

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní obor: Biochemie



**Vliv přírodních látek na transkripční aktivitu jaderných a steroidních  
receptorů a expresi cytochromu P450 (CYP1A)**

**Effect of natural substances on transcriptional activity of nuclear and steroid  
receptors and expression of cytochrome P450 (CYP1A)**

Rigorózní práce

**Mgr. Barbora Bednaříková**

Praha, 2019

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány. Vědecké články, na kterých je tato práce založená, byly publikovány s mým rodným příjmením **Pastorková**. Kapitola materiál a metody je součástí těchto publikací.

.....

## Abstrakt

Tato práce vychází ze dvou příložených prvoautorských publikací, které se zabývají vlivem přírodních látek rostlinného původu na transkripční aktivitu jaderných a steroidních receptorů a jejich vlivu na expresi cytochromu P450, podrodiny CYP1A. Studovanými látkami jsou anthokyanidiny a stilbeny, patřící do široké kategorie fenolických látek.

Cílem první studie bylo vyhodnotit vliv nejběžnějších anthokyanidinů (kyanidinu, delfinidinu, malvidinu, pelargonidinu a peonidinu) na transkripční aktivitu jaderných a steroidních receptorů. Transkripční aktivita jaderných receptorů: receptor vitamínu D (VDR), retinoidní X receptor (RXR), receptor kyseliny retinové (RAR), pregnanový X receptor (PXR) a thyroideální receptor (TR) a steroidních receptorů: progesteronový receptor (PR), estrogenový receptor (ER), androgenový receptor (AR), glukokortikoidní receptor (GR) byla hodnocena buď pomocí stabilně nebo transientně transfekovaných buněčných linií s luciferázovým reportérovým genem (gene reporter assay). Testy cytotoxicity a gene reporter assay byly provedeny po 24h inkubaci s testovanými anthokyanidiny s rostoucí koncentrací v rozsahu od 10 nM do 50  $\mu$ M. Výsledky experimentů ukázaly, že žádný ze zkoumaných anthokyanidinů v testovaných koncentracích nezpůsobuje významnou změnu v transkripční aktivitě studovaných steroidních receptorů. Avšak transkripční aktivita jaderných receptorů indukovaná modelovým agonistou byla s rostoucí koncentrací anthokyanidinů mírně inhibována.

Cílem druhé studie bylo popsat účinky třinácti různých hydroxy- a methoxystilbenů včetně jejich *cis/trans* isomerů na transkripční aktivitu aryl hydrokarbonového receptoru (AhR) a expresi genů CYP1A v jaterních nádorových buňkách HepG2 a primárních lidských hepatocytech. Byly využity metody, jako gene reporter assay, qRT-PCR, Simple Western blotting pomocí Sally Sue<sup>TM</sup> a electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Všechny testované látky aktivovaly AhR, ale jejich účinnosti, potence a profily závislosti účinku na koncentraci se podstatně lišili. Nejsilnějším aktivátorem AhR a induktorem CYP1A1 v HepG2 buňkách byly látky DMU-212 ((E)-3,4,5,4'-tetramethoxystilben), *trans*-piceatanol, *cis*-piceatanol, *trans*-trismethoxyresveratrol a *trans*-pinostilben. DMU-212 a *trans*-trismethoxyresveratrol také indukovali CYP1A1 a CYP1A2 v primárních lidských hepatocytech, na rozdíl od *trans*-piceatanolu, *cis*-piceatanolu a *trans*-pinostilbenu, kde již účinek nebyl pozorován. Na druhou stranu, *trans*-4-methoxystilben byl silným induktorem CYP1A v primárních hepatocytech, ale ne v HepG2 buňkách. Rozdíly mezi účinkem stilbenů v HepG2 buňkách a primárních hepatocytech jsou pravděpodobně způsobeny extenzivní fází I a II metabolismu xenobiotik u primárních hepatocytů. Tato získaná data mohou mít toxikologický význam.

## Abstract

This work is based on two attached first authors' publications dealing with the effect of natural substances of plant origin on transcriptional activity of nuclear and steroid receptors and their action on cytochrome P450 expression, CYP1A subfamily. The studied substances are anthocyanidins and stilbenes, belonging to a broad group of phenolic compounds.

