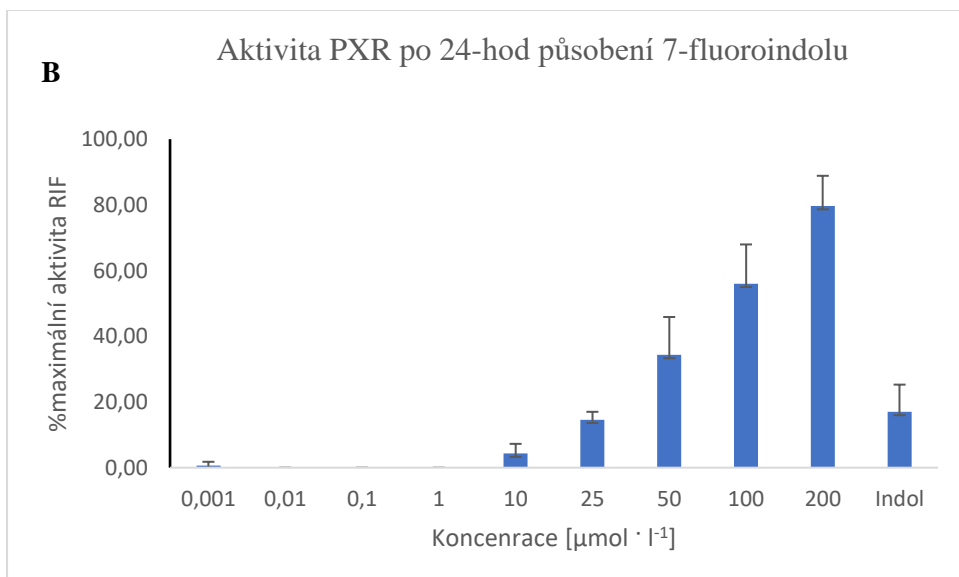
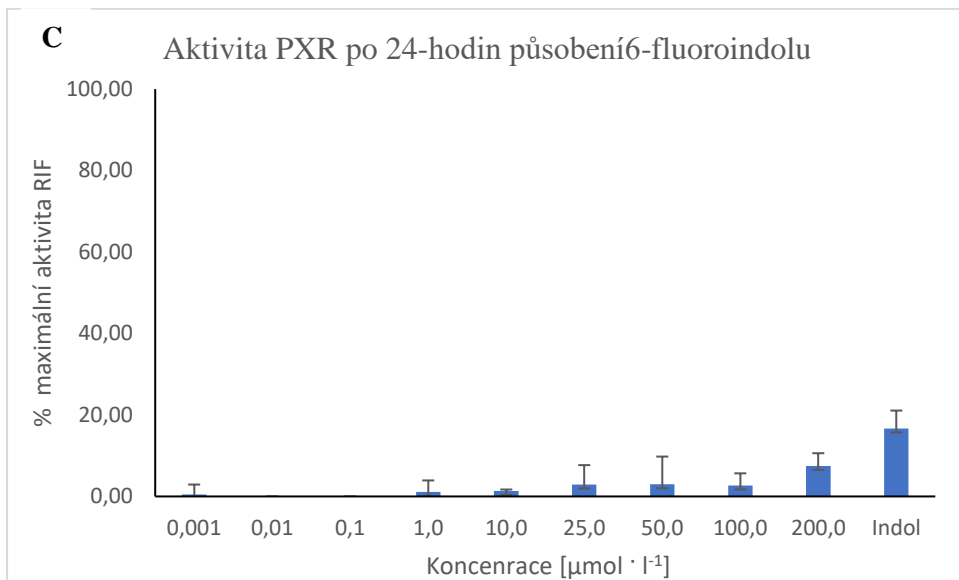
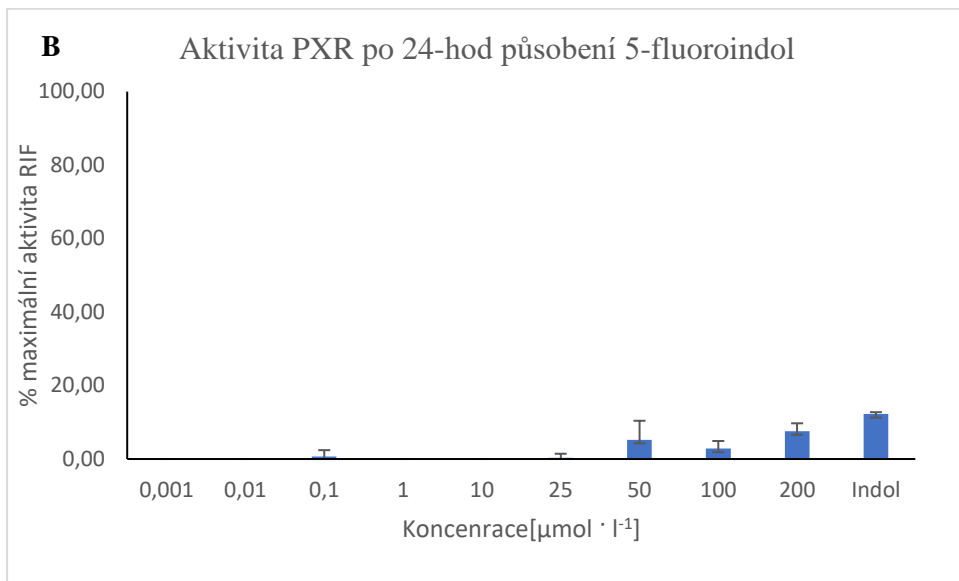
Buněčná linie byla inkubována se studovanými látkami o koncentracích ($0,001 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola se použila $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ TCDD a pro porovnání aktivity také byl použit indol o koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Aktivita byla vztažena k pozitivní kontrole, která představuje 100 %. Výsledné grafy jsou výsledkem třech na sobě nezávislých experimentů. Hodnoty IC_{50} byly vypočítány pomocí AATBioquest.

