

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2023**

**Soňa Lorenčíková**

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



**Profilovanie vybraných skupín látok voči transkripčnej aktivite**  
**AhR v novej reportérovej línii LS174T-AhR-luc**

**Bakalářská práce**

**Soňa Lorenčíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2023**

**Vedoucí práce: RNDr. Peter Illés, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Soňa LOREŇČÍKOVÁ  
Osobní číslo: R20706  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Profilovanie vybraných skupín látok voči transkripčnej aktivite AhR v novej reportérovej línii LS174T-AhR-luc.  
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
2. Osvojení si základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur.
3. Stanovení účinku vybraných látek na viabilitu buněk reportérovej linie LS174T-AhR-luc pomocí metody MTT.
4. Určení vlivu vybraných látek na transkripční aktivitu AhR prostřednictvím "reporter gene assay" metody.
5. Zpracování a vyhodnocení výsledků, sepsání bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

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

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Peter Illés, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

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

L.S.

---

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

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. dubna 2022

## **Bibliografická identifikácia:**

Meno a priezvisko autora	Soňa Lorenčíková
Názov práce	Profilovanie vybraných skupín látok voči transkripčnej aktivite AhR v novej reportérovej línii LS174T-AhR-luc
Typ práce	bakalárska
Pracovisko	Katedra buňčnej biológie a genetiky
Vedúci práce	RNDr. Peter Illés Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Kľúčové slová	aryl uhľovodíkový receptor, ligand, transkripčná aktivita, luciferázová reportérová esej, MTT test
Počet strán	70
Počet príloh	0
Jazyk	slovenský

## **Súhrn**

Aryl uhľovodíkový receptor je významný transkripčný faktor, ktorý je zapojený do širokého spektra biologických procesov, ako je napríklad metabolizmus xenobiótik. Je aktivovaný rôznymi skupinami ligandov a jeho aktivácia môže spôsobiť pozitívne ale aj negatívne účinky na organizmus. Predkladaná bakalárska práca sa zaoberá vplyvom známych ligandov aryl uhľovodíkového receptoru na jeho transkripčnú aktivitu a na životaschopnosť buniek novej reportérovej línii LS174T-AhR-luc.

Teoretická časť sa zaoberá štruktúrou a aktiváciou AhR, funkciou AhR vo fyziologických procesoch a jednotlivými skupinami exogénnych a endogénnych ligandov. Experimentálna časť sa skladá zo skúmania vplyvu vybraných látok na transkripčnú aktivitu AhR pomocou luciferázovej reportérovej eseje a následne z testovania vplyvu týchto látok na životaschopnosť buniek s použitím MTT testu.

Získané výsledky ukazujú, že látkou, ktorá najviac indukovala transkripčnú aktivitu AhR bol endogénny ligand 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ). Silnými induktormi boli takisto enviromentálne polutanty TCDD a benzo[a]pyrén, rovnako ako aj všetky testované metabolity črevnej mikrobioty. Pri všetkých látkach s výnimkou PCB126, benzo[a]pyrénu, pelargonidínu a berberínu nebol pozorovaný cytotoxický efekt.

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname	Soňa Lorenčíková
Title	Profiling of selected groups of compounds toward transcriptional activity of AhR in novel reporter line LS174T-AhR-luc
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor	RNDr. Peter Illés Ph.D.
The year of presentation	2023
Keywords	aryl hydrocarbon receptor, ligand, transcriptional activity, luciferase reporter assay, MTT test
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Slovak

**Summary**

The aryl hydrocarbon receptor is an important transcription factor involved in a wide range of biological processes, such as metabolism of xenobiotics. It is activated by various groups of ligands and its activation can have both, positive and negative effects on the organism. Presented bachelor's thesis is focused on the effects of known aryl hydrocarbon receptor ligands on its transcriptional activity and cell viability in the cells of novel reporter cell line LS174T-AhR-luc.

The theoretical part of the thesis focuses on the structure and activation of AhR, the role of AhR in physiological processes as well as different groups of exogenous and endogenous ligands. The experimental section consists of examining the effects of selected compounds on AhR transcriptional activity using a luciferase reporter assay and subsequent testing the effects of these molecules on cell viability using an MTT test.

The obtained results show that the compound with the highest ability to induce transcriptional activity of AhR was endogenous ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ). The strong inducers were also environmental pollutants TCDD and benzo[a]pyrene, as well as all tested metabolites of gut microbiota. With the exception of PCB126, benzo[a]pyrene, pelargonidin, and berberine, no cytotoxic effect was observed.

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu napísala samostatne pod vedením RNDr. Petra Illésa Ph.D. a s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci, dňa.....

Podpis.....

Predovšetkým by som rada poďakovala svojmu vedúcemu práce RNDr. Petrovi Illésovi Ph.D. za jeho ochotu, odborné rady a tpežlivosť pri práci v laboratóriu a spisovaní tejto bakalárskej práce. Ďalej by som rada poďakovala laboratóriu molekulárnej farmakológie a toxikológie za ich cenné rady. V neposlednom rade sa chcem poďakovať aj rodine a blízkym za ich podporu.



# OBSAH

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK.....	VII
ZOZNAM OBRÁZKOV.....	IX
1 ÚVOD.....	1
2 CIELE PRÁCE.....	3
3 LITERÁRNY PREHĽAD.....	4
3.1 Aryl uhľovodíkový receptor.....	4
3.1.1 Objav AhR.....	4
3.1.2 Štruktúra AhR.....	4
3.1.3 Proteínový komplex AhR a aktivácia AhR.....	5
3.1.4 Funkcie AhR.....	7
3.1.4.1 Metabolizmus xenobiotík a detoxifikácia organizmu.....	7
3.1.4.2 Zápalové procesy a modulácia imunitného systému.....	7
3.1.4.3 Vývin organizmu.....	8
3.2 Ligandy AhR.....	8
3.2.1 Exogénne ligandy.....	9
3.2.1.1 Enviromentálne polutanty.....	9
3.2.1.2 Látky prírodného pôvodu.....	11
3.2.1.3 Liečivá.....	13
3.2.2 Metabolity črevnej mikrobioty.....	14
3.2.3 Endogénne ligandy.....	15
4 MATERIÁL A METÓDY.....	18
4.1 Biologický materiál.....	18
4.2 Použité chemikálie a roztoky.....	18
4.3 Použité laboratórne pomôcky.....	19
4.4 Použité prístroje.....	19

4.5 Metódy .....	20
4.5.1 Kultivácia a pasážovanie buniek .....	20
4.5.2 Počítanie a vysievanie buniek na experiment .....	20
4.5.3 Nanášanie látok kompletnej koncentračnej rady pre test cytotoxicity (MTT) a luciferázovú esej .....	21
4.5.4 Nanášanie látok vybraných koncentrácií pre test cytotoxicity (MTT) a luciferázovú génovú esej .....	22
4.5.5 Test cytotoxicity (MTT).....	23
4.5.6 Luciferázová reportérová esej .....	23
5 VÝSLEDKY .....	25
5.1 Testovanie vplyvu vybraných skupín látok na transkripčnú aktivitu AhR .....	25
5.1.1 Testovanie vplyvu endogénnych ligandov na transkripčnú aktivitu AhR .....	25
5.1.2 Testovanie vplyvu enviromentálnych polutantov na transkripčnú aktivitu AhR....	27
5.1.3 Testovanie vplyvu látok prírodného pôvodu na transkripčnú aktivitu AhR .....	29
5.1.3 Testovanie vplyvu metabolitov črevnej mikrobioty na transkripčnú aktivitu AhR	31
5.2 Testovanie vplyvu vybraných skupín látok na životaschopnosť buniek.....	33
5.2.1 Testovanie vplyvu endogénnych ligandov na životaschopnosť buniek.....	34
5.2.2 Testovanie vplyvu enviromentálnych polutantov na životaschopnosť buniek .....	36
5.2.3 Testovanie vplyvu látok prírodného pôvodu na životaschopnosť buniek.....	38
5.2.4 Testovanie vplyvu metabolitov črevnej mikrobioty na životaschopnosť buniek....	40
6 DISKUSIA .....	42
7 ZÁVER.....	45
8 LITERATÚRA.....	47

## ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

3MI	skatol
AHH	aryl uhl'ovodiková hydroxyláza
AhR	aryl uhl'ovodikový receptor
AIP	AhR interagujúci proteín
ARNT	jadrový translokátor aryl uhl'ovodikového receptora
ATP	adenozín-5'-trifosfát
BAP	benzo[a]pyrén
BER	berberín
bHLH	basic helix-loop-helix motív
BIL	bilirubín
CoA	koenzým A
CoX-2	cyklooxygenáza 2
CXCR4	C-X-C chemokínový receptor 4
DIM	3,3'-diindolylmetán
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetylsulfoxid
DRE	dioxín rezponzívny element
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
ERK1	extracellular signal regulated kinase 1
ERK2	extracellular signal regulated kinase 2
FBS	fetálne bovinné sérum
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]karbazol
GST	glutathion-S-transferáza
HAH	halogénované aromatické uhl'ovodíky
Hsp90	heat shock protein 90 kDa
I3A	indol-3-aldehyd
I3C	indol-3-karbinol
IAA	kyselina indol-3-octová
IAC	indol-3-akrylát
IAD	indol-3-acetamid
IARC	Internacional Agency for Research on Cancer

IBD	idiopatický zápal čriev (Inflammatory Bowel Disease)
ICZ	indolo[3,2-b]karbazol
IET	indol-3-etanol
ILA	kyselina indol-3-mliečna
IPA	kyselina indol-3-propiónová
IPY	indol-3-pyruvát
KO	knockout
KYNA	kyselina kynurénová
Ltr-1	2-(indol-3-ylmetyl)-3' 3-diindolylmetán
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
MTT	metyltetrazoliová soľ
NOD	neobézne diabetické
PAH	polycyklické aromatické uhľovodíky
PAS	period/ARNT single minded
PBS	fosfátový pufor
PCB	polychlórované bifenyly
PEL	pelargonidín
POP	perzistentné organické polutanty
RES	resveratrol
Src	tyrosín-proteín kináza
TA	tryptamín
TAD	transaktivačná doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxín
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
XAP2	proteín asociovaný s vírusom hepatitídy B
XRE	xenobiotické responzívne elementy

## ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok č.1: Štruktúra AhR a jeho funkčné domény .....	5
Obrázok č. 2: Genomická signalizačná dráha AhR.....	6
Obrázok č.3: Chemická štruktúra vybraných enviromentálnych polutantov .....	11
Obrázok č. 4: Chemická štruktúra vybraných prírodných látok .....	12
Obrázok č. 5: Chemická štruktúra vybraných liečiv .....	13
Obrázok č. 6: Mikrobiálne metabolity tryptofánu.....	15
Obrázok č. 7: Chemická štruktúra vybraných endogénnych ligandov AhR .....	17
Obrázok č. 8: Vplyv pôsobenia endogénnych ligandov na transkripčnú aktivitu AhR po pôsobení 4 hodín a 24 hodín.) .....	27
Obrázok č. 9: Vplyv enviromentálnych polutantov na transkripčnú aktivitu AhR po pôsobení 4 hodín a 24 hodín. ....	29
Obrázok č. 10: Vplyv látok prírodného pôvodu na transkripčnú aktivitu AhR po pôsobení 4 hodín a 24 hodín. ....	31
Obrázok č. 11: Vplyv metabolitov črevnej mikrobioty na transkripčnú aktivitu AhR po pôsobení 4 hodín a 24 hodín. ....	33
Obrázok č. 12: Vplyv pôsobenia endogénnych ligandov na životaschopnosť buniek LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín.....	35
Obrázok č. 13: Vplyv pôsobenia enviromentálnych polutantov na životaschopnosť buniek LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín. ....	37
Obrázok č. 14: Vplyv pôsobenia látok prírodného pôvodu na životaschopnosť buniek LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín.....	39
Obrázok č. 15: Vplyv pôsobenia metabolitov črevnej mikrobioty na životaschopnosť buniek LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín. ....	41

# 1 ÚVOD

Aryl uhl'ovodíkový receptor je dôležitý, ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý sa v neaktívnej forme nachádza v cytozole bunky. Po naviazaní ligandu je translokovaný do jadra a preto je zaraďovaný medzi jadrové receptory. V jadre sa viaže so svojim heterodimerickým väzobným partnerom – jadrovým translokátorom aryl uhl'ovodíkového receptoru. Takto vzniknutý transkripčne aktívny komplex sa podieľa na regulácii expisie cieľových génov. AhR je exprimovaný takmer vo všetkých tkanivách, v najväčšom množstve sa nachádza v bunkách pľúc, placenty, čriev, pečene a kože. V organizme hrá dôležitú úlohu v mnohých biologických procesoch, ako je metabolizmus xenobiotík, modulácia imunitného systému či procesy spojené s ontogenezou organizmu.

Medzi známe ligandy AhR patria okrem endogénnych aktivátorov, prirodzene sa vyskytujúcich v ľudskom organizme, aj rôzne heterogénne skupiny látok, ako sú enviromentálne polutanty, liečivá, prírodné látky, či metabolity črevnej mikrobioty. Medzi enviromentálne polutanty sa zaraďujú toxické látky, ktoré sú okrem životného prostredia, hrozbou aj pre ľudské zdravie. Medzi najznámejšie patria napríklad benzo[a]pyrén alebo dioxíny. Naopak existuje viacero liečiv, ktoré sú preukázanými ligandmi AhR a zároveň sa používajú pri liečbe bežných ochorení, ako je napríklad antimykotikum ketokonazol. Zo skupiny ligandov patriacich medzi látky prírodného pôvodu, a ktoré sa bežne nachádzajú v zelenine či ovocí, má mnoho z nich priaznivé účinky na organizmus. Ako príklad môže slúžiť kurkumín s jeho antioxidačnými účinkami. Metabolity črevnej mikrobioty vznikajú v intestinálnom trakte z tryptofánu pôsobením črevných baktérií. Práve niektoré z týchto látok, ako je napríklad indol a niektoré jeho deriváty, boli popísané ako ligandy AhR. Medzi známe endogénne ligandy AhR sa zaraďuje napríklad FICZ alebo bilirubín. V súčasnej dobe sú mnohé zo spomínaných látok predmetom intenzívneho vedeckého výskumu, zaoberajúceho sa ich potenciálnym terapeutickým využitím, prostredníctvom ovplyvňovania transkripčnej aktivity AhR.

Jednou z metód, pomocou ktorej je možné stanoviť transkripčnú aktivitu AhR, je vhodne navrhnutý reportérový systém. Tento *in vitro* experimentálny systém pracuje s modelmi odvodenými od vybraných bunkových línií, ktoré sú stabilne transfekované reportérovým plazmidom. Stabilná reportérová línia tak nesie reportérový gén, ktorým je veľmi často gén pre luciferázu, a ktorý je pod transkripčnou kontrolou AhR responzívneho elementu. Po pôsobení látok, ktoré sú aktivátormi AhR, vzniká produkt expisie reportérového génu, v tomto prípade enzým luciferáza. Po pridaní substrátu pre luciferázu je možné na základe kvantifikácie

vznikajúcej luminiscencie stanoviť transkripčnú aktivitu AhR. Takýmto reportérovým systémom je aj nová stabilne transfekovaná bunková línia LS174T-AhR-luc, ktorá bola predmetom štúdií v predkladanej bakalárskej práci.

## **2 CIELE PRÁCE**

1. Vypracovanie literárnej rešerše na tému bakalárskej práce.
2. Osvojenie si základných techník práce v laboratóriu tkanivových kultúr.
3. Určenie vplyvu vybraných skupín látok na transkripčnú aktivitu AhR pomocou novej, stabilne transfekovanej reportérovej bunkovej línie LS174T-AhR-luc.
4. Stanovenie účinkov vybraných skupín látok na životaschopnosť buniek reportérovej bunkovej línie LS174T-AhR-luc.
5. Spracovanie a vyhodnotenie výsledkov, spísanie bakalárskej práce.



## 3 LITERÁRNY PREHLAD

### 3.1 Aryl uhľovodíkový receptor

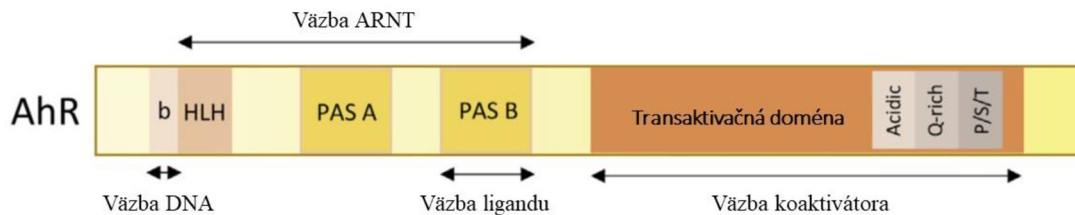
#### 3.1.1 Objav AhR

V roku 1949 došlo k neúmyselnému vypusteniu halogénovaných aromatických uhľovodíkov (HAH) v chemickom závode Monsanto v Západnej Virgínii. Následok tejto chemickej havárie spôsobil výskyt chlorakné, ochorenia krvi, ochorenia obličiek a vznik nádorov u ľudí žijúcich v okolí továrne. Neskôr sa ukázalo, že tieto problémy súvisia s látkou 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxinu (TCDD), ktorá unikla spolu s HAH. (Zack a Suskind, 1980). Prvý, kto syntetizoval TCDD v laboratórnych podmienkach cielene, bol Wilhelm Sanderman (Sandermann a kol., 1957). V snahe objasniť mechanizmy účinku TCDD, bol v roku 1976 objavený aryl uhľovodíkový receptor (AhR). Pri výskume s použitím myších bunkových línií bol skúmaný enzým AHH (aryl uhľovodíková hydroxyláza), produkt génu CYP1A1. Tento enzým bol indukovaný pôsobením látok 3-metylcholanthrén a benzo[a]pyrén. V bunkách skúmaných myších línií spôsobila indukciu rovnakého enzýmu aj látka TCDD, čo naznačovalo, že pozorované myšie bunky musia obsahovať gén, ktorého produkty sú zodpovedné za indukciu AHH. Týmto génom bol práve gén pre AhR (Poland a kol., 1976). Neskôr bola v roku 1993 popísaná ľudská DNA pre aryl uhľovodíkový receptor, ktorá bola najviac zastúpená v placente, srdci a pľúcach. (Dolwick a kol., 1993).

#### 3.1.2 Štruktúra AhR

AhR patrí do superrodiny bHLH-PAS (basic helix-loop-helix – period/ARNT single minded) proteínov. Proteíny zaraďujúce sa do tejto skupiny sa podieľajú na významných fyziologických a vývojových procesoch v organizme, ako napríklad neurogenéza, cirkadiálne rytmy a odpoveď tela na hypoxiu (Crews, 1998). AhR sa zaraďuje medzi jadrové receptory, ktoré sa podieľajú na regulácii expsie špecifických génov. V neaktívnej forme sa nachádza sa v cytozole bunky a v tejto podobe sa teda jedná o cytozolický proteín. Jeho primárnu štruktúru tvoria tri domény: N-terminálna bHLH doména, PAS doména a C-terminálna transaktivačná doména (TAD). Doména bHLH umožňuje naviazanie DNA a dimerizáciu s aryl uhľovodíkovým nukleárnym translokátorom (ARNT). Taktiež umožňuje aj interakciu s chaperónmi. PAS doména je zložená z dvoch subdomén PAS A a PAS B. Je zodpovedná za dimerizáciu s ARNT, podobne ako bHLH doména. PAS B doména okrem toho umožňuje aj

väzbu ligandu. C-terminálna doména obsahuje tri subdomény. Prvá subdoména je bohatá na kyslé aminokyseliny, ako je glutamát a aspartát, druhá subdoména obsahuje prevažne glutamín a tretia subdoména je bohatá na aminokyseliny serín, threonín a prolín (Obr. č. 1). Prostredníctvom C-terminálnej domény interaguje AhR s koaktivátormi a korepresormi (Jain a kol., 1994; Whitelaw a kol., 1995).