The aim of the first study was to evaluate the effect of the most common anthocyanidins (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, and peonidin) on the transcriptional activity of nuclear and steroid receptors. The activities of nuclear receptors: vitamin D receptor (VDR), retinoid X receptor (RXR), retinoic acid receptor (RAR), pregnane X receptor (PXR), thyroid receptor (TR), and steroid receptors: progesterone receptor (PR), estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and glucocorticoid receptor (GR) were assessed using either stable or transiently transfected luciferase gene reporter cell lines. The cytotoxicity assays and gene reporter assay were performed after the 24h treatment of cells with increasing range of concentrations (10 nM to 50  $\mu$ M) of selected anthocyanidins. The results of experiments indicate that none of the studied anthocyanidins in all tested concentrations caused remarkable changes of transcriptional activity of examined steroid receptors, but their increasing concentrations slightly inhibited transcriptional activity of nuclear receptors induced by model agonists.

The aim of the second study was to describe the effects of thirteen different hydroxy- and methoxystilbenes, including their *cis/trans* isomers on the transcriptional activity of aryl hydroxycarbon receptor (AhR) and the expression of CYP1A genes in hepatic cancer cells HepG2 and primary human hepatocytes. Techniques of gene reporter assay, qRT-PCR, Simple Western blotting by Sally Sue<sup>TM</sup> and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were employed. All compounds activated AhR, but their efficacies, potencies and dose-response profiles differed substantially. The strongest activator of AhR and inducers of CYP1A1 in HepG2 cells were DMU-212 ((E)-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene), *trans*-piceatannol, *cis*-piceatannol, *trans*-trismethoxyresveratrol and *trans*-pinostilbene. While DMU-212 and *trans*-trismethoxyresveratrol also induced CYP1A1 and CYP1A2 in primary human hepatocytes, the effects of *trans*-piceatannol, *cis*-piceatannol and *trans*-pinostilbene weaned off. On the other hand, *trans*-4-methoxystilbene was strong CYP1A inducer in primary hepatocytes but not in HepG2 cells. Differences between effects of stilbenes in HepG2 cells and primary hepatocytes are probably due to the extensive phase I and phase II xenobiotic metabolism in primary hepatocytes. The data obtained may be of toxicological relevance.

## Obsah

1.	Úvod do problematiky.....	6
1.1.	Anthokyanidiny.....	6
1.2.	Stilbeny .....	7
1.3.	Farmakologické interakce .....	8
1.3.1.	Lékové interakce .....	8
1.3.2.	Potravinové interakce.....	9
1.4.	Cytochrom P450 .....	9
1.4.1.	Cytochromy P450 1A (CYP1A) .....	11
1.5.	Jaderné a steroidní receptory.....	12
1.5.1.	Jaderné receptory .....	12
1.5.2.	Steroidní receptory .....	14
1.6.	Interakce mezi stilbenoidy a AhR-CYP1A signální dráhou .....	16
2.	Souhrn výsledků.....	17
2.1.	Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu jaderných a steroidních receptorů.....	17
2.1.1.	Cytotoxicita anthokyanidinů v lidských buněčných kulturách .....	17
2.1.2.	Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu jaderných receptorů VDR, RXR, RAR, PXR a TR v lidských buněčných kulturách .....	17
2.1.3.	Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu steroidních receptorů PR, ER, AR a GR v lidských buněčných kulturách.....	19
2.2.	Vliv hydroxystilbenů a methoxystilbenů na aktivitu AhR a indukci CYP1A genů v jaterních nádorových buňkách a primárních lidských hepatocytech.....	22
2.2.1.	Vliv derivátů stilbenu na transkripční aktivitu AhR .....	23
2.2.2.	Vliv derivátů stilbenu na expresi CYP1A1 v HepG2 buňkách .....	27
2.2.3.	Vliv derivátů stilbenu na tvorbu komplexu AhR-DNA .....	28
2.2.4.	Vliv derivátů stilbenu na expresi CYP1A1 a CYP1A2 v primárních lidských hepatocytech.....	28
3.	Diskuze.....	31
3.1.	Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu jaderných a steroidních receptorů.....	31
3.2.	Vliv hydroxystilbenů a methoxystilbenů na aktivitu AhR a indukci CYP1A genů v jaterních nádorových buňkách a primárních lidských hepatocytech.....	32
4.	Závěr .....	34
5.	Seznam použitých zkratk.....	35
6.	Seznam použité literatury.....	37
7.	Přílohy.....	44