5.3 Vliv fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu PXR

Transkripční aktivita PXR byla stanovena pomocí luciferázové reportérové eseje. RIF v koncentraci $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl použit jako pozitivní kontrola a transkripční aktivita PXR po jeho působení byla považována jako 100 %. Indol jako parentní látka testovaných derivátů aktivoval PXR oproti pozitivní kontrole RIF s účinností od 8 do 17 % v závislosti na jednotlivých experimentech.

Z uvedených výsledků vyplývá, že 4-fluorindol po 24 hod zvyšoval luciferázovou aktivitu v závislosti na rostoucí koncentraci. Maximální aktivace byla pozorována v koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a účinnost dosáhla hodnoty 54,9 %. V koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo pozorováno snížení transkripční aktivity PXR na hodnotu 46,7 % aktivace RIF (Obr. 11A). Aktivace PXR 5-fluorindolem a 6-fluorindolem byla velice nízká a dosahovala jednotek % (Obr. 11 B, C). Podobně jako u aktivace AhR, 7-fluorindol způsobil nejsilnější aktivaci PXR ze všech testovaných derivátů indolu. 7-fluorindol zvyšoval transkripční aktivitu PXR v závislosti na rostoucí koncentraci s maximální aktivací odpovídající účinnosti 79,6% v koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 11D). Z uvedených dat vyplývá, že substituce fluorem na indolu v poloze 4 a 7 má pro aktivaci PXR velký význam, jelikož jsme pozorovali několikanásobné zvýšení transkripční aktivity PXR u těchto derivátů proti indolu.





Obrázek 10: Vliv působení vybraných fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu PXR v buněčné linii LS174T po 24-hodinové aplikaci

Buněčná linie byla inkubována s vybranými fluorovanými deriváty indolu o koncentracích ($0,001 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ RIF. Výsledné grafy jsou průměrem tří na sobě nezávislých experimentů.

6 DISKUSE

Mikroflóra GI ovlivňuje zdraví střev a výživu hostitele. Bylo zjištěno, že fyziologii střev ovlivňují mastné kyseliny s krátkým řetězcem, sekundární žlučové kyseliny a katabolity tryptofanu. Mnohé katabolity tryptofanu slouží jako ligandy pro aktivaci AhR a PXR. To značí, že se podílí na důležitých pochodech v mikroflóře a vědci se snaží určit, zda svou aktivací mohou být prospěšné i pro terapeutické využití při IBD (Vyhlídalová et al., 2020).