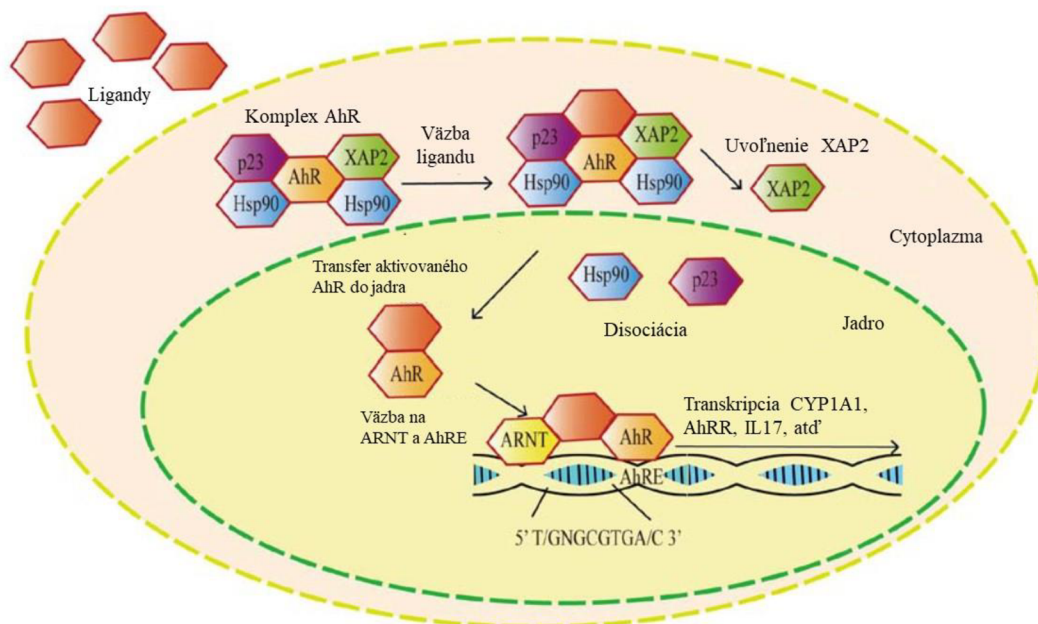
Obrázok č.1: Štruktúra AhR a jeho funkčné domény (upravené podľa Larigot a kol., 2018).

### 3.1.3 Proteínový komplex AhR a aktivácia AhR

V neaktívnom stave je AhR súčasťou proteínového komplexu, ktorý pozostáva z diméru tvoreného dvomi molekulami „heat shock” proteínu s veľkosťou 90 kDa (Hsp90), kochaperónu p23, tyrozín proteín kinázy (SRC), AhR interagujúceho proteínu (AIP) tiež známeho aj ako proteín asociovaný s vírusom hepatitídy B (XAP2) (Dull a kol., 2002; Nukaya a kol., 2010). Tento chaperónový komplex stabilizuje AhR v cytozole a taktiež ho udržiava v takej konformácii, ktorá má vysokú afinitu k jeho ligandom. V rámci komplexu AhR má Hsp90 hlavnú funkciu v rozpoznávaní a naviazaní sa na novo nasyntetizované a čiastočne zložené polypeptidy. Účelom je zabrániť nesprávnemu zloženiu a agregácii týchto polypeptidov. SRC je protoonkogén, ktorý sa uplatňuje v iniciačnom štádiu aktivácie AhR hneď po väzbe ligandu na AhR (Roskoski, 2004). Kochaperón p23 hrá dôležitú úlohu v procese stabilizácii konformácie Hsp90 a zároveň ochraňuje AhR pre degradáciou sprostredkovanou ubiquitináciou (Biebl, 2021). AIP sa zúčastňuje na tvorbe a stabilizácii AhR proteínu, inhibíciou interakcie AhR komplexu s importínom- $\beta$ , čo následne vedie k zvýšeniu cytozolovej lokalizácie AhR. AIP zároveň vykazuje aktivitu pozitívneho modulátoru transkripčnej aktivity AhR (Bell a Poland, 2000).

Prostredníctvom AhR môžu byť aktivované rôzne signalizačné dráhy. Rozlišujeme dva základné typy dráh, genomickú a negenomickú. Pri genomickej signalizačnej dráhe najprv dochádza k väzbe ligandu na PAS B doménu aryl uhľovodíkového receptora. Následne sa

vytvorí ligand-receptorový komplex, dochádza k disociácii proteínov a kochaperónov a k translokácii ligand-receptorového komplexu do jadra. V jadre sa AhR naviaže na ARNT, dôjde k vzniku aktívneho komplexu heterodiméru s ligandom. Tento komplex sa potom viaže na špecifické DNA sekvencie, ktoré sa nachádzajú v promotórových oblastiach cieľových génov nazývané xenobiotické responzívne elementy (XRE) alebo dioxínové responzívne elementy (DRE). Komplex AhR-ARNT potom indukuje transkripciu cieľových génov ako napríklad CYP1A1, aryl uhľovodíkový receptorový represor (AhRR) a interleukín 1 (IL-1) (Obr. č. 2). Po ukončení transkripčnej aktivity AhR a následnom exporte z jadra, je AhR degradovaný v proteazóme. Tomuto kroku predchádza kovalentné naviazanie ubiquitínu, ktoré umožňuje jeho degradáciu (Davarinos a Pollenz, 1999).



Obrázok č. 2: Genomická signalizačná dráha AhR (upravené podľa Zhu a kol., 2019).

Negenomická signalizačná dráha nevyžaduje naviazanie ligandom aktivovaného receptorového komplexu na responzívne elementy v promotórovej oblasti génu. Príkladom tejto signalizačnej dráhy môže byť regulácia koncentrácie vnútrobunkového vápnika. K vysokému nárastu koncentrácie vnútrobunkového vápnika môže dôjsť po vystavení bunky pôsobeniu TCDD. Ďalším príkladom môže byť aktivácia SRC, kedy prostredníctvom pôsobenia TCDD dochádza k jej uvoľneniu z komplexu AhR. (Tomkiewicz a kol., 2013). Okrem aktivácie SRC bola pozorovaná aj aktivácia MAP kináz ERK1 a ERK2 (extracellular signal regulated kinase 1, 2), čo môže mať za následok patofyziologické prejavy ako je

napríklad zápal (Matsumura, 2008). Ďalším príkladom negenomickej dráhy je degradácia ubiquitínovaných proteínov v proteazóme. Táto proteolytická degradácia sa vyskytuje po exporte z jadra prostredníctvom proteazómovej dráhy 26S (Pollenz a Barbour, 2000).

### **3.1.4 Funkcie AhR**

V spojitosti s účinkom TCDD a iných toxických látok, bola za hlavnú funkciu AhR dlhý čas považovaná jeho účasť na metabolizme xenobiotík a zmiernení ich toxických vplyvov. S odstupom času sa však zistilo, že AhR môžu okrem xenobiotík aktivovať aj látky prírodného pôvodu a rôzne syntetické ligandy a AhR sa tak uplatňuje ako dôležitý faktor pri imunitných procesoch, ontogenéze, bunkovej adhezii, angiogenéze a iných ďalších úlohách v organizme.

#### **3.1.4.1 Metabolizmus xenobiotík a detoxifikácia organizmu**

AhR je ako jediný z proteínov z PAS rodiny schopný naviazať prirodzene sa vyskytujúce xenobiotiká. Plní dôležitú úlohu pri regulácii metabolizmu xenobiotík a detoxifikácii enviromentálnych polutantov, a to indukciou expície génov zo skupiny cytochrómov P450. Cytochrómy P450 patria medzi dôležité biotransformačné enzýmy, ktoré katalyzujú hlavne oxidáciu xenobiotík. Indukcia génov pre cytochrómy P450 zohráva rovnako dôležitú úlohu aj v metabolizme liečiv. Tieto procesy sú realizované prostredníctvom enzýmov I. fázy biotransformácie ako sú CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1, ktoré vo svojich promótoroch obsahujú XRE. Tieto enzýmy katalyzujú oxidačné, redukčné alebo hydrolytické reakcie. Ďalej nasleduje II. fáza biotransformácie, kde hrajú dominantnú úlohu enzýmy glutation-S-transferáza (GST) a UDP-glukuronosyltransferáza (UGT), sú zodpovedné za konjugáciu s endogénnymi látkami za vzniku hydrofilných metabolitov. Nasledovne sa tieto metabolity eliminujú z organizmu pomocou transportérov III. fázy.

Medzi najznámejšie ligandy AhR patria toxické enviromentálne polutanty a chemické kontaminanty potravín, ako sú napríklad polycyklické aromatické uhľovodíky (PAH), dioxíny alebo polychlorované bifenyly (PCB). PAH sú známe tvorbou reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS) v rôznych bunkách a tkanivách. Taktiež indukujú oxidatívne poškodenie DNA, lipidov a ďalších bunkových makromolekúl. (Grishanova a Perepechaeva, 2022).

#### **3.1.4.2 Zápalové procesy a modulácia imunitného systému**

AhR sa vyskytuje vo väčšine typov buniek imunitného systému. Je to dôležitý faktor, ktorý umožňuje imunitným bunkám adaptovať sa okolitým podmienkam. Zmeny v aktivite AhR môžu byť spájané s rakovinou alebo s autoimunitnými ochoreniami. Najčastejšie však

zvýšená aktivita AhR poukazuje na súvislosť so zápalovými ochoreniami. Zároveň je AhR kľúčovým enviromentálnym senzorom a mechanickým regulátorom imunity epiteliálnych bariér. AhR sa v súvislosti s imunitou často označuje aj ako dvojsečný meč, pretože sa spája s procesmi, ktoré môžu mať na ľudský organizmus prospešné, ale rovnako aj negatívne dopady.

Po vystavení gastrointestinálneho traktu a kože dioxínom, ktoré sú silnými aktivátormi AhR, vykazovali tieto orgány zápalové reakcie. Tento zápal bol iniciovaný zvýšenou hodnotou vnútrobunkového  $Ca^{2+}$ , aktiváciou fosfolipázy A2 a cyklooxygenázy 2 (Cox-2), následkom čoho došlo k tvorbe zápalových prostaglandínov, katalyzovanej fosfolipázou A2 a Cox-2. Cox-2 bola zároveň identifikovaná ako cieľ AhR (Matsumura, 2008). V zdravej koži prispieva AhR k diferenciacii keratinocytov, pigmentácii a správne fungovaniu kožnej bariéry. To je pravdepodobne spôsobené prechodnou aktiváciou AhR prostredníctvom ligandov, ktoré sa rýchlo metabolizujú, napríklad 6-formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ). Naopak, prítomnosť perzistentného TCDD vedie často k trvalej aktivácii AhR a k vzniku zápalových ochorení a karcinogéze. Avšak v chronických zápalových kožných ochoreniach ako je napríklad psoriáza a atopický ekzém, bolo dokázané, že aktiváciou AhR môže dôjsť k imunosupresii (Kim a kol., 2014). Preto bol napríklad uhoľný decht, obsahujúci ligandy, ktoré aktivujú AhR, po dlhú dobu používaný na liečbu atopickej dermatitídy (Van den Bogaard, 2013).

### 3.1.4.3 Vývin organizmu

AhR zohráva dôležitú úlohu vo vývine a formovaní rôznych tkanív, ako sú srdce, pečeň, obličky a reprodukčné orgány (Harrill a kol., 2013). Taktiež plní významnú funkciu v tkanivovo špecifickom embryonálnom vývine a diferenciacii kmeňových buniek (Gasiewicz, 2014). Na štúdium tejto úlohy AhR v organizme boli použité knockout (KO) myšie línie, ktoré neexprimovali proteínový receptor a následne ani cieľové gény AhR. V sledovaných modelových organizmoch bolo objavené veľké množstvo abnormalít. KO myši vykazovali srdcovú hypertrofiu s fibrózou srdcového svalu. Na koži boli pozorované lokalizované epidermálne hyperplázie a taktiež zvýšená expresia cytokínov, keratínov a integrínov. U starších myší (11 až 12 mesiacov) sa objavili nádory na pečeni a pľúcach (Gonzales a Fernandez-Salguero, 1998). Tieto zistenia naznačujú, že práve absencia AhR je kritický faktor vzniku týchto abnormalít.

## 3.2 Ligandy AhR

AhR ligandy sú látky, ktoré sú schopné viazať sa na AhR a následne vyvolať bunkovú odpoveď. Po naviazaní na receptor sa môžu prejaviť agonistickými alebo antagonistickými

účinkami na transkripčnú aktivitu AhR, a tým pozitívne alebo negatívne regulovať expresiu génov, ktoré sú pod kontrolou AhR. Rôzne ligandy môžu indukovať transkripčný profil pri tom istom type buniek odlišne. Naopak, ten istý ligand môže mať iný transkripčný profil v rôznych typoch buniek (Abel a Haarmann-Stemmann, 2010). Medzi najznámejšie a najskôr objavené exogénne AhR ligandy patria syntetické škodlivé látky, označované aj ako enviromentálne polutanty. Ďalšou skupinou exogénnych ligandov sú prírodné látky, z ktorých mnohé majú prospešné účinky na ľudský organizmus. Najčastejšie sa nachádzajú v rastlinách a môžeme ich prijímať v potrave. Medzi ligandy AhR taktiež patrí mnoho liečiv vyznačujúcich sa rôznymi terapeutickými účinkami. K ligandom AhR môžeme rovnako zaradiť aj látky vznikajúce metabolickou aktivitou črevnej mikrobioty. Samostatnú skupinu tvoria látky, ktoré sú produkované bunkami ľudského tela a pôsobia ako endogénne ligandy AhR.

### **3.2.1 Exogénne ligandy**

#### **3.2.1.1 Enviromentálne polutanty**

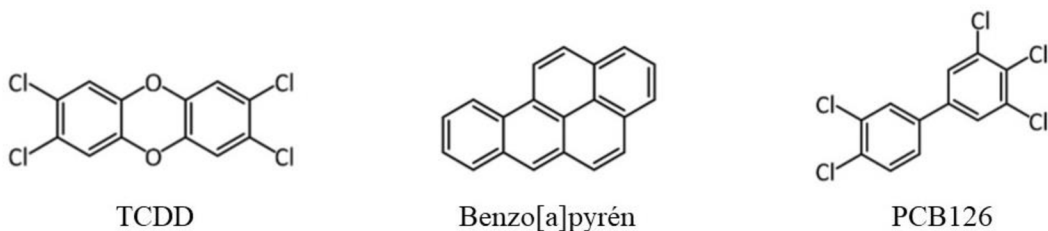
Do tejto skupiny patria syntetické látky, ktoré znečisťujú životné prostredie a majú škodlivý vplyv na zdravie. Polycyklické aromatické uhľovodíky (PAH), halogénované aromatické uhľovodíky (HAH), polychlórované bifenyly (PCB), dioxíny a im príbuzné zlúčeniny boli popísané ako známe exogénne ligandy AhR (Obr. č. 3).

V toxicite polycyklických aromatických uhľovodíkov hrá dôležitú úlohu aktivácia AhR. Aryl uhľovodíkový receptor je hlavný transkripčný faktor kontrolujúci expresiu génov pre enzýmy zo skupiny cytochrómov P450, ktoré sa podieľajú na metabolizme PAH. Polycyklické aromatické uhľovodíky sa zaraďujú do skupiny organických polutantov. Sú obsiahnuté vo vzduchu, vode, pôde a taktiež aj v spracovanom jedle. Majú mutagénne a karcinogénne účinky. (Boström a kol., 2002). Momentálne sú podľa International Agency for Research on Cancer zaraďované do troch skupín. Skupina 1 – karcinogénne pre ľudí, kam patrí benzo[a]pyrén, skupina 2A – pravdepodobne karcinogénne, sem sa zaraďuje dibenz[a,h]anthracén. Skupina 2B – možno karcinogénne, do tejto skupiny patria benzo[b]fluoranthén, benzo[j]fluoranthén, benzo[k]fluoranthén, chrysén a indeno[1,2,3-cd]pyrén. Do skupiny 3 patria látky, ktoré nie sú identifikované ako karcinogénne pre ľudí a z PAH sem patrí acenaphtén, anthracén, benzo[e]pyrén, benzo[ghi]perylén, fluoranthén, fluorén, phenanthrén a pyrén. (IARC, 2010). Polycyklické aromatické uhľovodíky musia byť metabolicky aktivované na to, aby získali mutagénne vlastnosti. Po aktivácii metabolickými cestami vznikajú genotoxické metabolity, ktoré sa priamo naviažu na DNA. Tým vytvoria DNA addukty a taktiež môžu zvýšiť produkciu

voľných kyslíkových radikálov vedúcich k oxidatívne mu poškodeniu DNA (Baird a kol., 2005).

Dioxínové látky, patriace medzi perzistentné organické polutanty (POP), sú neúmyselné vedľajšie produkty priemyselných procesov. Ľudia však môžu byť vystavení dioxínom hlavne prostredníctvom potravín ako je mäso, vajcia alebo mliečne výrobky, pretože sa tieto látky akumulujú v tuku, kde môžu dosahovať vysokých koncentrácií (IARC, 2016). Vznikajú aj pri spaľovaní fosílnych palív a odpadu. Taktiež vznikajú aj prirodzene pri sopečných erupciách alebo lesných požiaroch. Najznámejším ligandom AhR a zároveň najtoxickjším dioxínom je TCDD. Tvori sa ako vedľajší produkt pri výrobe herbicídu kyseliny 2,4,5-trichlorfenoxyoctovej (Linhart, 2022). TCDD sa ľahko akumuluje v živočíšnych tkanivách vďaka jeho rozpustnosti v lipidoch, jeho chemickej stabilite a tiež rezistencii voči biodegradácii (Larsen, 2006; Chen a kol., 2021). TCDD sa spája s mnohými negatívnymi účinkami na organizmus. Intoxikácia TCDD spôsobuje reprodukčné problémy, ochorenie chlorakné, gastrointestinálne symptómy (Gesau a kol., 2001). Chlorakné je kožné ochorenie, na ktoré sú najviac náchylné oblasti v okolí očí, chrbtu, hrudníku a genitálií, kde vznikajú kožné lézie. Pri menšej intoxikácii vznikajú primárne lézie, ktoré sú tvorené komedónmi, čo sú upchaté mazové žľazy. Pri ťažších intoxikáciách vznikajú cysty, vďaka ktorým dostáva pokožka sivú farbu. Ďalej sa tvoria zapálené lézie a abscesy. Po expozícii môže chlorakné pretrvávajúť aj niekoľko rokov (Tindall, 1985).

Medzi POP sú zaradované aj PCB, ktoré boli po prvýkrát syntetizované v roku 1881. Neskôr bolo preukázané, že spôsobujú kontamináciu životného prostredia. Hlavná cesta vystavenia sa pôsobeniu PCB je konzumáciou kontaminovaných potravín alebo kontaminovanej vody. Medzi hlavné účinky intoxikácie patria zmeny nervového a imunitného systému, výskyt chlorakné, hepatotoxicita, taktiež sa prejavujú aj negatívne dopady na oči. PCB sú zaradované aj medzi endokrinné disruptory a môžu ovplyvňovať napríklad transport hormónov štítnej žľazy k cieľovým orgánom. Taktiež spôsobujú poruchy vývinu a reprodukcie. Podľa IARC patria medzi preukázané ľudské karcinogény kategórie 1. Pôsobia na aktiváciu AhR, čoho následkom je deregulácia bunkového cyklu a inhibícia apoptózy (Linhart, 2022).



Obrázok č.3: Chemická štruktúra vybraných enviromentálnych polutantov (upravené podľa Erdemli, 2020).

### 3.2.1.2 Látky prírodného pôvodu

Pre bežnú populáciu je jedným z najrozšírenejších spôsobov expozície ligandom AhR konzumácia potravín s ich obsahom. Niektoré prírodné látky, bežne sa vyskytujúce v potravinách, dokážu aktivovať AhR (Obr. č. 4). Prítomnosť týchto ligandov bola zistená napríklad v rôznych druhoch zeleniny, ovocia a bylín. Do tejto skupiny látok patria hlavne flavonoidy, alkaloidy a indoly (Grishanova a Perepechaeva, 2022).

Flavonoidy sa nachádzajú primárne v ovocí a zelenine. Sú to malé planárne molekuly so schopnosťou aktivácie alebo antagonizmu AhR. Ich antagonistická funkcia je spojená s rozdielnou schopnosťou interakcie s PAS B doménou AhR. Konkrétne sú týmito antagonistickými látkami resveratrol a quercetín (Ciolino a kol., 1999; Zhang a kol., 2003; Beedanagari a kol., 2009). Pozitívny vplyv flavonoidov bol popísaný v súvislosti s prevenciou niektorých typov rakoviny. Na základe výsledkov niekoľkých štúdií sa zistilo, že denný príjem flavonoidov v potrave má významný preventívny a antiproliferačný vplyv voči rakovine (Neuhouser a kol., 2004; Amawi a kol., 2017; Abotaleb a kol., 2018). Známy ligand AhR diosmín je prirodzene sa vyskytujúci flavonoid, ktorý sa nachádza hlavne v citrusových plodoch. Vyznačuje sa protizápalovými, antioxidantnými, hepatoprotektívnymi, neuroprotektívnymi a protinádorovými účinkami (Carballo-Villalobos a kol., 2016; Naso a kol., 2016; Berkoz, 2019; Singh a kol., 2019).