# 1. Úvod do problematiky

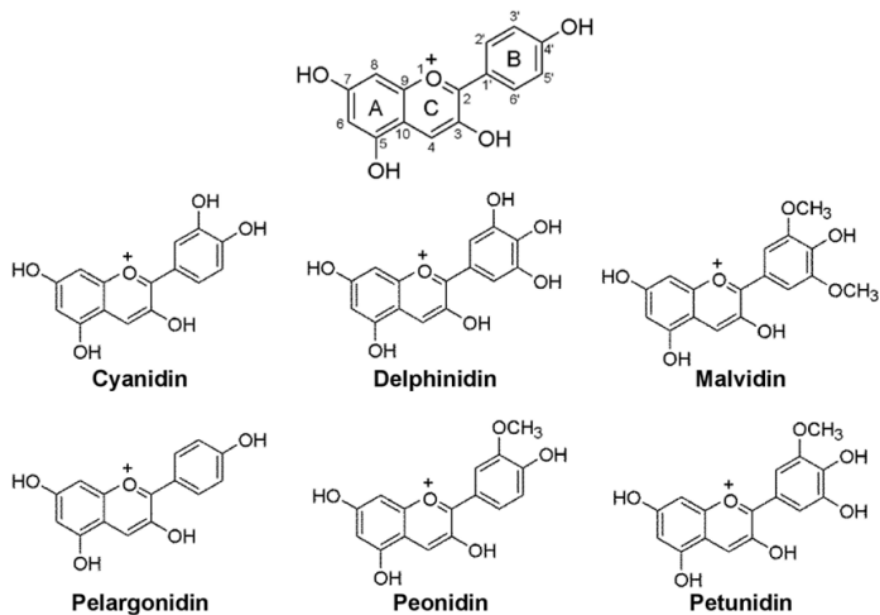
Tato práce vychází ze dvou prvoautorských publikací: **Pastorková B**, Illés P, Dvořák Z. Profiling of anthocyanidins against transcriptional activities of steroid and nuclear receptors. *Drug Chem Toxicol.* 2017; 41(4):434-440. (IF 1.53) a **Pastorková B**, Vrzalová A, Bachleda P, Dvořák Z. Hydroxystilbenes and methoxystilbenes activate human aryl hydrocarbon receptor and induce CYP1A genes in human hepatoma cells and human hepatocytes. *Food Chem Toxicol.* 2017; 103:122-132. (IF 3.98).

Publikace se zabývají vlivem přírodních látek rostlinného původu na transkripční aktivitu jaderných a steroidních receptorů a jejich vlivem na expresi cytochromu P450, podrodiny CYP1A. Studovanými látkami jsou anthokyanidiny a stilbeny, patřící do široké kategorie fenolických látek, které mohou působit baktericidně nebo jako endogenní disruptory. První práce se zaměřuje na prozkoumání většího množství jaderných a steroidních receptorů a poskytnutí komplexnějších informací o účinku anthokyanidinů na jejich transkripční aktivitu. Druhá práce se zabývá hodnocením účinků třinácti různých hydroxystilbenů a methoxystilbenů, včetně jejich *cis/trans* izomerů na transkripční aktivitu aryl hydrokarbonového receptoru (AhR) a expresi CYP1A genů v jaterních nádorových buňkách HepG2 a primárních lidských hepatocytech.