V této bakalářské práci byl sledován vztah mezi strukturou a funkcí vybraných fluorovaných derivátů indolu a jejich vliv na transkripční aktivitu AhR a PXR. Pro studium byla vybrána adherentní buněčná linie LS174T, která je odvozena od karcinomu tlustého střeva. Pro sledování transkripční aktivity AhR byla použita stabilně transfekována buněčná linie LS174T-AhR a pro stanovení transkripční PXR byla použita buněčná linie LS174T, která byla při každém experimentu transfekována. Testované látky byly 4-fluorindol, 5-fluorindol, 6-fluoridol a 7-fluorindol.

V první experimentální části byl studován vliv testovaných látek na viabilitu buněčné linie LS174T. K určení viability byl použit MTT test, výsledky z MTT testu ukázaly, že u testovaných látek nedochází k výraznému poklesu viability. U 6-fluorindolu a 7-fluorindolu byl zaznamenán nárůst viability na 120 %. Z tohoto důvodu byla dále stanovena viabilita buněk pomocí barvení neutrální červení, kde jsme nepozorovali zvýšení buněčné viability a zvýšené hodnoty viability získané z MTT testu jsou pravděpodobně výsledkem interakce látek s mitochondriálními dehydrogenázami. V druhé experimentální části byla testována transkripční aktivita AhR a PXR za použití luciferázové reportérové eseje. 4-fluorindol a 7-fluorindol aktivovaly AhR po 4 hod působení. V porovnání s indolem, pouze 7-fluorindol vykazoval silnější účinnost a to $151,4 \pm 8,8$ % v koncentraci 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. 4-fluorindol způsobil nejvyšší aktivaci AhR v koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a dosahovala hodnoty přibližně 94%. 5-fluorindol a 6-fluorindol aktivovaly AhR po 4 hod pouze slabě s maximální účinností odpovídající přibližně 10% aktivace TCDD. Po 24 hodinové inkubaci buněk s indolem došlo k výraznému poklesu transkripční aktivity AhR proti 4 hodinovému působení, konkrétně se jedná o pokles o 115%. 7-fluorindol aktivoval AhR s nejvyšší účinností v koncentraci 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ přibližně 6x vyšší než indol a dosahovala hodnoty $134,7 \pm 9,5$ %. Maximální aktivace 4-fluorindolem po 24 hodinovém působení byla pozorována v koncentraci 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ s účinností 48,1 %. Z uvedených výsledků vyplývá, že substituce fluorem na indolu v pozici 7 má větší význam pro aktivaci AhR po 4 i 24 hodinovém působení. 7-fluorindol ($EC_{50} = 0,28 \pm 0,05$ $\mu\text{mol.l}^{-1}$, účinnost $151,4 \pm 8,8$ %) aktivuje AhR silněji a s vyšší účinností než 4-fluorindole ($EC_{50} = 1,99 \pm 0,09$ $\mu\text{mol.l}^{-1}$, $93,9 \pm 8,7$ %) po 4 hodinách. Po 24 hodinách je maximální účinnost 7-fluorindolu přibližně 2,3 x vyšší než u 4-fluorindolu. Význam substituce na indolu v polohách 4 a 7 byla potvrzena ve studii sledující vliv methyl- a methoxyindolů na transkripční aktivitu AhR (Štěpánková et al., 2018). Látky 4-methylindol, 6-methylindol a 7-methoxyindol byly charakterizovány jako nejsilnější agonisté vykazující transkripční účinnost 134%, 91% a 80% v porovnání s TCDD.

Pokles aktivity u 7-fluorindol může být způsoben metabolismem látky. Významnou, ale menší aktivitu měl 4-fluoroidol. Což může znamenat, že substituenty v poloze 4 mohou mít významný vliv na transkripční aktivitu AhR.

Po 24hodinovém působení testovaných látek na aktivitu PXR byla zaznamenána největší transkripční aktivita u 7-fluorindolu, což naznačuje, že substituce fluorem na indolu v pozici 7 má největší vliv na aktivitu PXR. Transkripční aktivita 4-fluorindolu byla vyšší 5,3x než transkripční aktivita RIF, takže můžeme 4-fluorindol pokládat za silného agonistu PXR. V porovnání s indolem, pouze 7-fluorindol vykazoval silnější účinnost a to $79,63 \pm 9,21$ % v koncentraci 200 umol.l^{-1} . 4-fluorindol způsobil nejvyšší aktivaci PXR v koncentraci 100 umol.l^{-1} , aktivace dosahovala hodnoty přibližně 55%. 5-fluorindol a 6-fluorindol aktivovaly PXR po 24 hod pouze slabě s maximální účinností odpovídající přibližně 10% aktivace RIF. V porovnání s aktivací indolu byla aktivace 7-fluoroindolu PXR 9,6x vyšší a 4-fluoroindol byla aktivace 6, 3x vyšší. V porovnání s modelovým ligandem byla aktivace 4-fluoroindolu asi 65% a u 7-fluoroindolu byla asi 79 %, což je možné považovat za vhodné agonisty. Vyšší transkripční aktivace byla pozorována u indol-3-acetamidu v buněčné linii LS180 (Illés et al., 2020). Studie, která sledovala vliv substituce methylové skupiny na indolu v polohách 1-7 ukázala, že 4, 5 a 6 -methylindoly mají schopnost aktivovat PXR. Hodnoty transkripční aktivity PXR po inkubaci s 7-methylindolem byly naopak nízké