Indoly, ako je napríklad indol-3-karbinol (I3C), je schopný organizmus získať zo zeleniny z čeľadi kapustovité, kam patrí napríklad brokolica či kapusta (Larigot a kol., 2018). Na modeloch neobéznych diabetických myší (NOD), ktoré sú používané ako modelové organizmy na štúdium diabetes 1. typu bolo zistené, že I3C výrazne indukuje transkripčnú aktivitu AhR v čreve (Kahalehili a kol., 2021). Po konzumácii sa I3C pôsobením kyslého prostredia v žalúdku premení na vedľajšie produkty, ktorými sú vysoko afinitné ligandy

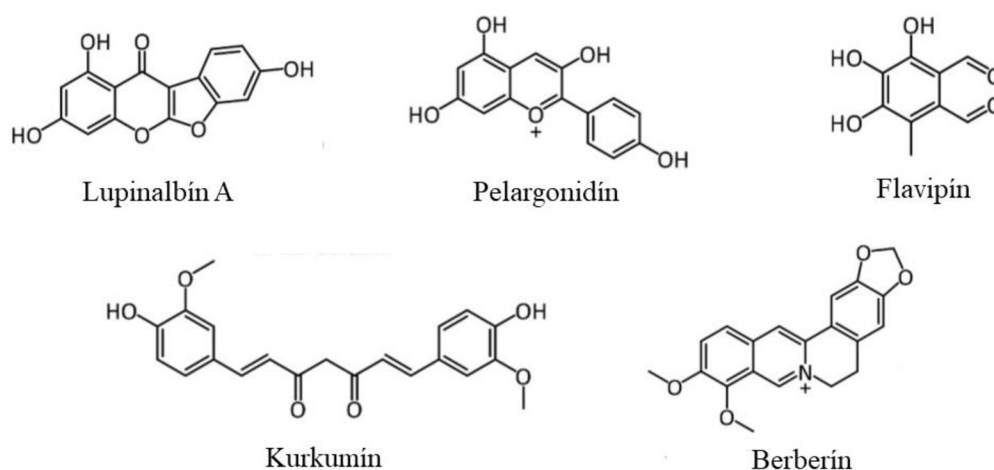


3,3'-diindolylmetán (DIM), 2-(indol-3-ylmetyl)-3'3'-diindolylmetán (Ltr-1) a ICZ (indolo[3,2-b]karbazol) (Sarkar a Li, 2004).

Z alkaloidov je dôležitým ligandom AhR berberín. Je to isochinolinová alkaloidová zložka koreňov a stoniek v rastlinách z rodu *Berberis* a *Coptis*, ako napríklad *B. croatica*, *B. vulgaris* alebo *C. chinensis* (Kosalec a kol., 2009). Rastliny s obsahom berberínu boli po dlhú dobu používané k liečbe rôznych ochorení, od hepatitídy, hnačky, úplavice až po gastroenteritídu (Zhou and Mineshita, 2000; Li a kol., 2008; Lee a kol., 2010; Qin a kol., 2010). Bolo dokázané, že *in vitro* je berberín schopný diferenciacie Treg buniek (regulačné T lymfocyty) prostredníctvom aktivácie AhR a zvýšenia expresie CYP1A1 génu (Dinesh a Rasool, 2019).

Kurkumín, prírodný ligand AhR, je látka obsiahnutá v kurkume pravej (*Curcuma longa*) z čeľade d'umbierovité (*Zingiberaceae*). Má protizápalové, antioxidačné, antikoagulačné a neuroprotektívne účinky (Koeberle a Werz, 2014; Keihanian a kol., 2018; Jakubczyk a kol., 2020).

Existuje veľa ďalších prirodzene sa vyskytujúcich látok, u ktorých bolo preukázané, že sú agonistami AhR. Jedná sa napríklad o antokyaníny ako je pelargonidín, ďalej ginsenosidy, flavipín, lupinalbín A a methysticín (Li a kol., 2011; Hu a kol., 2013; Ateba a kol., 2014; Biagioli a kol., 2021).



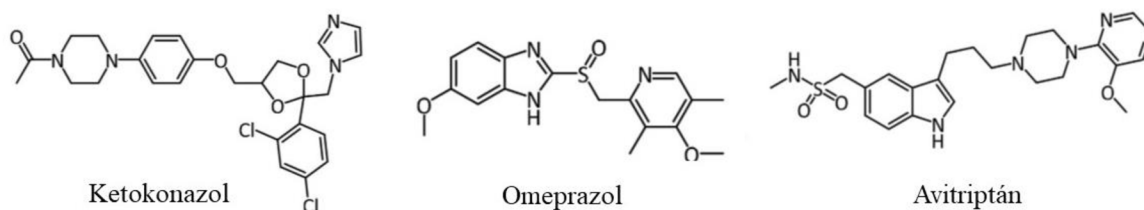
Obrázok č. 4: Chemická štruktúra vybraných prírodných látok (upravené podľa Lin a kol., 2022).

### 3.2.1.3 Liečivá

V poslednom období sa čoraz viac vedcov zameriava na využitie terapeutických účinkov AhR. Okrem prirodzene sa vyskytujúcich ligandov sa začali hľadať a produkovať aj nové syntetické ligandy (Obr. č. 5). Liečivo avitriptan, používané na liečbu migrény, je dokázaný aktivátor ľudského AhR, čo bolo pozorované pomocou stabilne transfekovanej reportérovej bunkovej línie AZ-AhR. Na bunkách tejto línie boli skúmané látky zo skupiny triptánov. Zistilo sa, že spomedzi všetkých testovaných látok aktivovali AhR v závislosti od koncentrácie iba avitriptan, donitriptan a naratriptan. Ostatné triptány boli neaktívne. Zo získaných výsledkov bolo zrejmé, že avitriptan pôsobil ako slabý agonista a slabo afinitný ligand AhR, ktorý taktiež indukoval expresiu CYP1A1 v črevných a pečenej bunkových líniách (Vyhlídalová a kol., 2020).

Na bunkových líniách rakoviny prsníka MDA-MB-231 bol testovaný AhR ligand omeprazol, ktorý sa používa na liečbu krátkodobých príznakov refluxu a pracuje na princípe inhibície protónovej pumpy. Na základe výsledkov získaných z *in vitro* experimentov sa zistilo, že omeprazol znížil inváziu buniek do okolitého prostredia. V knockout AhR modeloch bola naopak pozorovaná zvýšená bunková invázia, čo potvrdzuje, že tento mechanizmus je AhR-dependentný (Jin a kol., 2014).

Azolové antimykotikum ketokonazol bolo skúmané pre jeho schopnosť aktivovať AhR. Jeho hlavnou funkciou je inhibícia niektorých enzýmov, ako napríklad lanosterol 14- $\alpha$ -demetylázy, ktorá premieňa lanosterol na ergosterol. To má za následok akumuláciu 14- $\alpha$ -metylsterolov a inhibíciu rastu húb. Ketokonazol je taktiež schopný inhibovať účinok testosterónu a preto sa používa aj ako podporný medikament pri liečbe rakoviny prostaty (Pont a kol., 1984). Na ľudskej bunkovej líni AZ-AhR boli testované dva enantioméry ketokonazolu, ktoré sú zastúpené v tomto liečive. Zistilo sa, že ketokonazol aktivuje AhR a následne indukuje expresiu génu CYP1A1, ako na úrovni mRNA, tak aj na úrovni proteínu (Novotná a kol., 2014).

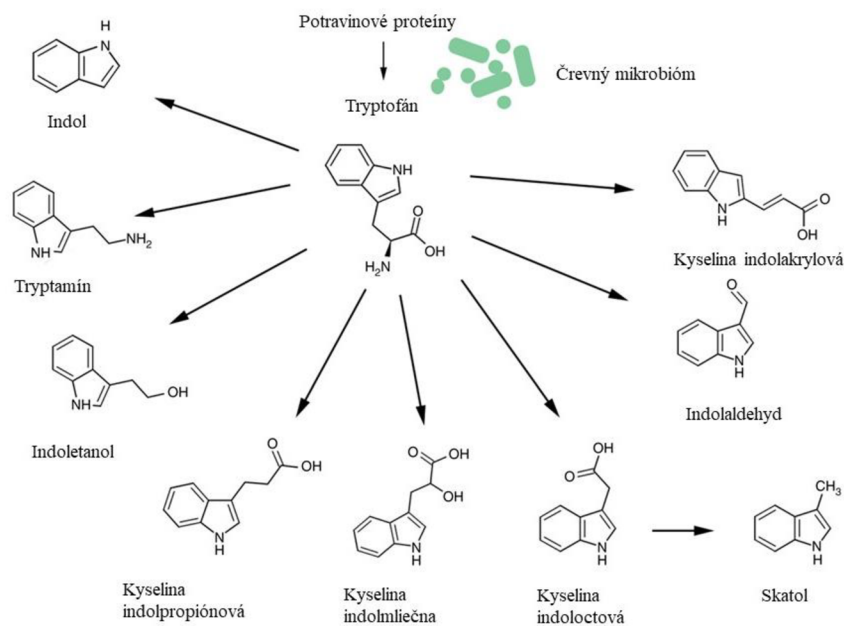


Obrázok č. 5: Chemická štruktúra vybraných liečiv (upravené podľa Lin a kol., 2022).

### 3.2.2 Metabolity črevnej mikrobioty

Najintenzívnejšie osídlenou oblasťou ľudského tela mikroorganizmami je črevo, v ktorom sa nachádza približne 70 % všetkých mikrobov. Črevná mikrobiota má dôležitý vplyv na rôzne fyziologické funkcie organizmu ako je napríklad metabolická homeostáza, dozrievanie imunitného systému alebo mozgová aktivita (Zhang a Davies, 2016; Zmora a kol., 2019).

Esenciálna aminokyselina tryptofán (Trp), ktorú si ľudské telo nedokáže samo syntetizovať, sa do organizmu prijíma v potrave. Primárne sa podieľa na syntéze proteínov, ale je taktiež substrátom pre tvorbu rozličných Trp metabolitov (Fan a kol., 2015). Jeho nedostatok spôsobuje zníženie koncentrácie týchto metabolitov v organizme, čo môže mať za následok narušenie črevnej rovnováhy. Nerovnováha tráviaceho traktu môže následne viesť k zápalovým ochoreniam čriev, ako je napríklad idiopatický zápal čriev (IBD) (Chen a kol., 2015). Bolo zistené, že tryptofánové metabolity vznikajúce v čreve hrajú dôležitú úlohu v aktivácii AhR (Sun a kol., 2019). Trp sa môže metabolizovať tromi hlavnými dráhami, a to kynurenínovou, serotonínovou a indolovou. Pomocou indolovej dráhy, ktorá je sprostredkovaná metabolickou aktivitou črevnej mikrobioty, vznikajú rôzne deriváty indolu, ako sú kyselina indol-3-octová (IAA), tryptamín (TA), indol-3-aldehyd (I3A), kyselina indol-3-propiónová (IPA), kyselina indol-3-mliečna (ILA), skatol (3MI), kyselina indol-3-pyruvátová (IPY), indol-3-etanol (IET), indol-3-acetamid (IAD) a indol-3-akrylát (IAC) (Vyhlídalová a kol., 2020) (Obr. č. 6). Trp sú schopné metabolizovať určité baktérie nachádzajúce sa v gastrointestinálnom trakte. Konkrétne sa jedná o *Escherichia coli*, ktorá premieňa Trp na indol, *Bacteroides* spp. schopné metabolizovať Trp na IAA, *Bifidobacterium* spp. premieňajúce Trp na ILA a *Clostridium sporogenes*, ktorého metabolickou činnosťou vzniká tryptamín (Smith, 1897; Russell a kol., 2013; Williams a kol., 2014)



Obrázok č. 6: Mikrobiálne metabolity tryptofánu (upravené podľa Roager a Licht, 2018).

### 3.2.3 Endogénne ligandy

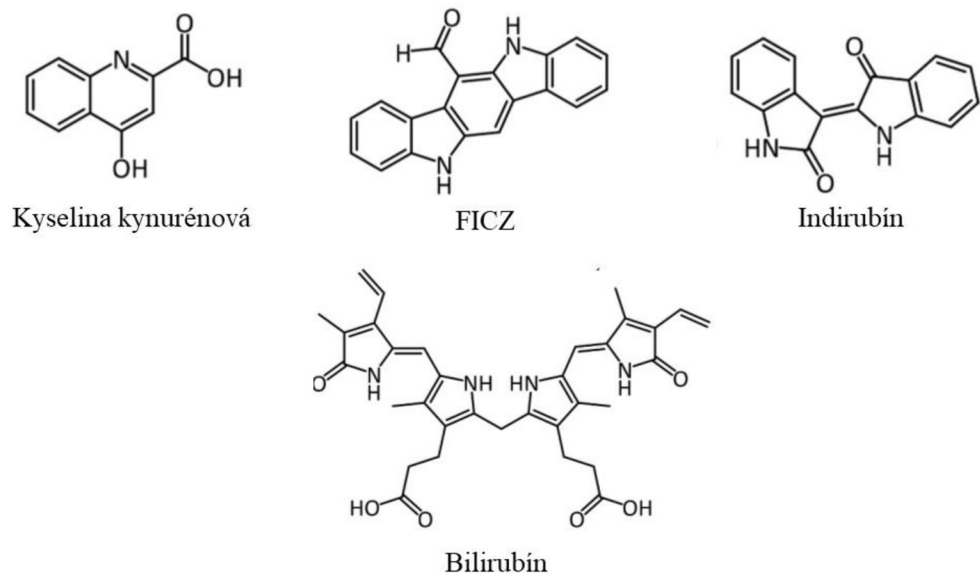
Existencia endogénnych ligandov AhR bola dokázaná experimentami vo viacerých vedeckých štúdiách, pri ktorých bolo zistené, že k aktivácii AhR signalizačnej dráhy môže dochádzať aj bez prítomnosti exogénnych ligandov. Jedným z argumentov, ktoré podporujú existenciu endogénnych aktivátorov, boli výsledky štúdie uskutočnenej na bunkovej línii c37 odvodenej z hepatómových myších buniek pomocou luciferázovej reportérovej eseje a metódy „gel mobility shift assay“. Bolo zistené, že tieto bunky, aj napriek tomu, že neboli vystavené pôsobeniu exogénnych ligandov, obsahovali transkripčne aktívny komplex AhR-ARNT. (Chang a Puga, 1998). Väčšinu známych endogénnych ligandov AhR predstavujú metabolity a fotoprodukty aminokyseliny Trp, u ktorých bola preukázaná aktivácia AhR signálnych dráh (Heath-Pagliuso a kol., 1998; Wei a kol., 1999; Heath-Pagliuso a kol., 2000) (Obr. č. 7).

Vysoko afinitný endogénny ligand FICZ vzniká z tryptofánu po jeho vystavení UV žiareniu, prípadne pôsobeniu viditeľného svetla, a jedná sa tak o fotoprodukt. (Rannug a kol., 1987). V bunkovej línii HaCaT odvodenej z ľudských keratinocytov bolo pozorované, že spomedzi viacerých skúmaných endogénnych aktivátorov AhR, bol FICZ najefektívnejším induktorom génovej expresii CYP1A1. K výraznej indukcii expresie došlo už po jeho krátkodobom pôsobení (0,5 h) a bolo dokonca dokázané, že FICZ sa na AhR viaže s väčšou afinitou než TCDD (Wei a kol., 1998).

Tryptofánové metabolity indigo a indirubín patria medzi kondenzované oxindoly, ktoré sa prirodzene nachádzajú v ľudskom moči. Tieto látky boli identifikované ako potentné endogénne aktivátory AhR. Pomocou kvasinkovej reportérovej eseje bolo zistené, že indukcia transkripčnej aktivity AhR indirubínom je približne 50 krát vyššia ako po pôsobení TCDD. Iné štúdie však ukázali, že v cicavčích bunkách nedosahuje aktivita AhR po pôsobení FICZ takých hodnôt, ako v kvasinkovom systéme (Adachi a kol., 2001).

Ďalším z produktov metabolizmu Trp, ktorý bol pozorovaný ako aktivátor AhR je kynurenín (Heath-Pagliuso a kol., 2000). Neskôr sa však zistilo, že samotný kynurenín nie je schopný aktivovať AhR. Bolo dokázané, že látkou, ktorá vykazovala vysoký agonistický účinok voči AhR bol aromatický kondenzát kynurenínu, označovaný ako TEACOP270. Z toho dôvodu sa uvádza, že kynurenín je pro-ligand, ktorý sa musí premeniť, aby sa choval ako receptorový aktivátor. Na rozdiel od ostatných ligandov AhR, má kynurenín aj rozdielnu štruktúru. Je to oveľa menšia, polárnejšia a nabitá molekula (Seok a kol., 2018). Kynurenín sa zúčastňuje na procesoch regulácie imunitného systému a rôznych neurologických funkcií. Poruchy metabolizmu kynurenínu môžu viesť k vzniku rôznorodých ochorení, od hypertenzie či chronického zápalu, až po vznik malígnych nádorov (Stone a Darlington, 2002; Oxenkrug, 2010; Jasiewicz a kol., 2016).

V štúdií v roku 1998 boli skúmané produkty degradácie hému, biliverdín a bilirubín, v súvislosti s ich možnou úlohou endogénnych ligandov AhR. Fyziologické koncentrácie týchto látok boli aplikované na ľudské, myšie, morčacie a potkanie bunkové línie. Obe látky aktivovali AhR signalizačnú dráhu a jeho väzbu na DRE. Okrem toho kompetitívne vytesňovali rádioaktívne značený [3H]TCDD z jeho špecifickej väzby na cytozolický AhR, čím potvrdili, že sú ligandmi AhR (Phelan a kol., 1998).



Obrázok č. 7: Chemická štruktúra vybraných endogénnych ligandov AhR (upravené podľa Lin a kol., 2022).

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Biologický materiál

- Stabilne transfekovaná reportérová bunková línia LS174T-AhR-luc odvodená z buniek ľudského kolorektálneho adenokarcinómu LS174T (kat. č. ECACC 87021202)

### 4.2 Použité chemikálie a roztoky

- Kultivačné médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM) (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom 50 ml fetálneho bovinného séra (FBS), 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540) a 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)
- Kultivačné médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM) (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom 50 ml fetálneho bovinného séra (FBS), 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540), 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Sigma-Aldrich, kat. č. M7145), 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  hygromycínu (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-29067) a 5 ml antibiotika penicilín/streptomycín (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333)
- Fosfátový pufo (PSB) (BioConcept, kat. č. 3-05F29-I)
- Trypsín-EDTA 0,25 % (Sigma Aldrich, kat. č. T4049)
- Dimetylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, kat. č. 20022-CT0)
- Metyltetrazoliová soľ (MTT) (Sigma Aldrich, kat. č. M2128)
- Roztok trypanovej modrej (Sigma Aldrich, kat. č. T6146)
- Oktylfenol etoxylát (Triton X-100) (Serva, kat. č. 37240)
- Reportérový lyzačný pufo (Promega, kat. č. E3971)
- Luciferázový substrát: 5 mg D-luciferín (Sigma-Aldrich, kat. č. L9504), 6,83 mg koenzým A (CoA) (Sigma-Aldrich, kat. č. C4282), 9,6 mg adenzín-5'-trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich, kat. č. A6419), 168 mg dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, kat. č. 43819), 1,32 ml trisacetát-EDTA pufo 1  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (pH 7,8) (Sigma-Aldrich, kat. č. T8280), 1,23 mg kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA, Sigma-Aldrich, kat. č. E6511), 30,3 mg heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich, kat. č. M5921), doplnené destilovanou  $\text{H}_2\text{O}$  do 30 ml
- TCDD (Ultra Scientific, kat.č. RPE-029-10MG)
- PCB126 (Ehrenstorfer, kat. č. EHERC20012600)

- Benzo[a]pyrén (Sigma Aldrich, kat. č. B1760)
- FICZ (Sigma Aldrich, kat. č. SML1489)
- Kyselina kynurénová (Sigma Aldrich, kat. č. K3375)
- Bilirubín (Sigma Aldrich, kat. č. B4126-1G)
- Resveratrol (Sigma Aldrich, kat. č. R5010)
- Pelargonidín (Extrasynthese, kat. č. 0912S)
- Berberín (Sigma Aldrich, kat. č. B3251)
- Indol-3-acetamid (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-255213)
- Indol-3-pyruvát (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-218597)
- Tryptamín (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-206065)

### 4.3 Použité laboratórne pomôcky

- Automatické pipety v rozsahu 0,1–2,5 µl, 0,5–10 µl, 2–20 µl, 20–200 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl (Eppendorf)
- Multikanálové pipety v rozsahu 0,5–10 µl, 5–50 µl, 10–100 µl, 30–300 µl (Eppendorf)
- Pipetor (Labnet)
- Plastové špičky s objemom 10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl (Eppendorf)
- Sterilné sérologické pipety s objemom 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (SPL)
- Mikroskúmavky s objemom 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml (BIOplastics)
- Plastové skúmavky s objemom 15 ml, 50 ml (TPP)
- Petriho misky (TPP)
- Plastové kultivačné fľaše (TPP)
- 96 jamkové kultivačné doštičky (TPP)
- 96 jamkové biele kultivačné doštičky (NUNC)
- Bürkerova komôrka (Assistent)
- Krycie sklíčka (Menzel Gläser)
- Ochranné gumené rukavice (NitriSense)
- Buničina (Tork)

### 4.4 Použité prístroje

- Inkubátor (N-Biotek)
- Vodný kúpeľ LCB11D (Daihan Lab-tech)
- Hlbokomraziaci skriňový box (Sanyo)



- Laminárny box (ESCO)
- Vortex REAX top (Heidolph)
- Svetelný mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- Spektrofotometer Infinite 200 (Tecan)
- Aspirátor FLASK TRAP FTA (Biosan)

## 4.5 Metódy

### 4.5.1 Kultivácia a pasážovanie buniek

Bunková línia LS174T-AhR-luc bola kultivovaná v inkubátore pri teplote 37 °C, v atmosfére 5 % CO<sub>2</sub>, pri 95% vlhkosti v sterilných podmienkach. Táto adherentná bunková línia bola kultivovaná v plastovej kultivačnej fľaši v DMEM médiu. Bunky boli pasážované dvakrát do týždňa. Pasážovaniu predchádzalo zahriatie DMEM média a PBS pufru vo vodnom kúpeli na 37 °C. Kultivačná fľaša s bunkami bola premiestnená do laminárneho boxu do sterilných podmienok a následne bolo médium odsaté aspirátorom. Do fľaše bolo opatrne napipetovaných 13 ml PBS pufru s účelom premytia buniek. Potom bolo PBS odsaté a k bunkám bolo napipetované 2 ml trypsínu. Trypsinizácia prebiehala v inkubátore po dobu 3 minút. Následne bola kultivačná fľaša prenesená naspäť do laminárneho boxu a pôsobenie trypsínu bolo ukončené pridaním 18 ml DMEM média. Bunky boli pomocou pipetora rozuspendované a prenesené do plastovej skúmavky. Späť do kultivačnej fľaše bolo napipetovaných 2,5 až 3 ml bunkovej suspenzie v závislosti od množstva buniek. K suspenzii bolo doplnených 35 ml DMEM média. Kultivačná fľaša bola vrátená naspäť do inkubátoru.

### 4.5.2 Počítanie a vysievanie buniek na experiment

Najprv bolo prevedené pasážovanie buniek s rovnakým postupom ako v predchádzajúcom pododdieli (4.5.1 Kultivácia a pasážovanie buniek). Z bunkovej suspenzie, ktorá bola získaná pasážovaním, bolo odobratých 10 µl do 0,5 ml mikroskúmavky. K suspenzii bolo pridaných 90 µl roztoku trypanovej modrej. Zmes bola premiešaná a následne nanosená do Bürkerovej komôrky. Pomocou Bürkerovej komôrky boli vo svetelnom mikroskopom spočítané bunky v desiatich štvorcoch. Z týchto 10 hodnôt bola vypočítaná priemerná hodnota, na základe ktorej bola bunková suspenzia nariadená v DMEM médiu tak, aby jedna jamka v kultivačnej doštičke obsahovala 40 000 buniek v 200 µl kultivačného média. Nariadená bunková suspenzia bola multikanálovou pipetou napipetovaná do 96 jamkových kultivačných doštičiek, ktoré boli následne prenesené do inkubátoru do nasledujúceho dňa.

### 4.5.3 Nanášanie látok kompletnej koncentračnej rady pre test cytotoxicity (MTT) a luciferázový esej

Na ďalší deň od vysiatia buniek do 96 jamkových doštičiek boli testované látky nariadené v DMSO v potrebných koncentráciách do mikroskúmaviek. Látky boli potom 1000 krát nariadené v depletovanom médiu. Pre test cytotoxicity bola pripravená kontrola pre normalizáciu výsledkov 2% roztok Tritonu a negatívna kontrola 0,1% DMSO. Pre luciferázový esej pozitívna kontrola predstavovala  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD a negatívna kontrola 0,1% DMSO. Tieto látky boli pripravené nariadením na požadovanú koncentráciu v depletovanom médiu. Kontroly a testované látky boli na bunky v doštičke nanášané v triplikátoch. Pre luciferázový esej boli použité dva rôzne časy pôsobenia látok na bunky a to 4 hodiny a 24 hodín. Pre MTT test bol časový interval aplikácie látok 24 hodín. Počas pôsobenia boli doštičky premiestnené do inkubátoru.

Zo skupiny endogénnych ligandov bol FICZ pripravený v koncentráciách:  $1 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Kyselina kynurénová bola nariadená na koncentrácie:  $1 \text{ p mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Bilirubín bol pripravený v koncentráciách:  $1 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

V skupine prírodných látok bola koncentračná rada pre berberín a pelargonidín:  $1 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pre resveratrol boli pripravené koncentrácie:  $1 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Zo skupiny črevných metabolitov, konkrétne látky indol-3-pyruvát, indol-3-acetamid a tryptamín, boli pripravené v koncentráciách:  $1 \text{ p mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Koncentračná rada pre skupinu enviromentálnych polutantov TCDD, PCB126 a benzo[a]pyrén bola:  $1 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

#### 4.5.4 Nanášanie látok vybraných koncentrácií pre test cytotoxicity (MTT) a luciferázovú génovú esej

Na základe predbežných výsledkov získaných po pôsobení látok v kompletných koncentračných radách, boli pre ďalšie experimenty vybrané intervaly koncentrácií testovaných látok, pri ktorých dochádzalo k zmenám v transkripčnej aktivite AhR. Pri príprave vybraných koncentrácií jednotlivých látok sa postupovalo rovnako ako v prípade kompletnej koncentračnej rady s rozdielom zmenených koncentrácií pre dané látky.

Zo skupiny endogénnych ligandov bol FICZ v časovom móde 4 hodiny aplikovaný v koncentráciách: 0,69 pmol·l<sup>-1</sup>, 2,09 pmol·l<sup>-1</sup>, 6,26 pmol·l<sup>-1</sup>, 18,77 pmol·l<sup>-1</sup>, 56,33 pmol·l<sup>-1</sup>, 169 pmol·l<sup>-1</sup>, 507 pmol·l<sup>-1</sup>, 1,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 4,6 nmol·l<sup>-1</sup>, 13,7 nmol·l<sup>-1</sup>, 41,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 123,3 nmol·l<sup>-1</sup>, 370 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,11 μmol·l<sup>-1</sup>, 3,33 μmol·l<sup>-1</sup>, 10 μmol·l<sup>-1</sup>. V časovom móde 24 hodín bol FICZ v koncentráciách: 507 pmol·l<sup>-1</sup>, 1,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 4,6 nmol·l<sup>-1</sup>, 13,7 nmol·l<sup>-1</sup>, 41,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 123,3 nmol·l<sup>-1</sup>, 370 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,11 μmol·l<sup>-1</sup>, 3,33 μmol·l<sup>-1</sup>, 10 μmol·l<sup>-1</sup> a 20 μmol·l<sup>-1</sup>. Kyselina kynurénová bola pri 4 aj 24 hodinách v koncentráciách: 45,7 nmol·l<sup>-1</sup>, 137,2 nmol·l<sup>-1</sup>, 411,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,2 μmol·l<sup>-1</sup>, 3,7 μmol·l<sup>-1</sup>, 11,1 μmol·l<sup>-1</sup>, 33,3 μmol·l<sup>-1</sup>, 100 μmol·l<sup>-1</sup>. Bilirubín bol pri 4 aj 24 hodinách v koncentráciách: 1,37 nmol·l<sup>-1</sup>, 4,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 12,3 nmol·l<sup>-1</sup>, 37,0 nmol·l<sup>-1</sup>, 111,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 333,3 nmol·l<sup>-1</sup>, 1 μmol·l<sup>-1</sup> a 2 μmol·l<sup>-1</sup>.

Z prírodných látok boli berberín a pelargonidín v koncentráciách: 15,24 nmol·l<sup>-1</sup>, 45,7 nmol·l<sup>-1</sup>, 137,2 nmol·l<sup>-1</sup>, 411,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,2 μmol·l<sup>-1</sup>, 3,7 μmol·l<sup>-1</sup>, 11,1 μmol·l<sup>-1</sup>, 33,3 μmol·l<sup>-1</sup>, 100 μmol·l<sup>-1</sup>. Resveratrol bol v koncentráciách: 507 pmol·l<sup>-1</sup>, 1,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 4,6 nmol·l<sup>-1</sup>, 13,7 nmol·l<sup>-1</sup>, 41,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 123,3 nmol·l<sup>-1</sup>, 370 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,11 μmol·l<sup>-1</sup>, 3,33 μmol·l<sup>-1</sup> a 10 μmol·l<sup>-1</sup>.

Z črevných metabolitov IPY, IAD a tryptamín v časovom móde 4 hodiny boli v koncentráciách: 15,24 nmol·l<sup>-1</sup>, 45,7 nmol·l<sup>-1</sup>, 137,2 nmol·l<sup>-1</sup>, 411,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,2 μmol·l<sup>-1</sup>, 3,7 μmol·l<sup>-1</sup>, 11,1 μmol·l<sup>-1</sup>, 33,3 μmol·l<sup>-1</sup>, 100 μmol·l<sup>-1</sup>, 200 μmol·l<sup>-1</sup>. Pri 24 hodinách: 137,2 nmol·l<sup>-1</sup>, 411,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,2 μmol·l<sup>-1</sup>, 3,7 μmol·l<sup>-1</sup>, 11,1 μmol·l<sup>-1</sup>, 33,3 μmol·l<sup>-1</sup>, 100 μmol·l<sup>-1</sup>, 200 μmol·l<sup>-1</sup>.

Zo skupiny enviromentálnych polutantov TCDD bolo v oboch časových módoch v koncentráciách: 50,0 pmol·l<sup>-1</sup>, 150,0 pmol·l<sup>-1</sup>, 460,0 pmol·l<sup>-1</sup>, 1,37 nmol·l<sup>-1</sup>, 4,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 12,3 nmol·l<sup>-1</sup>, 37,0 nmol·l<sup>-1</sup>, 111,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 333,3 nmol·l<sup>-1</sup> a 1 μmol·l<sup>-1</sup>. PCB126 a benzo[a]pyrén boli pripravené v koncentráciách: 0,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,5 nmol·l<sup>-1</sup>,

4,6 nmol·l<sup>-1</sup>, 13,7 nmol·l<sup>-1</sup>, 41,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 123,3 nmol·l<sup>-1</sup>, 370 nmol·l<sup>-1</sup>, 1,11 μmol·l<sup>-1</sup>, 3,33 μmol·l<sup>-1</sup>, 10 μmol·l<sup>-1</sup>.

#### 4.5.5 Test cytotoxicity (MTT)

MTT test je kolorimetrická esej, ktorá bola popísaná v roku 1983 T. Mosmannom. (Mosmann., 1983). Je založená na princípe redukcie žltej metyltetrazóliovej soli za vzniku fialového formazánu. Redukciu katalyzuje enzým NAD(P)H-dependentná oxidoreduktáza, ktorá sa nachádza len vo viabilných bunkách. V tomto teste sa meria intenzita sfarbenia vzniknutého formazánu, ktorá je závislá na životaschopnosti a metabolickej aktivite buniek. Používa sa teda ako indikátor viability a proliferačnej aktivity buniek, alebo ako ukazovateľ cytotoxického vplyvu látok (Berridge a Tan, 1993).

Po 24 hodinovej inkubácii buniek s testovanými látkami bol obsah doštičiek vyliaty a jamky boli premyté 100 μl PBS. Obsah bol znova vyliaty a doštičky boli osušené buničinou. MTT roztok bol pripravený nariedením MTT s koncentráciou 3 mg·ml<sup>-1</sup> v DMEM médiu, tak aby bola výsledná koncentrácia 0,3 mg·ml<sup>-1</sup>. Médium s obsahom MTT bolo napipetované na doštičku v objeme 100 μl na jednu jamku. Doštičky boli premiestnené do inkubátoru na 8-10 minút, do vzniku fialových kryštálov. Po uplynutí času bol obsah opatrne vyklepnutý a doštičky boli opäť usušené buničinou. Aby boli kryštály formazánu rozpustené, do jednotlivých jamiek bolo napipetované DMSO v objeme 100 μl. V takto pripravených vzorkách bola pomocou spektrofotometru Infinite 200 zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 570 nm. Z výsledkov bola stanovená percentuálna viabilita buniek.

#### 4.5.6 Luciferázová reportérová esej

Luciferázová reportérová esej sa používa na určenie, či je skúmaná látka aktivátorom alebo represorom expresie cieľového génu. Princípom eseje je luciferázou sprostredkovaná oxidácia D-luciferínu na oxyluciferín za uvoľnenia luminiscenčného žiarenia, ktorého intenzita je zmeraná spektrofotometricky.

Obsah doštičiek bol po 4 hodinovej a 24-hodinovej inkubácii vyliaty a doštičky boli usušené buničinou. Na premytie bolo do jamiek napipetovaných 100 μl PBS. Po premytí bol obsah znova vyliaty a doštičky boli usušené buničinou. Následne bolo do jamiek napipetovaných 20 μl lyzačného pufru. Lyzačný pufor bol pripravený nariedením deionizovanou vodou v pomere 1 : 4. Doštičky boli premiestnené do hlbokomraziaceho boxu a uchované pri teplote -80 °C po dobu minimálne 1 hodiny. Po uplynutí tohoto času boli doštičky vybraté a rozmrazené. Z jednotlivých jamiek bolo odoberaté 10 μl lyzátu, ktorý bol

prepipetovaný do bielych 96 jamkových doštičiek určených na meranie luminiscencie a následne bolo pridané 40  $\mu$ l luciferázového substrátu. Pomocou spektrofotometru Infinite 200 bola zmeraná luminiscencia v jednotlivých jamkách. Z výsledkov meraní bola stanovená výsledná luciferázová aktivita, ktorá bola vyjadrená ako FOLD indukcia luciferázovej aktivity po pôsobení skúmaných látok, v porovnaní s luciferázovou aktivitou negatívnej kontroly.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Testovanie vplyvu vybraných skupín látok na transkripčnú aktivitu

#### AhR

Bunková línia LS174T-AhR-luc bola inkubovaná spolu s testovanými látkami po dobu 4 hodín a 24 hodín. Transkripčná aktivita AhR bola stanovená prostredníctvom luciferázovej reportérovej eseje, kde bola pomocou spektrofotometru zmeraná luminiscencia. Z výsledných hodnôt bola vypočítaná FOLD indukcia luciferázovej aktivity pre jednotlivé koncentrácie skúmaných látok v porovnaní s negatívnou kontrolou (UT). Pre všetky skupiny látok bol ako negatívna kontrola použitý roztok 0,1% DMSO v DMEM a ako pozitívna kontrola slúžilo  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD v DMEM. Jednotlivé grafy na obrázkoch (Obr. č. 8, 9, 10 a 11) sú priemernou hodnotou výsledkov troch nezávislých experimentov, pôsobenie každej koncentrácie látok prebiehalo v triplikátoch.

V prvom kroku bol prevedený pilotný experiment s použitím kompletnej koncentračnej škály testovaných látok, od  $1 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$  až po  $1\text{--}200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (v závislosti od rozpustnosti jednotlivých látok). Na základe takto získaných výsledkov boli pre ďalšie experimenty vybrané iba koncentrácie, pri ktorých bolo možné pozorovať zmeny v transkripčnej aktivite AhR. Výsledky pilotného experimentu nie sú zahrnuté v tejto bakalárskej práci.

#### 5.1.1 Testovanie vplyvu endogénnych ligandov na transkripčnú aktivitu AhR

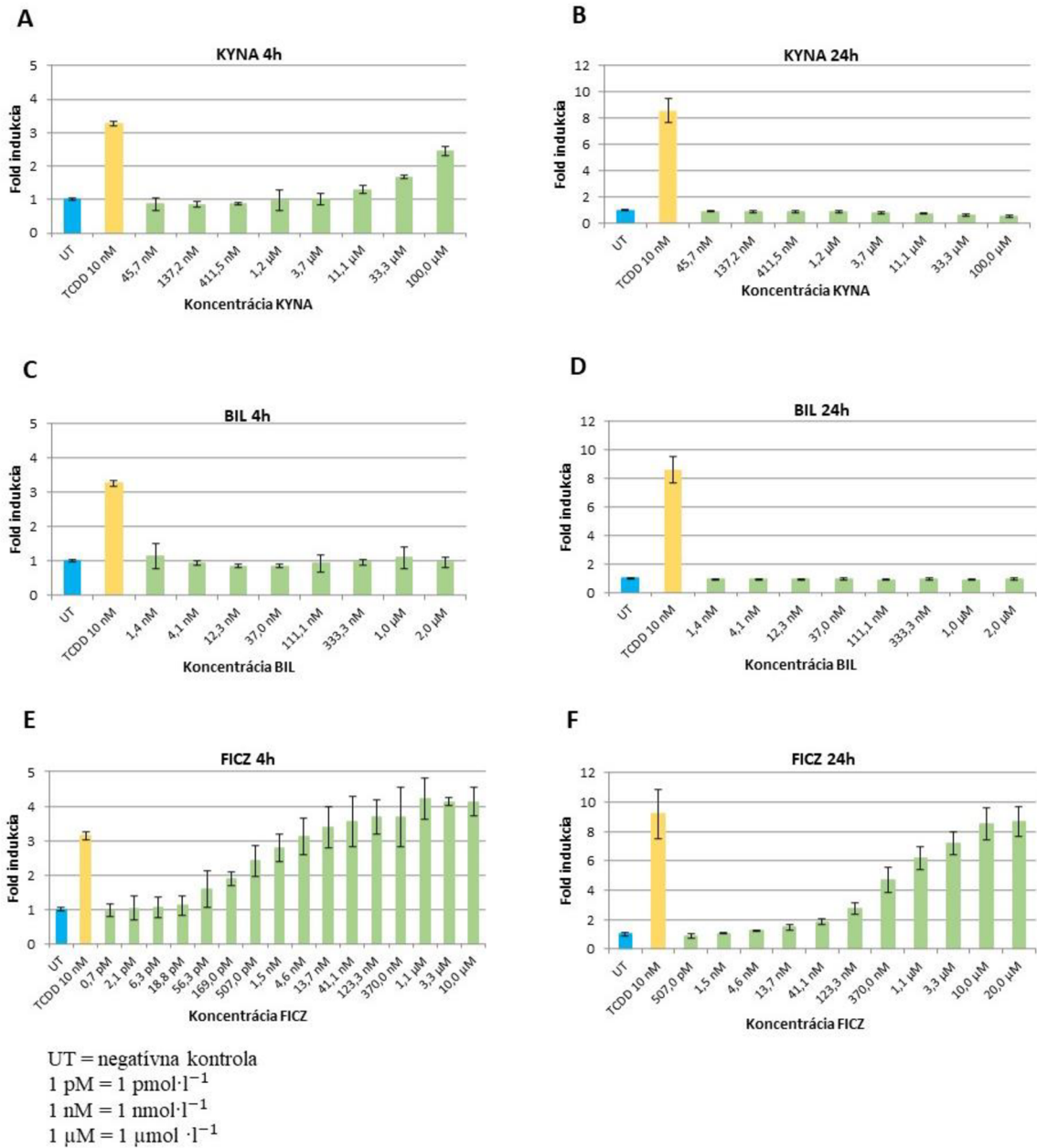
Kyselina kynurénová (KYNA) a bilirubín (BIL) boli pripravené v rovnakých koncentráciách pre časový mód 4 hodín aj 24 hodín. FICZ bol aplikovaný na bunky v rozličných koncentráciách pre časový mód 4 hodiny a pre časový mód 24 hodín.