(Vyhlídalová et al., 2020). V této práci byla účinnost 7-methylindolu 34 %, zatímco pro 7-fluoroindolu byla 79 % v porovnání s RIF a účinnost 4-methylindolu byla 111%, zatímco u 4-fluoroindolu byla 65 %.

Působením testovaných látek na AhR a PXR při 24hodinové inkubaci bylo zjištěno, že největší transkripční aktivitu má 7-fluoroindol a 4-fluoroindol, ale nejsou selektivní antagonisté, protože významně aktivovaly AhR a PXR, což by mohlo být předmětem dalšího studia.

Pro lepší charakterizaci účinků testovaných látek na PXR by bylo vhodné sledovat jejich vliv při kratší inkubaci buněčné linie s testovanými látkami, např. 8- nebo 12- hodinovém působení.

7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl zkoumán vliv vybraných fluorovaných derivátů indolu na transkripční aktivitu AhR a PXR v lidské buněčné linii LS174T, která je odvozená od karcinomu tlustého střeva. Testované látky byly 4-fluoroindol, 5-fluoroindol, 6-fluoroindol a 7-fluoroindol.

V literárním přehledu byly popsány jednotlivé fáze procesu biotransformace xenobiotik. Dále byly popsány jaderné receptory, receptory AhR a PXR a mechanismus aktivace, jejich ligandy a jejich vliv na imunitu a roli ve střevní mikroflóře. Dále byla popsána střevní mikroflóra a role AhR a PXR při střevních onemocněních.

V experimentální části byla nejdříve zjišťována cytotoxicita studovaných látek na buněčnou linii při 24hodinovém působení pomocí MTT testu. Z testovaných látek bylo vyhodnoceno, že žádná z koncentrací nebyla toxická pro buněčnou linii. U 6-fluoroindolu a 7-fluoroindolu bylo zjištěn nárůst viability buněk nad 120 %, proto byla sledována buněčná viabilita pomocí barvení neutrální červení, kdy hodnoty klesly ke 100 %. Z tohoto porovnání lze vyhodnotit, že 6-fluoroindol a 7-fluoroindol mají vliv na mitochondriální dehydrogenázu a je možné, že mohou zkreslovat výsledky.

Ve druhé fázi experimentální části byl sledován vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR při 4–a 24- hodinovém působení a aktivitu PXR při 24- hodinovém působení luciferázovou reportérovou esejí. Nevyšší aktivita ze všech testovaných látek byla zjištěna u 7-fluoroindolu, kdy nevyšší aktivita AhR byla u 4hodinového působení při koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a to konkrétně $151,40 \pm 8,8\%$ v porovnání s aktivitou vyvolanou TCDD, který představoval 100%. Další významnou testovanou látkou byl i 4-fluoroindol, který aktivoval při 4-hodinovém působení AhR s účinností $80,90 \pm 7,3\%$. 5-fluoroindol působí jako metabolicky nejstabilnější z testovaných látek, protože u něj nedošlo k velkému snížení aktivace na AhR. Na aktivitu PXR měl největší vliv 7-fluoroindol, kdy největší aktivace byla při koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a to $79,63 \pm 9,21 \%$.

Na základě získaných výsledků je z daných testovaných látek nejúčinnějším ligandem AhR 7-fluoroindol., Silnou aktivaci AhR vykazuje i 4-fluoroindol a můžeme je považovat za ligandy AhR. U PXR byl neúčinnějším ligandem 7-fluoroindol. Tyto výsledky podporují naše znalosti, že substituce fluorem na indolu v různých polohách ovlivňuje aktivaci AhR a PXR a také, že tyto látky by mohly být předmětem dalšího zkoumání s ohledem na potenciální využití při terapii střevních onemocněních.

8 LITERATURA

- Barik S (2020). The uniqueness of tryptophan in biology: Properties, metabolism, interactions and localization in proteins. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Brewer, C., Chen, T.(2016). PXR variants: the impact on drug metabolism and therapeutic responses. *Acta Pharmaceutica Sinica B* : 441-449
- Buchman, C., Chai, S., Chen, T., (2018). A current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* :634-647
- Carambia, A., Schuran F.,(2021) The aryl hydrocarbon receptor in liver inflammation *Semin Immunopathol.*
- Cave, M., Clair, H., Hardesty, J., Falkner, K., Feng, W., Clark, B., Sidey, J., Shi, H., Aqel, B., McClain, C., Prough, R. (2016). Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*: 1083-1099
- Cella, M., Colonna, M. (2015). Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity. *Seminars in Immunology*: 310-314
- Correia M., Cella, M. (2022). Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity. *Seminars in Immunology*.
- Davenport, E., Sanders, J., Song, S., Amato, K., Clark, A., Knight, R. (2017). The human microbiome in evolution. *BMC Biology*.
- Gao, J., Xu, K., Liu, H., Liu, G., Bai, M., Peng, C., Li, T., Yin, Y .(2018). Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Gasaly, N., de Vos, P., Hermoso, M. (2021). Impact of Bacterial Metabolites on Gut Barrier Function and Host Immunity: A Focus on Bacterial Metabolism and Its Relevance for Intestinal Inflammation. *Frontiers in Immunology*.
- Gutiérrez-Vázquez, C., Quintana, F. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*:19-33
- Halfvarson, J., Brislawn, C., Lamendella, R., Vázquez-Baeza, Y., Walters, W., Bramer, L., D'Amato, M., Bonfiglio, F., McDonald, D., Gonzalez, A., McClure, E., Dunkleberger, M., Knight, R., Jansson, J. (2017). Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology*.
- Hoffmann, Michael F., Preissner, Sarah C., Nickel, Janette., Dunkel, Mathias., Preissner, Robert., Preissner, Saskia.(2014).The Transformer database: Biotransformation of xenobiotics. *Nucleic Acids Research* :42
- Hubbard, T., Murray, I., Perdew, G.(2015). Special section on drug metabolism and the microbiome - Minireview indole and tryptophan metabolism: Endogenous and dietary routes to ah receptor activation. *Drug Metabolism and Disposition*
- Chang T. (2009). Activation of pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) by herbal medicines. *AAPS Journal*.

- Chen, Y., Tang, Y., Guo, Ch., Wang, J., Boral, D., Nie, D. (2012) Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochemical Pharmacology*:1112-1126
- Chimerel, C., Murray, A., Oldewurtel, E., Summers, D., Keyser, U. (2013); The Effect of Bacterial Signal Indole on the Electrical Properties of Lipid Membranes. *ChemPhysChem*: 417-423
- Ibrahim, M., Taha, M., Almandil, N., Kawde, A., Nawaz, M. (2020). Synthesis, characterization and electrochemical properties of some biologically important indole-based-sulfonamide derivatives. *BMC Chemistry*.
- Illés, P., Krasulová, K., Vyhliadalová, B., Poulíková, K., Marcalíková, A., Pečinková, 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*.
- Ishigami-Yuasa, M., Kagechika, H. (2020). Chemical screening of nuclear receptor modulators. *International Journal of Molecular Sciences*: 1-19
- Jeong, Y., Mangelsdorf, D. (2009). Nuclear receptor regulation of stemness and stem cell differentiation. *Experimental and Molecular Medicine*: 525-537
- Kaushik, N., Kaushik, N., Attri, P., Kumar, N., Kim, C., Verma, A., Choi, E. (2013). Biomedical importance of indoles. *Molecules*.
- Kazem, S., Linssen, E., Gibbs, S. (2019) Skin metabolism phase I and phase II enzymes in native and reconstructed human skin: a short review. *Drug Discovery Today*
- Kola, J., Docsa, T., Uray, K. (2023). Mechanosensing in the Physiology and Pathology of the Gastrointestinal Tract. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Kou, Z., Dai, W. (2021). Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. *Biochemical Pharmacology*.
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open*.
- Loakes, D., Brown, D., (1994). 5-Nitroindole as an universal base analogue. Oxford University
- Luecke-Johansson, S., Luecke-Johansson, S., Rundqvist, H., Ho, J., Johnson, R., Gradin, K., Poellinger, L. (2017), A Molecular Mechanism To Switch the Aryl Hydrocarbon Receptor from a Transcription Factor to an E3 Ubiquitin Ligase *Molecular and Cellular Biology*. Department of Cell and Molecular.
- Lv, Y., Luo, Y., Ren, H., Li, Ch., Xiang, Z., Luan, Z. (2022). The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism. *Frontiers in Endocrinology*.
- Mani, S., Dou, W., Redinbo, M., (2013). PXR antagonists and implication in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews*.
- Melhem, N., Taleb, S. (2021) Tryptophan: From diet to cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*
- Mohandas, S., Vairappan, B. (2017). Role of pregnane X-receptor in regulating bacterial translocation in chronic liver diseases. *World Journal of Hepatology*.
- Molenda, H., Kilts, C., Allen, R., Tetel, M. (2003). Nuclear Receptor Coactivator Function in Reproductive Physiology and Behavior. *Biology of Reproduction*:1449-1457