Pri inkubácii po dobu 4 hodín, mala intenzita luciferázovej aktivity po pôsobení kyseliny kynurénovej stúpajúcu tendenciu (Obr. č. 8A). K zvýšeniu indukcie nad hodnotu 1 FOLD došlo pri koncentrácii  $11,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Najvýznamnejší nárast indukcie bol zaznamenaný pri najvyššej koncentrácii  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , kde bola indukcia až  $2,45 \pm 0,15$  FOLD, čo predstavuje 64 % z pozitívnej kontroly TCDD. Pri 24 hodinovej inkubácii nebol po pôsobení kyseliny kynurénovej zaznamenaný žiadny výrazný nárast indukcie, avšak hodnota luciferázovej aktivity po aplikácii TCDD sa oproti 4 hodinovej inkubácii zvýšila takmer 3-násobne (Obr. č. 8B). So stúpajúcou koncentráciou kyseliny kynurénovej mala indukcia klesajúcu tendenciu, v žiadnom prípade nebola vyššia ako negatívna kontrola. V tomto prípade teda kyselina kynurénova neindukovala transkripčnú aktivitu AhR.

Po pôsobení bilirubínu počas 4 hodín (Obr. č. 8C) a 24 hodín (Obr. č. 8D) nebola pozorovaná žiadna výrazná indukcia luciferázovej aktivity. Po 4 hodinovej aplikácii sa indukcia pri každej z koncentrácií pohybovala okolo hodnoty 1 FOLD, rovnako ako aj po 24 hodinovom ovplyvnení.

FICZ vykazoval pri pôsobení počas 4 hodín (Obr. č. 8E) stúpajúci, na koncentrácii závislý, nárast indukcie luciferázovej aktivity. Indukcia začala výraznejšie stúpať pri koncentrácii  $56,3 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , a to konkrétne na hodnotu  $1,59 \pm 0,52 \text{ FOLD}$ . Pri koncentrácii  $1,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bola zaznamenaná najvyššia hodnota indukcie  $4,22 \pm 0,60 \text{ FOLD}$ , čo predstavuje až 150 % z pozitívnej kontroly TCDD. Po 24 hodinovom pôsobení vykazoval účinok FICZ taktiež stúpajúcu tendenciu (Obr. č. 8F). Hodnoty začali postupne narastať od koncentrácie  $4,6 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Výraznejší nárast indukcie bol pozorovaný pri  $123,3 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  kde dosahovala indukcia hodnotu  $2,74 \pm 0,37 \text{ FOLD}$ . To predstavuje približne 21 % z pozitívnej kontroly. Maximum luciferázovej aktivity bol zaznamenaný pri najvyššej koncentrácii  $20,0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , kedy hodnota indukcie dosahovala  $8,64 \pm 1,03 \text{ FOLD}$ , čo je 94 % z hodnoty po aplikácii  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD.

## Transkripčná aktivita AhR po pôsobení endogénnych ligandov



Obrázok č. 8: Vplyv endogénnych ligandov na transkripčnú aktivitu AhR po pôsobení 4 hodín a 24 hodín.

### 5.1.2 Testovanie vplyvu enviromentálnych polutantov na transkripčnú aktivitu AhR

PCB126, benzo[a]pyrén (BAP) aj TCDD boli použité v rovnakých koncentráciách pre časový mód 4 hodín aj 24 hodín.

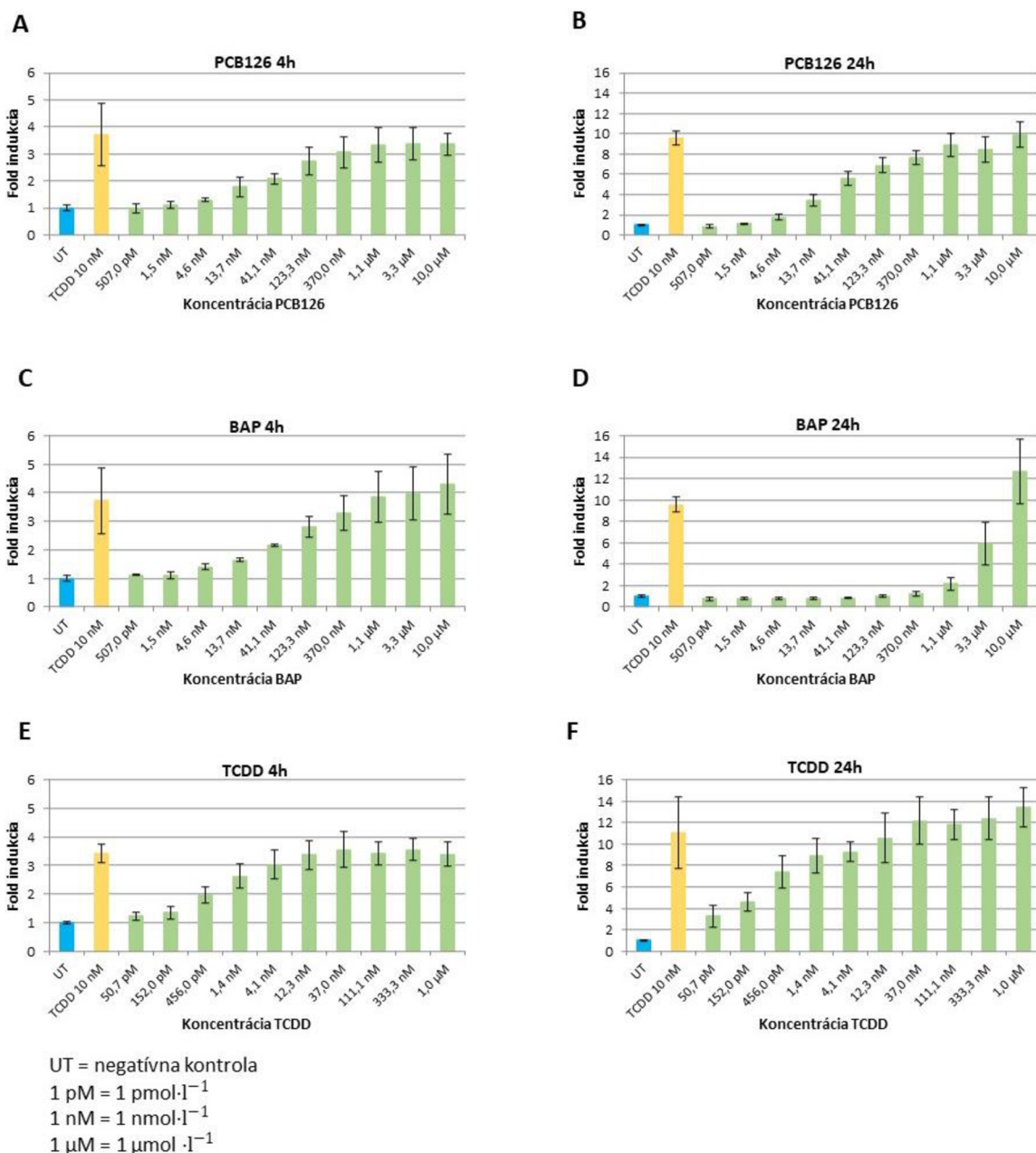


Po 4 hodinovom pôsobení PCB126 na bunky LS174T-AhR-luc sa so zvyšujúcou koncentráciou zvyšovala aj indukcia luciferázovej aktivity (Obr. č. 9A). Výraznejší nárast sa začal pri koncentrácii  $13,7 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  PCB126 s indukciou  $1,78 \pm 0,35$  FOLD. Najvyššie hodnoty indukcie boli pozorované pri najvyšších koncentráciách ( $1,11 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $3,33 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), kedy dosahovali 90 až 95 % z pozitívnej kontroly. Najvyššia indukcia  $3,38 \pm 0,58$  FOLD bola zaznamenaná pri koncentrácii  $3,33 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Po 24 hodinovom pôsobení PCB126 začala indukcia výraznejšie stúpať už pri koncentrácii  $4,6 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a jej hodnotou dosahovala  $1,75 \pm 0,31$  FOLD (Obr. č. 9B). Najvyššia indukcia  $9,94 \pm 1,26$  FOLD bola zaznamenaná pri koncentrácii  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , čo predstavovalo približne 105 % z pozitívnej kontroly TCDD.

Účinok benzo[a]pyrénu mal po 4 hodinovom pôsobení rastúcu tendenciu a závisel na zvyšujúcej sa koncentrácii (Obr. č. 9C). Mierny nárast indukcie luciferázovej aktivity bol pozorovaný už pri koncentrácii  $4,6 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  s hodnotou indukcie  $1,41 \pm 0,09$  FOLD. Najvyšší nárast indukcie  $4,30 \pm 1,07$  FOLD bol zaznamenaný pri najvyššej použitej koncentrácii  $10,0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Luciferázová aktivita pri tejto koncentrácii dosahovala až 127 % z  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD. Po 24 hodinovom pôsobení PCB126 začala indukcia výrazne narastať až pri vyšších koncentráciách, konkrétne pri koncentrácii  $1,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Obr. č. 9D). Pri najvyššej testovanej koncentrácii  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bol zaznamenaný nárast indukcie až na hodnotu  $12,65 \pm 3,05$  FOLD, čo predstavovalo 137 % z pozitívnej kontroly. Aplikácia nižších koncentrácií s výnimkou  $370,0 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , mali za následok indukcie menšie ako negatívna kontrola DMSO.

Pri TCDD po 4 hodinách pôsobenia začala indukcia mierne narastať už pri najnižšej koncentrácii  $50,7 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , kde dosahovala hodnotu  $1,23 \pm 0,15$  FOLD (Obr. č. 9E). Najvýraznejší nárast indukcie bol zaznamenaný pri koncentrácii  $37,0 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , kedy dosiahla hodnotu  $3,56 \pm 0,62$  FOLD, čo predstavovalo 105 % z pozitívnej kontroly. Rovnaká hodnota bola zaznamenaná aj pri koncentrácii  $333,3 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

## Transkripčná aktivita AhR po pôsobení enviromentálnych polutantov



Obrázok č. 9: Vplyv enviromentálnych polutantov na transkripčnú aktivitu AhR po pôsobení 4 hodín a 24 hodín.

### 5.1.3 Testovanie vplyvu látok prírodného pôvodu na transkripčnú aktivitu AhR

Berberín (BER), pelargonidín (PEL) a resveratrol (RES) boli použité v rovnakých koncentráciách pre časový mód 4 hodín aj 24 hodín.

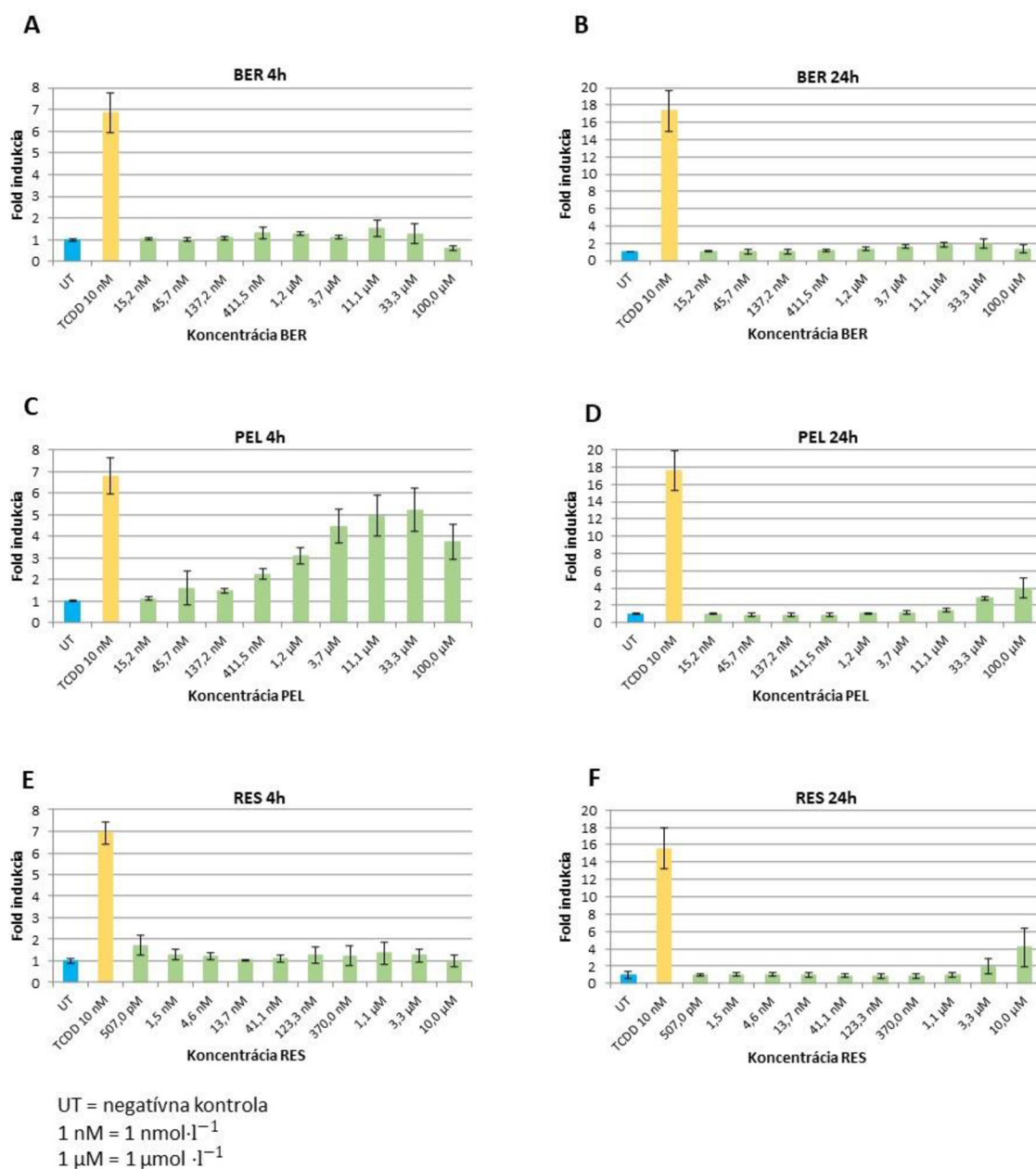
Po 4 hodinovom pôsobení berberínu bola indukcia luciferázovej aktivity nízka (Obr. č. 10A). Všetky hodnoty sa pohybovali v rozmedzí  $1,01 \pm 0,09$  až  $1,31 \pm 0,29$  FOLD

s výnimkou koncentrácie  $11,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kedy bola pozorovaná najvyššia indukcia a to  $1,52 \pm 0,37$  FOLD. To predstavuje iba približne 9 % z pozitívnej kontroly. Ďalšou výnimkou bola aj najvyššia použitá koncentrácia  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kedy indukcia dosahovala iba hodnotu  $0,61 \pm 0,10$  FOLD. V časovom móde 24 hodín dosahovala intenzita luciferázovej aktivity po pôsobení berberínu podobné hodnoty ako po jeho štvorhodinovom pôsobení, avšak indukcia pozitívnej kontroly bola takmer 3-násobne vyššia (Obr. č. 10B). Graf mal opäť iba veľmi mierne rastúcu tendenciu až po koncentráciu  $33,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kedy hodnota indukcie dosahovala  $1,91 \pm 0,55$  FOLD. Pri najvyššej testovanej koncentrácii  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , klesla indukcia na  $1,34 \pm 0,46$  FOLD, čo predstavovalo 1,8 % z pozitívnej kontroly. Naopak, luciferázová aktivita pri nižšej koncentrácii  $33,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  predstavovala 5,6 % z pozitívnej kontroly.

Po 4 hodinovom pôsobení pelargonidínu (Obr. č. 10C) mala indukcia luciferázovej aktivity od koncentrácie  $137,2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po koncentráciu  $33,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  stúpajúcu tendenciu. Pri koncentrácii  $33,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bola zaznamenaná aj najvyššia indukcia  $5,21 \pm 0,99$  FOLD, čo predstavovalo 72 % z pozitívnej kontroly TCDD. Pri najvyššej použitej koncentrácii  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bola hodnota indukcie  $3,72 \pm 0,81$  FOLD, čo tvorilo približne 49 % z pozitívnej kontroly. V časovom móde 24 hodín začal pelargonidín výraznejšie indukovať luciferázovú aktivitu až od koncentrácie  $11,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kedy jej hodnota dosahovala  $1,41 \pm 0,17$  FOLD (Obr. č. 10D). Najvyššia indukcia  $3,97 \pm 1,16$  FOLD bola pozorovaná pri najvyššej testovanej koncentrácii  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a predstavovala asi 17 % z hodnoty pozitívnej kontroly.

Pri pôsobení resveratrolu po dobu 4 hodín dosiahla najnižšia skúmaná koncentrácia  $507,0 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$  hodnotu indukcie  $1,72 \pm 0,46$  FOLD, čo predstavovalo 12,6 % z hodnoty indukovanej pomocou  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD (Obr. č. 10E). Od koncentrácie  $1,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  po  $3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  sa hodnoty indukcie pohybovali v rozmedzí  $1,05 \pm 0,02$  až  $1,36 \pm 0,51$  FOLD. Pri najvyššej koncentrácii resveratrolu  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bola zaznamenaná najmenšia hodnota indukcie, a to  $0,99 \pm 0,27$  FOLD. V časovom móde 24 hodín bol u resveratrolu pozorovaný nárast indukcie iba pri dvoch najvyšších použitých koncentráciách (Obr. č. 10F). Pri koncentrácii  $3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dosahovala indukcia luciferázovej aktivity hodnotu  $1,96 \pm 0,90$  FOLD a pri  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $4,20 \pm 2,21$  FOLD. To predstavovalo 7 %, respektíve 23 % z hodnoty pozitívnej kontroly TCDD.

## Transkripčná aktivita AhR po pôsobení prírodných látok



Obrázok č. 10: Vplyv látok prírodného pôvodu na transkripčnú aktivitu AhR po pôsobení 4 hodín a 24 hodín.