- Murray, I., Patterson, A., Perdew, G (2015). AH RECEPTOR LIGANDS IN CANCER: FRIEND AND FOE. *Nat Rev Cancer*.
- Neavin, D., Liu, D., Ray, B., Weinshilboum, R. (2018). The role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in immune and inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Oda, M., Hatano, Y., Sato, T., (2022). Intestinal epithelial organoids: regeneration and maintenance of the intestinal epithelium. *Current Opinion in Genetics and Development*.
- Pavek P. (2016). Pregnane X receptor (PXR)-mediated gene repression and cross-talk of PXR with other nuclear receptors via coactivator interactions. *Frontiers in Pharmacology*.
- Rigalli, J., Theile, D., Nilles, J., Weiss, J. (2021). Regulation of pax function by coactivator and corepressor proteins: Ligand binding is just the beginning. *Cells*.
- Sayaf, K., Zanutto, I., Russo, F., Gabbia, D., De Martin, S., (2022). The nuclear receptor PXR in chronic liver disease. *Cells*.
- Shinde, R., McGaha, T. (2018). The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. *Trends in Immunology*: 1005-1020
- Schulz, C., Jung, F., Küpper, J. (2021) Inhibition of phase-1 biotransformation and cytostatic effects of diphenylethylidonium on hepatoblastoma cell line HepG2 and a CYP3A4-overexpressing HepG2 cell clone. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*: 231-243
- Sweeney, B. P., Grayling, M.(2009). Smoking and anaesthesia: The pharmacological implications. *Anaesthesia*:179-186
- Štěpánková 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*.
- Tombari, R., Saunders, C., Wu, C., Dunlap, L., Tantillo, D., Olson, D. (2019). Ex Vivo Analysis of Tryptophan Metabolism Using 19F NMR. *ACS Chemical Biology*: 1866-1873
- Valentová K. (2023) Biotransformation of Natural Products and Phytochemicals: Metabolites, Their Preparation, and Properties. *International Journal of Molecular Sciences* :24
- Vyhlídalová, B., Krasulová, K., Pečínková, P., Marcalíková, A., Vrzal, R., Zemánková, L., Vančo, J., Trávníček, Z., Vondráček, J., Karasová, M., Mani, S., Dvořák, Z. (2020). Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: A detailed characterization. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Vyhlídalová, B., Bartoňková, I., Jiskrová, E., Li, H., Mani, S., Dvořák, Z. (2020). Differential activation of human pregnane X receptor PXR by isomeric mono-methylated indoles in intestinal and hepatic in vitro models. *Toxicology Letters*.
- Wang, B., Zhou, Z., Li, L. (2022). Gut Microbiota Regulation of AHR Signaling in Liver Disease. *Biomolecules*.
- Weikum, E., Liu, X., Ortlund, E. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science*: 1876-1892
- Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., Qin, S. (2021) *International Journal of Molecular Sciences*:22-23

Zhu, K., Meng, Q., Zhang, Z., Yi, T., He, Y., Zheng, J., Lei, W. (2019). Aryl hydrocarbon receptor pathway: Role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy. *Molecular Medicine Reports*.