### 5.1.3 Testovanie vplyvu metabolitov črevnej mikrobioty na transkripčnú aktivitu AhR

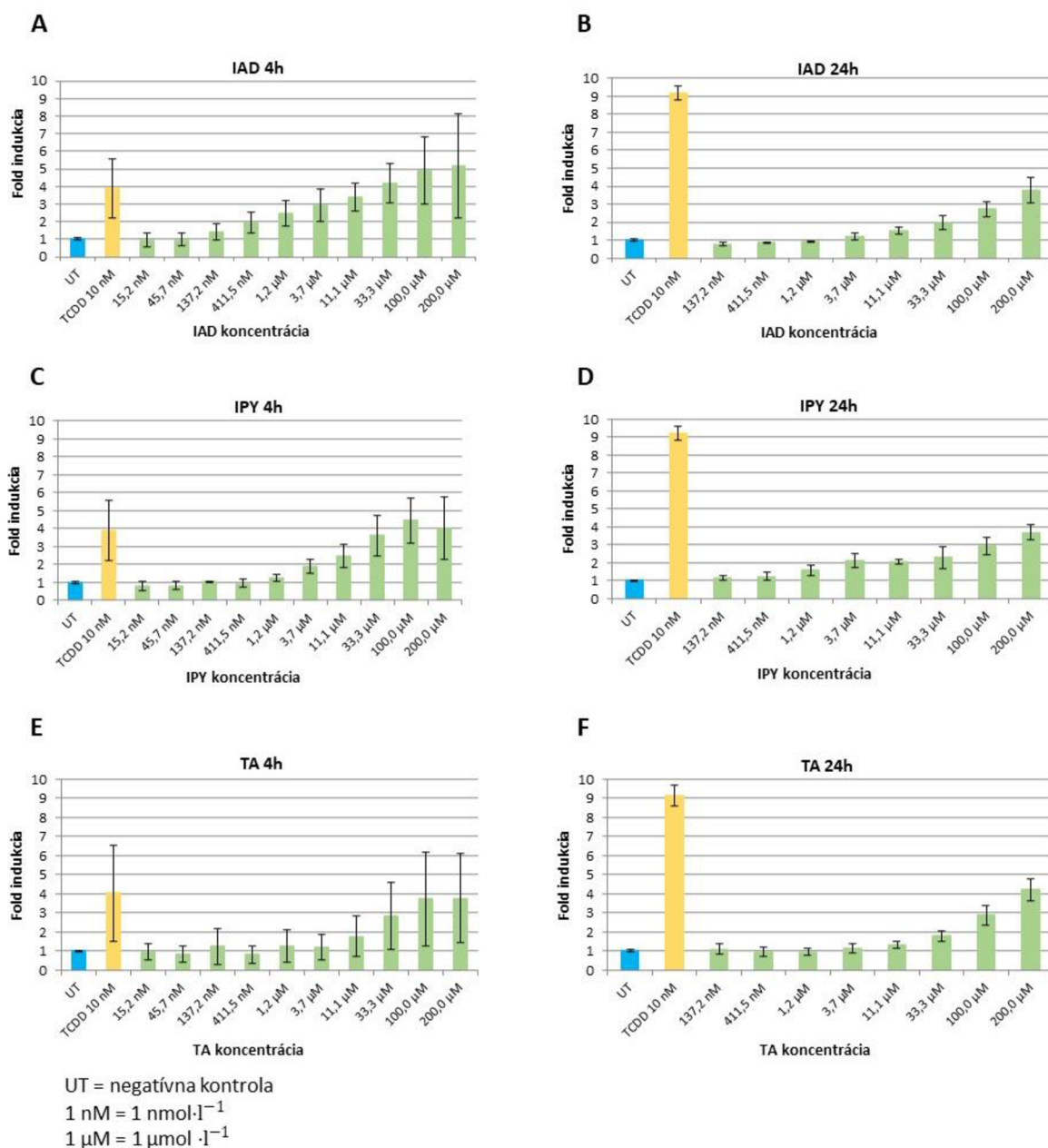
Indol-3-acetamid (IAD), indol-3-pyruvát (IPY) a tryptamín (TA) boli použité v rozdielnych koncentráciách po pôsobení 4 hodín aj 24 hodín.

Pri 4 hodinovom pôsobení IAD bola pozorovaná narastajúca indukcia luciferázovej aktivity v závislosti od koncentrácie IAD (Obr. č. 11A). Začiatok nárastu indukcie bol pozorovaný od koncentrácie  $137,2 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , kedy jej hodnota dosahovala  $1,40 \pm 0,45$  FOLD. Najväčšia indukcia  $5,16 \pm 2,96$  FOLD bola zaznamenaná pri najvyššej testovanej koncentrácii  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , a predstavovala až 152 % z pozitívnej kontroly TCDD. Po 24 hodinovom pôsobení IAD bol nárast intenzity indukcie pozorovaný až od koncentrácie  $3,7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , kedy indukcia luciferázovej aktivity dosahovala hodnotu  $1,22 \pm 0,18$  FOLD (Obr. č. 11B). Pri najvyššej skúmanej koncentrácii  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bola pozorovaná aj najintenzívnejšia indukcia  $3,80 \pm 0,70$  FOLD, čo zodpovedalo 34 % z hodnoty indukcie po aplikácii  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD.

U IPY bol po štvorhodinovom pôsobení pozorovaný nárast indukcie luciferázovej aktivity v závislosti od jeho koncentrácie (Obr. č. 11C). Prejav na zmene v indukcii bol pozorovaný v rozmedzí koncentrácií  $1,2\text{--}100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Najvyššia hodnota indukcie  $4,44 \pm 1,23$  FOLD bola zaznamenaná pri koncentrácii  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , a táto hodnota predstavovala zhruba 133 % z pozitívnej kontroly TCDD. Pri najvyššej sledovanej koncentrácii  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bol nárast indukcie iba na hodnotu  $4,01 \pm 1,74$  FOLD, čo zodpovedalo 102 % z hodnoty indukcie  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD. Aj po aplikácii IPY počas 24 hodín bol nárast indukcie pozorovaný od koncentrácie  $1,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pričom jej hodnota dosahovala  $1,59 \pm 0,30$  FOLD (Obr. č. 11D). Najvýraznejšiu indukciu  $3,69 \pm 0,41$  FOLD spôsobilo vystavenie buniek LS174T-AhR-luc účinkom najvyššej testovanej koncentrácie IPY  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Táto hodnota zodpovedala takmer 33 % z pozitívnej kontroly.

V časovom móde 4 hodín u TA bol pozorovaný nárast indukcie luciferázovej aktivity hlavne pri vyšších koncentráciách TA (Obr. č. 11E). Výraznejší nárast sa začal prejavovať od koncentrácie  $11,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , s hodnotou indukcie  $1,78 \pm 1,06$  FOLD. Najvyššie hodnoty indukcie  $3,73 \pm 2,45$  a  $3,76 \pm 2,32$  FOLD boli zaznamenané pri koncentráciách TA  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Tieto hodnoty predstavovali 85 % a 90 % z pozitívnej kontroly. V prípade použitia koncentrácií  $15,24\text{--}411,5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  neindukoval tryptamín takmer žiadnu luciferázovú aktivitu. Pri pôsobení TA po dobu 24 hodín bol výraznejší nárast indukcie sledovaný až pri koncentrácii  $33,3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , a hodnota indukcie dosahovala  $1,78 \pm 0,29$  FOLD (Obr. č. 11F). Najvyššia skúmaná koncentrácia  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  sa vyznačovala najväčšou schopnosťou indukovať luciferázovú aktivitu, ktorej hodnota dosahovala  $4,21 \pm 0,57$  FOLD, čo predstavovalo skoro 40 % z pozitívnej kontroly.

## Transkripčná aktivita AhR po pôsobení metabolitov črevnej mikrobioty



Obrázok č. 11: Vplyv metabolitov črevnej mikrobioty na transkripčnú aktivitu AhR po pôsobení 4 hodín a 24 hodín.

## 5.2 Testovanie vplyvu vybraných skupín látok na životaschopnosť buniek

Na bunkovú líniu LS174T-AhR-luc boli aplikované skupiny látok po dobu 24 hodín, s účelom zistiť ich vplyv na životaschopnosť buniek. Životaschopnosť buniek bola stanovená pomocou MTT testu. Výsledné hodnoty po pôsobení jednotlivých koncentrácií látok sú percentuálnym vyjadrením životaschopnosti negatívnej kontroly. Ako negatívna kontrola bolo

použitie 0,1% DMSO nariadené v DMEM. Jednotlivé grafy (Obr. č. 12, 13, 14 a 15) sú výsledkom troch nezávislých experimentov, v ktorých aplikácia každej koncentrácie skúmaných látok prebehla zakaždým v triplikáte.

### **5.2.1 Testovanie vplyvu endogénnych ligandov na životaschopnosť buniek**

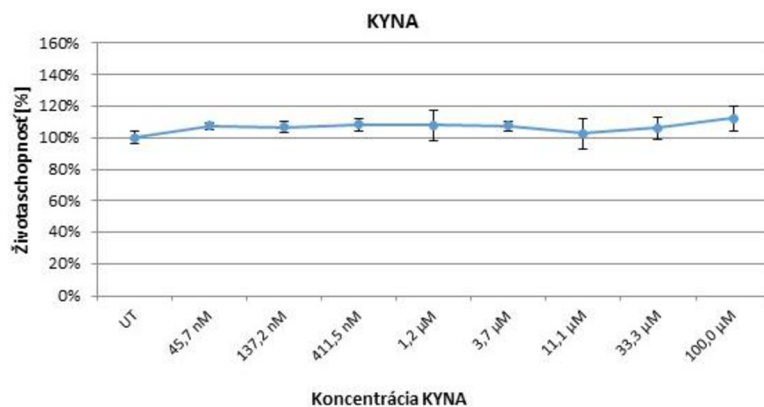
Životaschopnosť buniek po pôsobení kyseliny kynurénovej sa pohybovala v rozmedzí  $102,72 \pm 9,80 \%$  do  $112,19 \pm 7,93 \%$  (Obr. č. 12A). Viabilita neklesla ani pri jednej koncentrácii pod 100 % čo značí, že kyselina kynurénová nemala na bunky cytotoxické účinky, naopak mohla mať mierny proliferatívny účinok, keďže všetky výsledné hodnoty prevyšujú 100 %.

Pôsobenie bilirubínu na bunky malo podobný efekt ako pri kyseline kynurénovej (Obr. č. 12B). Percento viability sa pohybovalo v rozmedzí  $104,69 \pm 3,02 \%$  až  $113,59 \pm 4,21 \%$ . Bilirubín taktiež mierne indukoval proliferáciu buniek.

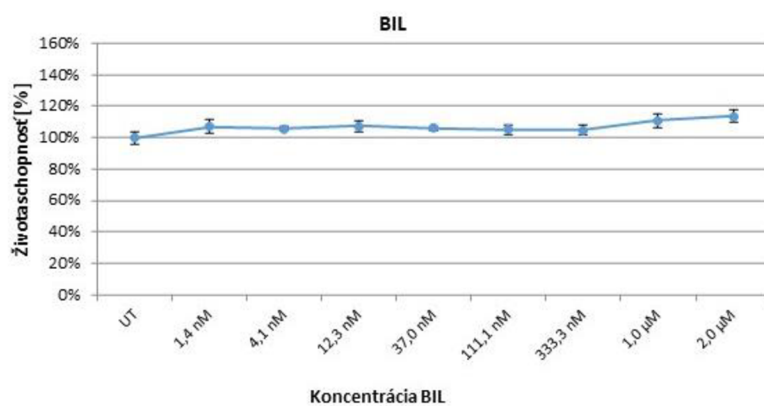
Po pôsobení FICZ bola životaschopnosť buniek v rozmedzí od  $97,79 \pm 4,47 \%$  po  $116,50 \pm 5,76 \%$  (Obr. č. 12C).  $97,79 \pm 4,47 \%$  životaschopnosť bola pozorovaná pri koncentrácii  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Naopak najvyššia životaschopnosť  $116,50 \pm 5,76 \%$  bola zaznamenaná pri koncentrácii  $41,1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Podľa výsledných hodnôt nemala žiadna z testovaných koncentrácií FICZ cytotoxický účinok, niektoré z koncentrácií však mohli mať mierne proliferatívne účinky.

## Životaschopnosť buniek po pôsobení endogénnych ligandov

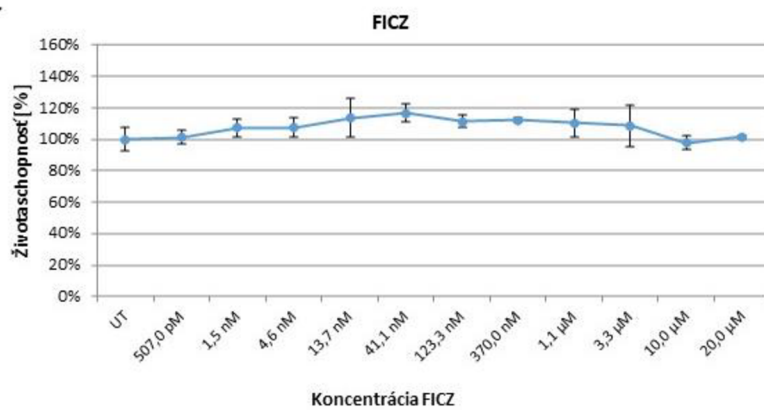
A



B



C



UT = negatívna kontrola

1 pM = 1 pmol · l<sup>-1</sup>

1 nM = 1 nmol · l<sup>-1</sup>

1 μM = 1 μmol · l<sup>-1</sup>

Obrázok č. 12: Vplyv endogénnych ligandov na životaschopnosť buniek LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín.



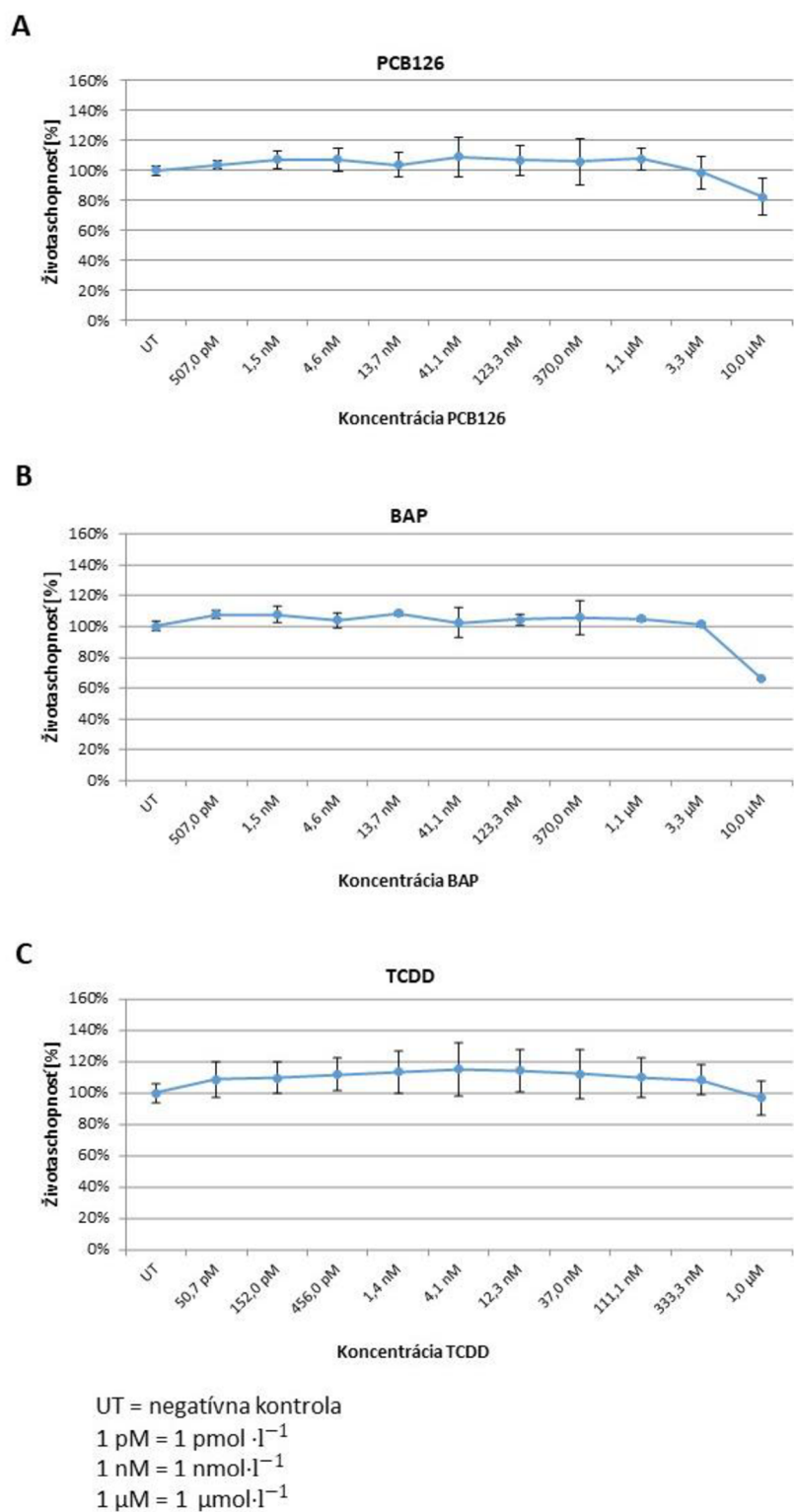
### 5.2.2 Testovanie vplyvu enviromentálnych polutantov na životaschopnosť buniek

Po pôsobení PCB126 na bunky sa ich životaschopnosť pri nižších koncentráciách ( $507,0 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $1,11 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) pohybovala v rozmedzí od  $103,79 \pm 8,32 \%$  do  $109,13 \pm 13,24 \%$  (Obr. č. 13A). Dve najvyššie použité koncentrácie spôsobili mierny pokles viability. Pri koncentrácii  $3,33 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  klesla viabilita na  $98,65 \pm 10,93 \%$ . O niečo výraznejší bol pokles pri koncentrácii  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , kde dosiahla viabilita  $82,41 \pm 12,30 \%$ .

Viabilita buniek po pôsobení benzo[a]pyrénu pri všetkých koncentráciách, s výnimkou najvyššej  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , neklesla pod  $100 \%$  a pohybovala sa v rozmedzí od  $101,43 \pm 1,40 \%$  do  $108,54 \pm 1,28 \%$  (Obr. č. 13B). Pri  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP klesla viabilita buniek na hodnotu  $66,01 \pm 0,61 \%$ , čo bolo zapríčinené čiastočným cytotoxickým vplyvom tejto látky.

U TCDD sa po jeho pôsobení na bunky pohybovala životaschopnosť v rozmedzí  $96,94 \pm 10,98 \%$  až  $114,97 \pm 17,14 \%$  (Obr. č. 13C). Najnižšia viabilita  $96,94 \pm 10,98 \%$  bola zaznamenaná pri najvyššej koncentrácii  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Najvyššie hodnoty viability  $114,97 \pm 17,14 \%$  a  $114,03 \pm 13,81 \%$  boli zaznamenané pri koncentráciách TCDD  $4,1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $12,3 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . S výnimkou najvyššej koncentrácie mal TCDD mierny proliferačný efekt na bunky.

## Životaschopnosť buniek po pôsobení enviromentálnych polutantov



Obrázok č. 13: Vplyv enviromentálnych polutantov na životaschopnosť buniek LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín.

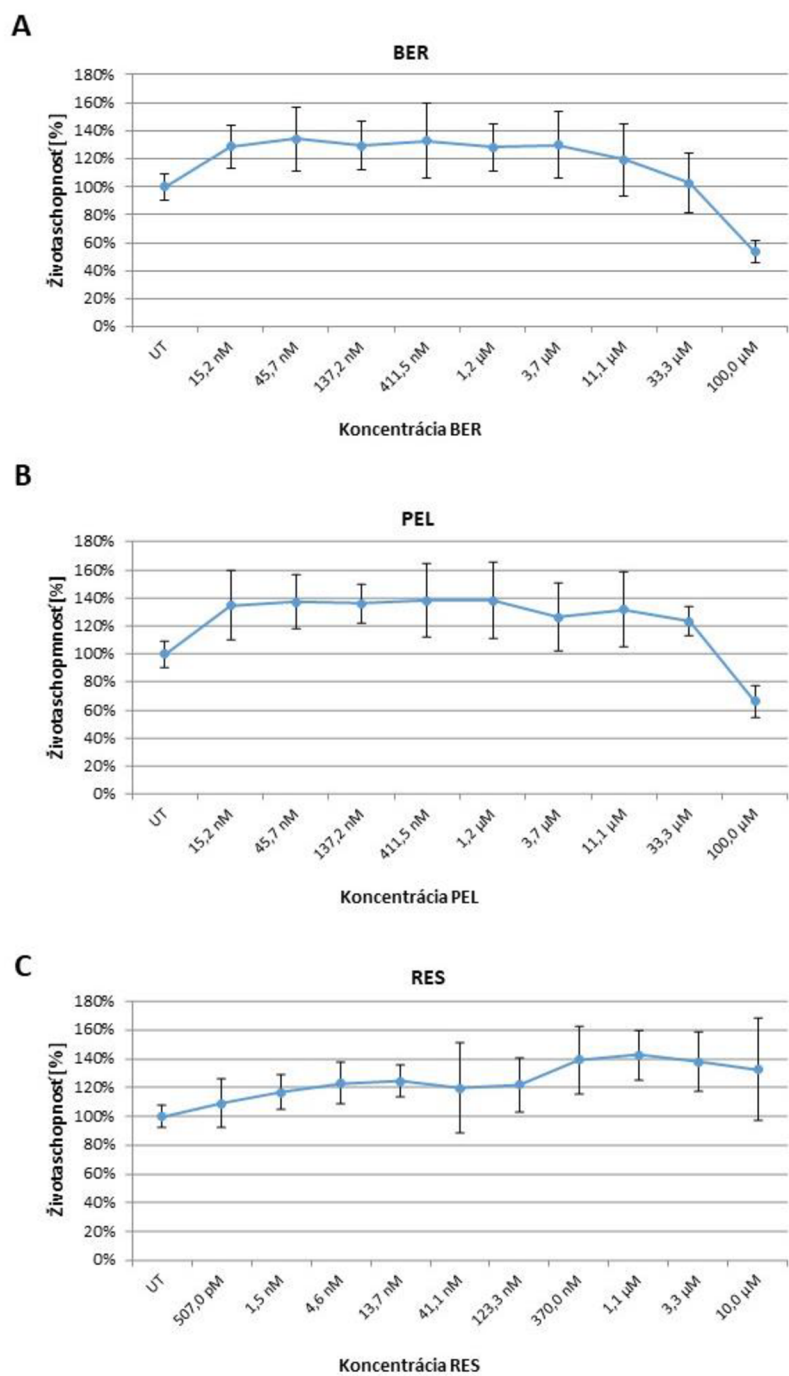
### 5.2.3 Testovanie vplyvu látok prírodného pôvodu na životaschopnosť buniek

Po pôsobení berberínu na bunky boli pozorované zvýšené hodnoty viability, čo môže naznačovať mierny proliferačný účinok tejto látky pri nižších koncentráciách ( $15,24 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $11,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) (Obr. č. 14A). V rozmedzí týchto koncentrácií sa životaschopnosť pohybovala medzi  $119,10 \pm 26,04 \%$  a  $133,99 \pm 22,62 \%$ . Pri koncentrácii  $33,3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bola hodnota životaschopnosti na úrovni  $102,52 \pm 20,95 \%$ . Naopak, pri najvyššej testovanej koncentrácii  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  sa prejavil cytotoxický účinok berberínu a životaschopnosť buniek dosahovala iba  $53,46 \pm 7,82 \%$ . Táto skutočnosť sa mohla negatívne odraziť aj vo výsledku príslušnej luciferázovej reportérovej eseje.

Životaschopnosť buniek po pôsobení pelargonidínu sa pri všetkých koncentráciách, s výnimkou najvyššej použitej, pohybovala v intervale od  $123,32 \pm 10,73 \%$  do  $138,27 \pm 27,59 \%$  (Obr. č. 14B). Tieto koncentrácie mali mierne proliferačné účinky na bunky. Výraznejší pokles životaschopnosti buniek bol pozorovaný pri najvyššej testovanej koncentrácii  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , kedy jej hodnota dosahovala iba  $66,31 \pm 11,51 \%$ . V tomto prípade sa pravdepodobne jednalo o dôsledok cytotoxického vplyvu pelargonidínu na bunky.

Resveratrol mal na bunky mierny proliferačný účinok, po jeho pôsobení bol zaznamenaný nárast životaschopnosti pri všetkých skúmaných koncentráciách (Obr. č. 14C). Najvyššiu hodnotu  $142,66 \pm 17,50 \%$  dosahovala viabilita pri koncentrácii  $1,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

## Životaschopnosť buniek po pôsobení prírodných látok



UT = negatívna kontrola

1 pM =  $1 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$

1 nM =  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$

1 μM =  $1 \text{ μmol} \cdot \text{l}^{-1}$

Obrázok č. 14: Vplyv látok prírodného pôvodu na životaschopnosť buniek LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín.

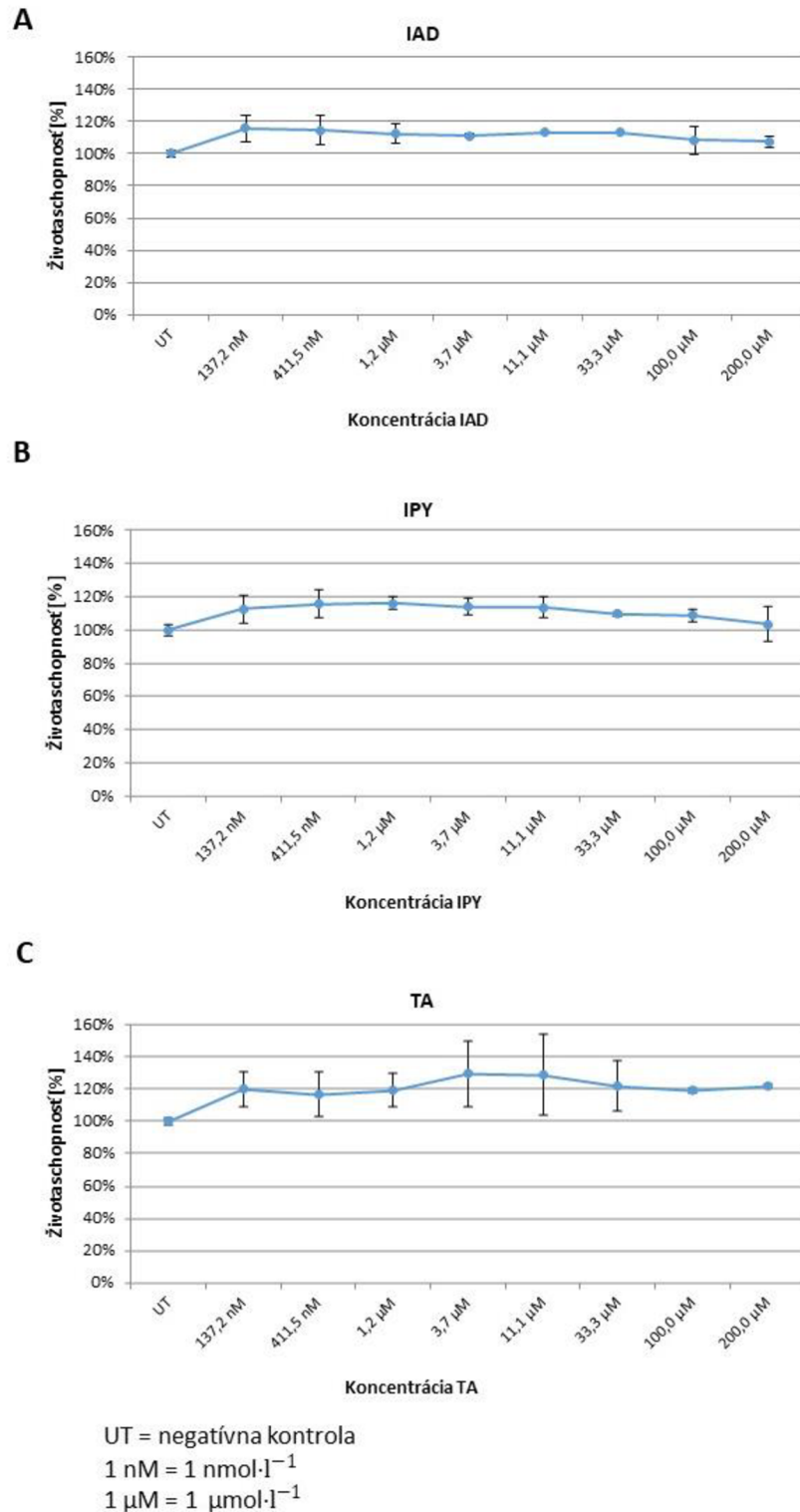
## 5.2.4 Testovanie vplyvu metabolitov črevnej mikrobioty na životaschopnosť buniek

Po pôsobení IAD na bunky presahovali namerané hodnoty viability pri všetkých koncentráciách 100 % a pohybovali sa v úzkom rozmedzí od  $107,41 \pm 3,37 \%$  do  $115,57 \pm 8,06 \%$  (Obr. č. 15A). Najvyššia pozorovaná hodnota  $115,57 \pm 8,06 \%$  bola zaznamenaná pri najnižšej testovanej koncentrácii  $137,2 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a naopak, najnižšia životaschopnosť  $107,41 \pm 3,37 \%$  bola zistená pri najvyššej sledovanej koncentrácii  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Podobne aj po pôsobení IPY na bunky sa namerané hodnoty životaschopnosti pohybovali nad 100 % (Obr. č. 15B). Od koncentrácie  $137,2 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  po  $1,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bol pozorovaný nízky nárast hodnôt viability a od koncentrácie  $1,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bol zaznamenaný veľmi mierny zostupný trend v životaschopnosti buniek. Najnižšiu hodnotu viability  $103,64 \pm 10,32 \%$  dosiahli bunky po pôsobení IPY v koncentrácii  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , najvyššia životaschopnosť bola zistená pri koncentrácii  $1,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Hodnoty životaschopnosti po pôsobení tryptamínu sa pohybovali v rozmedzí od  $116,82 \pm 14,15 \%$  do  $129,70 \pm 20,43 \%$  (Obr. č. 15C). Najnižšia hodnota viability  $116,80 \pm 14,15 \%$  bola pozorovaná pri koncentrácii  $411,5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , naopak najvyššia hodnota viability  $129,70 \pm 20,43 \%$  bola stanovená pri koncentrácii  $3,7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Všetky hodnotené koncentrácie spôsobili mierny nárast viability buniek, v žiadnom prípade nebol po pôsobení tryptamínu zaznamenaný cytotoxický účinok.

## Životaschopnosť buniek po pôsobení metabolitov črevnej mikrobioty



Obrázok č. 15: Vplyv metabolitov črevnej mikrobioty na životaschopnosť buniek LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín.

## 6 DISKUSIA

Jednou z najznámejších a najprebádanejších funkcií AhR je jeho úloha v metabolizme xenobiotík. Detoxifikácia cudzorodých látok prebieha najmä v pečeni a preto, pri snahe o vytvorenie stabilného reportérového systému určeného na stanovovanie transkripčnej aktivity AhR, boli často využívané práve bunkové línie odvodené od buniek pečene. V roku 2011 bola takto z ľudskej bunkovej línie HepG2 pripravená stabilne transfekovaná bunková línia AZ-AhR, ktorej účelom bolo skúmanie transkripčnej aktivity AhR (Novotná a kol., 2011). V tejto štúdii bola použitá luciferázová reportérová esej, pri ktorej bola pozorovaná indukcia luciferázovej aktivity látkou TCDD po dobu pôsobenia 24 hodín. Pozorovaná indukcia luciferázovej aktivity narastala v závislosti s narastajúcou koncentráciou TCDD. Avšak, v bunkovej línii AZ-AhR dosahovali hodnoty indukcie rádovo tisíce FOLD, zatiaľ čo v nami dosiahnutých výsledkoch, v bunkovej línii LS174T-AhR-luc bola zaznamenaná hodnota indukcie luciferázovej aktivity maximálne 20 FOLD.

V štúdii Shi a kol. (2019) bola taktiež skúmaná indukcia luciferázovej aktivity po pôsobení TCDD, ale okrem bunkovej línie HepG2 bola použitá aj myšia línia Hepa1c1c7, odvodená takisto z pečňových buniek. Pri porovnaní výsledkov sa ukázalo, že v prípade buniek HepG2 bola indukcia luciferázovej aktivity vyššia (maximálne 83 FOLD), než u buniek Hepa1c1c7 (maximálne 2,2 FOLD). Okrem TCDD bola skúmaná aj zlúčenina PCB126, pri ktorej boli taktiež pozorované vyššie hodnoty indukcie v HepG2 bunkách (maximálne 31,6 FOLD), než v myšej bunkovej línii Hepa1c1c7 (maximálne 5,9 FOLD) po 24 hodinovom pôsobení (Shi a kol., 2019). Podobný trend sme zaznamenali aj pri použití reportérovej línie LS174T-AhR-luc, kedy po 24 hodinovom pôsobení TCDD dosahovali hodnoty indukcie maximálne 13,4 FOLD, kým u PCB126 to bolo maximálne 9,9 FOLD.

Reportérová línia AZ-AhR bola použitá aj pri analýze vplyvu benzo[a]pyrénu na transkripčnú aktivitu AhR po jeho 6 a 24 hodinovom pôsobení. Na základe výsledkov luciferázovej eseje bolo zistené, že po 6 hodinách dosahovala úroveň luciferázovej aktivity indukovanej BAP hodnotu 81 % z hodnoty indukcie vyvolanej pôsobením TCDD, a po 24 hodinách sa hodnota zvýšila na 84 % (Vondráček a kol., 2017). Z našich pozorovaní je zrejmé, že v bunkách LS174T-AhR-luc mal BAP výraznejší vplyv na indukciu luciferázovej aktivity v porovnaní s TCDD a jej hodnota po 24 hodinách dosahovala až 137 % z aktivity po aplikácii TCDD.

V najnovších štúdiách bola použitá bunková línia LS174T, odvodená od buniek adenokarcinómu hrubého čreva, na štúdium metabolitov črevnej mikrobioty s cieľom

ich identifikácie ako potenciálnych ligandov AhR (Vrzalová kol., 2022). Z ľudských črevných bunkových línií bola k podobným účelom využitá aj príbuzná línia LS180, ktorá bola odvodená od rovnakých buniek, ale iným postupom (Vyhlídalová a kol., 2020). Autori použili bunky LS180, spolu s už spomínanými líniami AZ-AhR a línia Hepa1c1c7, na štúdium indolových derivátov a ich úlohy v aktivácii AhR. Pomocou metódy umožňujúcej sledovanie jadrovej translokácie, luciferázovej reportérovej eseje, kompetetívnej „radio-ligand binding“ eseje a qRT-PCR zistili, že tryptamín, IAA aj IPY účinkovali ako preukázané ligandy AhR a zároveň ako silné induktory génovej expresie cieľového génu AhR CYP1A1 (Vyhlídalová a kol., 2020).

V štúdiu, ktorá sa zoberala vplyvom antokyanidínov na transkripčnú aktivitu AhR, bola použitá bunková línia AZ-AhR (Kamenickova a kol., 2013). V luciferázovej reportérovej eseji bola použitá ako pozitívna kontrola  $5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD. Aj keď došlo po 24 hodinovom pôsobení pelargonidínu k preukaznej indukcii, luciferázová aktivita bola v porovnaní s TCDD veľmi nízka a dosahovala iba 1 % z hodnoty aktivity indukovanej TCDD. V našich experimentoch sme pozorovali, že v bunkách LS174T-AhR-luc ovplyvnených pelargonidínom dosahovala maximálna hodnota indukcie 17 % z indukcie po pôsobení  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD.

V experimentoch sledujúcich vplyv berberínu na aktiváciu AhR a následnú expresiu génu CYP1A1, boli použité bunkové línie HepG2 a H4IIE (Vrzal a kol., 2005). Na oboch líniiach bola prevedená luciferázová reportérová esej, s použitím  $5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD ako pozitívnej kontroly. Po 6 hodinách pôsobenia berberín aktivoval AhR s účinnosťou podobnou TCDD. Po 24 hodinách bola indukcia transkripčnej aktivity AhR výrazne nižšia a dosahovala približne 30 % z hodnoty TCDD. Po 48 hodinách nebol pozorovaný žiadny efekt na indukciu luciferázovej aktivity. Taktiež bola pomocou MTT testu stanovovaná viabilita buniek, kde sa zistilo, že berberín v koncentráciách od  $0,1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  po  $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  nemal takmer žiadny cytotoxický vplyv na bunky. Viabilita klesla maximálne o 10 %. V našom prípade klesla viabilita buniek LS174T-AhR-luc až na 53 %, ale až pri najvyššej testovanej koncentrácii  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Vrzal a kol., 2005).

V štúdiu Pastorková a kol. (2017) boli skúmané dva izoméry resveratrolu na bunkovej línii AZ-AhR. Ani trans-resveratrol ani cis-resveratrol nemali cytotoxické účinky na bunky, čo potvrdilo naše výsledky zistené na línii LS174T-AhR-luc. Po pôsobení 24 hodín dosahovala indukcia maximálne hodnoty približne 20 FOLD (trans-resveratrol) a 28 FOLD (cis-resveratrol) pri najvyššej testovanej koncentrácii  $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Pastorková a kol., 2017). V našich experimentoch bola pozorovaná maximálna indukcia 4,20 FOLD po pôsobení resveratrolu v koncentrácii  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



S použitím bunkovej línie HepG2-XRE-luc bol testovaný vplyv FICZ na transkripčnú aktivitu AhR v súvislosti s epigenetickými zmenami (Ghaedi a kol., 2019). Luciferázová esej bola prevádzaná na bunkách vystavených pôsobeniu FICZ po dobu 6 a 24 hodín. Po 6 hodinách dosahovala indukcia luciferázovej aktivity približne 8500 FOLD, po 24 hodinách predstavovala táto hodnota už iba maximálne 1000 FOLD. Indukcia bola koncentračne závislá, najvyššie hodnoty boli pozorované pri najvyššej koncentrácii. Rovnaký trend sme zaznamenali aj v prípade bunkovej línie LS174T-AhR-luc po pôsobení 24 hodín avšak s tým rozdielom, že maximálna indukcia bola 8,60 FOLD.

Ďalším z endogénnych ligandov študovaných v predkladanej bakalárskej práci bola kyselina kynurénová, ktorá bola s použitím troch bunkových línií: LS180, HT-29 (ľudská intestinálna línia) a Jurkat (ľudská T-bunková línia) skúmaná aj v štúdií Michaudel a kol. (2022). Pomocou qRT-PCR, „radio-ligand binding“ eseje a imunofluorescenčnej detekcie translokácie AhR do jadra autori zistili, že rovnako ako v prípade buniek LS174T-AhR-luc, bola kyselina kynurénová výrazným induktorom transkripčnej aktivity AhR. Výsledky tejto práce navyše poukázali, že zacielenie na kynurénový metabolizmus by mohol mať terapeutické využitie pre pacientov s IBD (Michaudel a kol., 2022).

Na základe výsledkov našich experimentov môžeme tvrdiť, že v bunkách LS174T-AhR-luc neindukoval bilirubín žiadnu luciferázovú aktivitu po 4 ani po 24 hodinách. Toto pozorovanie je v rozpore so zisteniami Phelan a kol. (1998), ktorí zaznamenali koncentračne závislú indukciu transkripčnej aktivity AhR po pôsobení bilirubínu na bunky myšej bunkovej línie H1L1.1c2. Maximálna indukcia predstavovala približne 40 % z hodnoty indukcie dosiahnutej po pôsobení  $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  TCDD ako pozitívnej kontroly. Bilirubín bol testovaný aj na morčacích (G16L1.1c8), potkaních (H4L1.1c4) a ľudských (HepG26.1) bunkových líniách kde dosahovala indukcia 83 % , 74 % a 100 % z hodnoty indukcie pomocou TCDD (Phelan a kol., 1998). Rozdielne výsledky by bolo možné vysvetliť tým, že sa jednalo o rozdielne experimentálne systémy. Je známe, že jedna a tá istá látka je schopná indukovať transkripčnú aktivitu AhR rôznej intenzity, v závislosti od modelového systému, hlavne čo sa týka jeho pôvodu. Najmarkantnejšie rozdiely boli zaznamenané práve medzi ľudskými bunkami a bunkami pochádzajúcimi z hlodavcov.

## 7 ZÁVER

Cieľom predkladanej bakalárskej práce bolo stanovenie vplyvu vybraných skupín látok na transkripčnú aktivitu AhR pomocou novej, stabilne transfekovanej reportérovej línie LS174T-AhR-luc. Ďalším cieľom bolo taktiež určenie účinku týchto látok na životaschopnosť buniek a zistenie ich prípadného cytotoxického vplyvu. V teoretickej časti bola popísaná štruktúra AhR, jeho aktivácia a vybrané funkcie v organizme. Výrazná pozornosť bola venovaná jednotlivým skupinám ligandov AhR.

V experimentálnej časti práce bola stanovená transkripčná aktivita AhR meraním indukcie luciferázovej aktivity pomocou luciferázovej reportérovej eseje. S použitím bunkovej línie LS174T-AhR-luc bolo zistené, že zo skupiny endogénnych ligandov dosahovala najvyššie hodnoty indukcie luciferázovej aktivity v závislosti na koncentrácii látka FICZ, a to ako po 4, tak aj po 24 hodinách pôsobenia. Kyselina kynurenová pôsobila ako slabý aktivátor AhR pri vyšších koncentráciách a podľa získaných výsledkov bola pravdepodobne v priebehu 24 hodín intenzívne metabolizovaná. Bilirubín neindukoval transkripčnú aktivitu AhR ani v jednom z časových intervalov. V skupine enviromentálnych polutantov bola pozorovaná silná indukcia luciferázovej aktivity v prípade všetkých troch látok, z toho najsilnejším aktivátorom AhR bol TCDD. TCDD a PCB126 sú perzistentné látky a preto si aj po 24 hodinách zachovali nezmenenú aktivitu. Najvyššie hodnoty indukcie luciferázovej aktivity u zlúčenín zo skupiny látok prírodného pôvodu boli zaznamenané po štvorhodinovom pôsobení pelargonidínu, avšak po 24 hodinách bola indukcia luciferázovej aktivity pozorovaná už iba pri vyšších koncentráciách. Resveratrol a berberín pôsobili ako veľmi slabé aktivátory transkripčnej aktivity AhR. V prípade metabolitov črevnej mikrobioty bola pozorovaná výrazná indukcia transkripčnej aktivity AhR pri všetkých troch testovaných látkach po ich pôsobení počas 4 hodín. Najvyššia hodnota indukcie bola dosiahnutá po aplikácii IAD. Po 24 hodinách pôsobenia však bola u všetkých troch skúmaných látok zaznamenaná nižšia schopnosť indukovať luciferázovú aktivitu, čo mohlo byť pravdepodobne spojené s intenzívnym metabolizmom týchto látok.

Životaschopnosť buniek po aplikácii testovaných látok bola stanovená pomocou MTT testu. Zo všetkých 12 látok mali mierne cytotoxické účinky iba benzo[a]pyrén, PCB126, berberín a pelargonidín. Pri najvyššej koncentrácii benzo[a]pyrénu bol pozorovaný pokles viability na  $66 \pm 0,61$  %. Pri PCB126 bol pozorovaný len mierny pokles viability na  $82 \pm 12,30$  % pri najvyššej koncentrácii. Berberín v koncentrácii  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  znižoval životaschopnosť buniek na hodnotu  $53 \pm 7,82$  %, čo bola najnižšia nameraná hodnota zo

všetkých testovaných látok. Pelargonidín znížil viabilitu na  $66 \pm 11,51$  %. Ostatné látky nemali na životaschopnosť buniek takmer žiadny merateľný vplyv, prípadne spôsobovali jej veľmi mierny nárast.

## 8 LITERATÚRA

Abel J., Haarmann-Stemmann T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological Chemistry* 391: 1235–1248.

Abotaleb M., Samuel S.M., Varghese E., Varghese S., Kubatka P., Liskova A., Büsselberg D. (2018). Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers* 11: 28.

Adachi J., Mori Y., Matsui S., Takigami H., Fujino J., Kitagawa H., Miller C. A. 3rd, Kato T., Saeki K., Matsuda T. (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 31475–31478.

Amawi H., Ashby C.R., Tiwari A. K. (2017). Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: What's limiting? *Chinese Journal of Cancer* 36: 50.

Ateba S. B., Njamen D., Medjakovic S., Zehl M., Kaehlig H., Jungbauer A., Krenn L. (2014). Lupinalbin A as the most potent estrogen receptor  $\alpha$ - and aryl hydrocarbon receptor agonist in *Eriosema laurentii* de Wild (Leguminosae). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14: 294.

Baird W. M., Hooven L. A., Mahadevan B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 45: 106–114.

Beedanagari, S.R., Bebenek I., Bui P., Hankinson O. (2009) Resveratrol inhibits dioxin induced expression of human CYP1A1 and CYP1B1 by inhibiting recruitment of the aryl hydrocarbon receptor complex and RNA polymerase II to the regulatory regions of the corresponding genes. *Toxicological Science*. 110: 61–67.

Beischlag T. V., Luis Morales J., Hollingshead B. D., Perdew G. H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 18: 207–50.

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

Berkoz M. (2019). Diosmin suppresses the proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages via NF-kappaB and MAPKs signal pathways. *General Physiology and Biophysics* 38: 315–324.

Berridge M. V., Tan A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303: 474–482.

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

Biebl M. M., Lopez A., Rehn A., Freiburger L., Lawatscheck J., Blank B., Sattler M., Buchner J. (2021). Structural elements in the flexible tail of the co-chaperone p23 coordinate client binding and progression of the Hsp90 chaperone cycle. *Nature Communications* 12.

Boström C. E., Gerde P., Hanberg A., Jernström B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Törnqvist M., Victorin K., Westerholm R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives* 110: 451–88.

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

Carballo-Villalobos A. I., Gonzalez-Trujano M. E., Pellicer F., Lopez-Munoz F. J. (2016). Antihyperalgesic effect of hesperidin improves with diosmin in experimental neuropathic pain. *BioMed Research International* 2016: 8263463.

Chang C. Y., Puga A. (1998). Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Molecular and Cellular Biology* 18: 525–35.

Chen J., Li Y., Tian Y., Huang C., Li D., Zhong Q., Ma X. (2015). Interaction between microbes and host intestinal health: modulation by dietary nutrients and gut-brain-endocrine-immune axis. *Current Protein & Peptide Science* 16: 592–603.

Chen K., Huang T., Zhang X., Liu X., Huang Y., Wang L., Zhao Y., Gao H., Tao S., Liu J., Jian X., Gusev A., Ma J. (2021). The footprint of dioxins in globally traded pork meat. *iScience* 24: 103255.

- Ciolino H.P., Daschner P. J., Yeh G. C. (1999). Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Journal of Biological Chemistry* 340: 715–722.
- Crews S. T. (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes & Development* 12: 607–620.
- Davarinos N. A., Pollenz R. S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *Journal of Biological Chemistry* 274: 28708–28715.
- Dinesh P., Rasool M. (2019). Berberine mitigates IL-21/IL-21R mediated autophagic influx in fibroblast-like synoviocytes and regulates Th17/Treg imbalance in rheumatoid arthritis. *Apoptosis* 24: 644–661.
- Dodd D., Spitzer M. H., Van Treuren W., Merrill B. D., Hryckowian A. J., Higginbottom S. K., Le A., Cowan T. M., Nolan G. P., Fischbach M. A., Sonnenburg J. L. (2017). A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature* 551: 648–652.
- Dolwick K. M., Schmidt J.V., Carver L.A., Swanson H.I., Bradfield C.A. (1993). Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Molecular Pharmacology*. 44: 911–917.
- Dull A. B., Carlson D. B., Petrusis J. R., Perdew G. H. (2002). Characterization of the phosphorylation status of the hepatitis B virus X-associated protein 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 406: 209–221.
- Fan P., Li L., Rezaei A., Shabnam E., Che D., Ma X. (2015). Metabolites of dietary protein and peptides by intestinal microbes and their impacts on gut. *Current Protein & Peptide Science* 16: 646–54.
- Gasiewicz T. A., Singh K. P., Bennett J. A. (2014). The Ah receptor in stem cell cycling, regulation, and quiescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1310: 44–50.
- Geusau A., Abraham K., Geissler K., Sator M. O., Stingl G., Tschachler E. (2001). Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environmental Health Perspectives* 109: 865–9.

Ghaedi A., Keshavarzi M., Ghafarian Bahraman A., Mohammadi-Bardbori A. (2020). Selective cytochrome P450 1A1 but not 1B1 promoter CpG island DNA methylation by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 34: e22414.

Gonzales F., Fernandez-Salguero P. (1998). The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 26: 1194–1198.

Grishanova, A. Y., Perepechaeva M. L. (2022). Aryl Hydrocarbon Receptor in oxidative stress as a double agent and its biological and therapeutic significance. *International Journal of Molecular Sciences* 23.

Haarmann-Stemann T., Esser Ch. a Krutmann J. (2015). The janus-faced role of aryl hydrocarbon receptor signaling in the skin: consequences for prevention and treatment of skin disorders. *Journal of Investigative Dermatology* 135: 2572–2576.

Harrill J. A., Hukkanen R. R., Lawson M., Martin G., Gilger B., Soldatow V., Lecluyse E. L., Budinsky R. A., Rowlands J.C., Thomas R. S. (2013). Knockout of the aryl hydrocarbon receptor results in distinct hepatic and renal phenotypes in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272: 503–518.

Heath-Pagliuso S., Mui R., Milici A., Giese S., Chin R., Denison M. S. (2000). Tryptophan metabolites, indole-3-pyruvic acid, DL-3-indolelactic acid, L-kynurenine and kynurenic acid activate Ah receptor signal transduction. *Organohalogen compounds* 49: 289–92.

Heath-Pagliuso S., Rogers W. J., Tullis K., Seidel S. D., Ceniijn P. H., Brouwer A., Denison M. S. (1998). Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37: 11508–15.

Hu Q., He G., Zhao J., Soshilov A., Denison M. S., Zhang A., Yin H., Fraccalvieri D., Bonati L., Xie Q., Zhao B. (2013). Ginsenosides are novel naturally-occurring aryl hydrocarbon receptor ligands. *PLoS One* 8: e66258.

International agency for research on cancer. [online] [navštívené 10.3.2023] Dostupné z <https://cancer-code-europe.iarc.fr/index.php/en/ecac-12-ways/pollutants-recommendation/44-box/188-box-6-persistent-organic-pollutants-pops>.

International agency for research on cancer. [online] [navštívené 10.3.2023] Dostupné z [https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/5133/efed9a637bde4f0f23c495933b712a0e249d3457.pdf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/5133/efed9a637bde4f0f23c495933b712a0e249d3457.pdf).

Jain S., Dolwick K. M., Schmidt J. V., Bradfield C. A. (1994). Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *Journal of Biological Chemistry* 269: 31518–24.

Jakubczyk K., Drużga A., Katarzyna J., Skonieczna-Żydecka K. (2020). Antioxidant potential of curcumin-A meta-analysis of randomized clinical trials. *Antioxidants* 9: 1092.

Jasiewicz M., Moniuszko M., Pawlak D., Knapp M., Rusak M., Kazimierczyk R., Musiał W. J., Dabrowska M., Kaminski K. A. (2016). Activity of the kynurenine pathway and its interplay with immunity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart* 102: 230–7.

Jin U. H., Lee S. O., Pfent C., Safe S. (2014). The aryl hydrocarbon receptor ligand omeprazole inhibits breast cancer cell invasion and metastasis. *BMC Cancer* 14: 498.

Kahalehili H. M., Newman N. K., Pennington J. M., Kolluri S. K., Kerkvliet N. I., Shulzhenko N., Morgun A., Ehrlich A. K. (2021) Dietary indole-3-carbinol activates AhR in the gut, alters Th17-microbe interactions, and exacerbates insulinitis in NOD mice. *Frontiers in immunology* 11: 606441.

Kamenicková A., Anzenbacherova E., Pavek P., Soshilov A. A., Denison M. S., Anzenbacher P., Dvořák Z. (2013). Pelargonidin activates the AhR and induces CYP1A1 in primary human hepatocytes and human cancer cell lines HepG2 and LS174T. *Toxicology Letters* 218: 253–9.

Keihanian F., Saeidinia A., Bagheri R. K., Johnston T. P., Sahebkar A. (2018). Curcumin, hemostasis, thrombosis, and coagulation. *Journal of Cellular Physiology* 233: 4497–4511.

Kim H. O., Kim J. H., Chung B. Y., Choi M. G., Park C. W. (2014). Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Experimental Dermatology* 23: 278–281.

Kimmig J., Schulz K. H. (1957). Berufliche Akne (sog. Chlorakne) durch chlorierte aromatische zyklische Äther. *Dermatologica* 115: 540–546.

Koeberle A., Werz O. (2014). Multi-target approach for natural products in inflammation. *Drug Discovery Today* 19: 1871–1882.



Kosalec, I., Gregurek, B., Kremer, D., Zovko A., Sanković K., Karlović K. (2009). Croatian barberry (*Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine—analysis and antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25: 145–150.

Kou Z., Dai W. (2021). Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. *Biochemical Pharmacology* 185: 114428.

Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7: 1–9.

Larsen J. C. (2006). Risk assessments of polychlorinated dibenzo- p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food. *Molecular Nutrition & Food Research* 50: 885–96.

Leclair H. M., Tardif N., Paris A., Galibert M. D., Corre S. (2020). Role of flavonoids in the prevention of AhR-dependent resistance during treatment with BRAF inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 5025.

Lee I. A., Hyun Y. J., Kim D. H. (2010). Berberine ameliorates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation, enterobacterial growth and NF-kappaB activation. *European Journal of Pharmacology* 648: 162–170.

Li H. L., Han T., Liu R. H., Zhang C., Chen H. S., Zhang W. D. (2008). Alkaloids from *Corydalis saxicola* and their anti-hepatitis B virus activity. *Chemistry and Biodiversity* 5: 777–783.

Li Y., Mei H., Wu Q. G., Zhang S. H., Fang J. L., Shi L. M., Guo L. (2011). Methysticin and 7,8-dihydromethysticin are two major kavalactones in Kava extract to induce CYP1A1. *Toxicological Sciences* 124: 388–399.

Lin L., Dai Y., Xia Y. (2022). An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the last two decades (2002–2022): A medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* 244.

Linhart.(2022): *Toxikologie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.

Machala M., Vondráček J., Bláha L., Ciganek M., Neča J. (2001). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro

reporter gene assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 497: 49–62.

Matsumura F. (2009). The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochemical Pharmacology* 77: 608–26.

Michaudel C., Danne C., Agus A., Magniez A., Aucouturier A., Spatz M., Lefevre A., Kirchgessner J., Rolhion N., Wang Y., Lavelle A., Galbert C., Da Costa G., Poirier M., Lapière A., Planchais J., Nádvořník P., Illes P., Ouevray C., Creusot L., Michel ML., Benech N., Bourrier A., Nion-Larmurier I., Landman C., Richard M. L., Emond P., Seksik P., Beaugierie L., Arguello R. R., Moulin D., Mani S., Dvořák Z., Bermúdez-Humarán L. G., Langella P., Sokol H. (2022). Rewiring the altered tryptophan metabolism as a novel therapeutic strategy in inflammatory bowel diseases. *Gut* 0: 1–12.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.

Naso L., Martinez V. R., Lezama L., Salado C., Valcarcel M., Ferrer E. G., Williams P. A. M. (2016). Antioxidant, anticancer activities and mechanistic studies of the flavone glycoside diosmin and its oxidovanadium(IV) complex. Interactions with bovine serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24: 4108–4119.

Neuhouser M.L. (2004). Review: dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer* 50: 1–7.

Novotna A., Korhonova M., Bartonkova I., Soshilov A. A., Denison M. S., Bogdanova K., Kolar M., Bednar P., Dvorak Z. (2014). Enantiospecific effects of ketoconazole on aryl hydrocarbon receptor. *PLoS ONE* 9: 101832.

Novotná A., Pavek P., Dvořák Z. (2011). Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environmental Science & Technology* 45: 10133–10139.

Nukaya M., Lin B. C., Glover E., Moran S. M., Kennedy G. D., Bradfield C. A. (2010). The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) is required for dioxin-induced hepatotoxicity but not for the induction of the Cyp1a1 and Cyp1a2 genes. *Journal of Biological Chemistry* 285: 35599–605.

- Oxenkrug G. F. (2010). Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1199: 1–14.
- Pastorková B., Vrzalová A., Bachleda P., Dvořák Z. (2017). Hydroxystilbenes and methoxystilbenes activate human aryl hydrocarbon receptor and induce CYP1A genes in human hepatoma cells and human hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 103: 122–132.
- Phelan D., Winter G. M., Rogers W. J., Lam J. C., Denison M. S. (1998). Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357: 155–63.
- Poland A., Glover E., Robinson R. J., Nebert D. W. (1976). Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Journal of Biological Chemistry* 249: 4936–4946.
- Pollenz R. S., Barbour E. R. (2000). Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation. *Molecular and Cellular Biology* 20: 6095–104.
- Pont A., Graybill J. R., Craven P. C., Galgiani J. N., Dismukes W. E., Reitz R. E., Stevens D. A. (1984). High-dose ketoconazole therapy and adrenal and testicular function in humans. *The Archives of Internal Medicine* 144: 2150–3.
- Qin X., Guo B.T., Wan B., Fang L., Lu L., Wu L., Zang Y.Q., Zhang J.Z. (2010). Regulation of Th1 and Th17 cell differentiation and amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural product compound berberine. *The Journal of Immunology* 185: 1855–63.
- Rannug A., Rannug U., Rosenkranz H. S., Winqvist L., Westerholm R., Agurell E., Grafström A. K. (1987). Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 15422–7.
- Roager H. M., Licht T. R. (2018). Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature Communications* 9: 3294.
- Roskoski R. Jr. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324: 1155–64.

- Rothhammer V., Quintana F.J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 19: 184–197.
- Russell W. R., Duncan S. H., Scobbie L., Duncan G., Cantlay L., Calder A. G., Anderson S. E., Flint H. J. (2013). Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Molecular Nutrition & Food Research* 57: 523–35.
- Sandermann W., Stockmann H., Casten R. (1957). Über die pyrolyse des pentachlorphenols. *Chemische Berichte* 90: 690–692.
- Sarkar F. H., Li Y. (2004). Indole-3-carbinol and prostate cancer. *The Journal of Nutrition* 134: 3493–3498.
- Seok S. H., Zhi-Xiong M. A., Feltenberger J. B., Chen H., Scarlett C., Lin Z., Satyshur K. A., Cortopassi M., Jefcoate C. R., Ge Y., Tang W., Bradfield C. A., Xing Y. (2018). Trace derivatives of kynurenine potently activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Journal of Biological Chemistry* 293: 1994–2005.
- Shi H., Hardesty J. E., Jin J., Head K. Z., Falkner K. C., Cave M. C., Prough R. A. (2019). Concentration dependence of human and mouse aryl hydrocarbon receptor responsiveness to polychlorinated biphenyl exposures: Implications for aroclor mixtures. *Xenobiotica* 49: 1414–1422.
- Singh C., Prakash C., Mishra P., Tiwari K. N., Mishra S. K., More R. S., Kumar V., Singh J. (2019). Hepatoprotective efficacy of *Premna integrifolia* L. leaves against aflatoxin B1-induced toxicity in mice. *Toxicon* 166: 88–100.
- Smith T. (1897). A modification of the method for determining the production of indol by bacteria. *The Journal of Experimental Medicine* 2: 543–7.
- Stone T. W., Darlington L. G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* 1: 609–20.
- Sun M., Ma N., He T., Johnston L. J., Ma X. (2020) Tryptophan (Trp) modulates gut homeostasis via aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60: 1760–1768.

Tindall J. P. (1985). Chloracne and chloracnegens. *Journal of the American Acadademy of Dermatology* 13: 539–58.

Tomkiewicz C., Herry L., Bui L. C., Métayer C., Bourdeloux M., Barouki R., Coumoul X. (2013). The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene* 32: 1811–20.

Van den Bogaard E. H., Bergboer J. G., Vonk-Bergers M., van Vlijmen-Willems I. M., Hato S. V., van der Valk P. G., Schröder J. M., Joosten I., Zeeuwen P. L., Schalkwijk J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation* 3: 917–27.

Vondráček J., Pěňčíková K., Neča J., Ciganek M., Grycová A., Dvořák Z., Machala M. (2017). Assessment of the aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human cell-based reporter gene assay. *Environmental Pollution* 220: 307–316.

Vrzal R., Zdařilová A., Ulrichová J., Bláha L., Giesy J. P., Dvořák Z. (2005). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by berberine in HepG2 and H4IIE cells: Biphasic effect on CYP1A1. *Biochemical Pharmacology* 70: 925–36.

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

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

Vyhlídalová B., Krasulová K., Pečinková P., Poulíková K., Vrzal R., Andrysík Z., Chandran A., Mani S., Dvorak Z. (2020). Antimigraine drug avitriptan is a ligand and agonist of human aryl hydrocarbon receptor that induces CYP1A1 in hepatic and intestinal cells. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 2799.

Wei Y. D., Helleberg H., Rannug U., Rannug A. (1998). Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chemico-Biological Interactions* 110: 39–55.

- Wei Y. D., Rannug U., Rannug A. (1999). UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chemico-biological Interactions* 118: 127–40.
- Whitelaw M. L., McGuire J., Picard D., Gustafsson J. A., Poellinger L. (1995). Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 4437–41.
- Williams B. B., Van Benschoten A. H., Cimermancic P., Donia M. S., Zimmermann M., Taketani M., Ishihara A., Kashyap P. C., Fraser J. S., Fischbach M. A. (2014). Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. *Cell Host Microbe* 16: 495–503.
- Zack J. A., Suskind R. R. (1980). The mortality experience of workers exposed to tetrachlorodibenzodioxin in a trichlorophenol process accident. *Journal of Occupational Medicine* 22: 11–14.
- Zhang L. S., Davies S. S. (2016). Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Medicine* 8: 46.
- Zhang S., Qin C., Safe S. H. (2003). Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. *Environmental Health Perspectives* 111: 1877–1882.
- Zhou H., Mineshita S. (2000). The effect of berberine chloride on experimental colitis in rats in vivo and in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294: 822–9.
- 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* 20: 4763–4773.
- Zmora N., Suez J., Elinav E. (2019). You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16: 35–56.