## 1.1. Anthokyanidiny

Anthokyanidiny jsou rostlinné pigmenty červené, modré a fialové barvy, které způsobují typické zbarvení květů a plodů ovoce a zeleniny. Patří do kategorie polyfenolů, zvaných flavonoidy. Anthokyanidiny jsou aglykony anthokyaninů, tedy struktury bez sacharidové složky (Welch et al., 2008). V přírodě se nejčastěji vyskytuje kyanidin, pelargonidin, delphinidin, peonidin, petunidin a malvidin (Ghosh D et al., 2007) (Obr. 1).

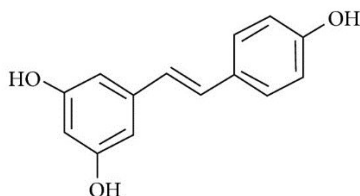
Farmakologické vlastnosti anthokyanidinů mohou ovlivňovat lidský organismus. Kromě toho, že jsou známými antioxidanty, mají také protizánětlivý a antimutagení účinek a působí proti obezitě (Kong et al., 2003; Prior et al., 2006; Kruger et al., 2014). Navíc se ukázalo, že anthokyanidiny ovlivňují aktivitu některých jaderných a steroidních receptorů. Například Jia et al. (2013) popsal kyanidin jako agonistický ligand pro PPAR-alpha receptor (peroxisome proliferator-activated receptor-alpha). Pelargonidin, a v menší míře také kyanidin, aktivují AhR a indukují CYP1A1 (Kameníčková et al., 2013a). Pelargonidin a delphinidin, však inhibuje katalytickou aktivitu CYP1A1 (Kameníčková et al., 2013b). Rovněž bylo prokázáno, že jednotlivé anthokyanidiny mají různý efekt na expresi enzymů fáze II v metabolismu xenobiotik (Dvořák et al., 2014), na transportní systém organických aniontů (OATP) (Riha et al., 2015) a CYP2A6 (Srovnalova et al., 2014).



**Obr. 1: Chemické struktury anthokyanidinů** (Yuan et al., 2012)

## 1.2. Stilbeny

Druhou studovanou skupinou látek jsou hydroxylované a methoxylované deriváty stilbenu, které se rovněž řadí k fenolickým látkám. Hydroxylované deriváty stilbenu, též zvané stilbenoidy, sdílí biosyntetickou dráhu s chalkony, které jsou součástí mnoha významných biomolekul. Nejznámějším stilbenoidem je resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilben), který je produkován některými rostlinami jako fytoalexin, sloužící k obraně proti mikrobiálnímu napadení (Obr. 2). Je známo, že červené víno obsahuje resveratrol, ale vyskytuje se také v jiných bobulovinách a ořeších, stejně jako ostatní stilbeny (Riviere et al., 2012).



**Obr. 2: Chemická struktura resveratrolu (trans-3,4',5-trihydroxystilben)** (Malaguti et al., 2013)

Resveratrol je intenzivně studovaná látka. Bylo zjištěno, že jeho biologická aktivita má široký rozsah: působí proti vysokému krevnímu tlaku (Huang et al., 2013), chrání srdeční soustavu (Yang et al., 2016), má anti-apoptotické (Renaud et al., 2014) a anti-proliferativní

účinky (Cui et al., 2010), což naznačuje, že působí také proti rakovině (Chimento et al., 2016). Resveratrol má také protizánětlivé účinky (Tao et al., 2016) a hraje roli v léčbě diabetu (Oyenihni et al., 2016). Tento pleiotropní biologický efekt znamená, že resveratrol ovlivňuje velké množství buněčných cílů, například: protein kinázu aktivovanou AMP (AMPK) (Wang et al., 2017), jaderný faktor kappa B (Kubota et al., 2009), sirtuiny (SIR), což jsou deacetylázy závislé na  $\text{NAD}^+$  (Howitz et al., 2003), protein kinázy aktivované mitogeny (MAPK) (Yuan et al., 2016), extracelulární kinázy regulované signálem (ERK) (Cao et al. 2016), estrogenový receptor (Gehm et al., 1997) a další (Britton et al., 2015; Kurkaini et al., 2015).

Hojně jsou také studovány deriváty resveratrolu, ať už přírodního nebo syntetického původu. Bylo zjištěno, že methylovaný resveratrol se zvyšuje jeho schopnost anti-proliferativní aktivity. Vlastnosti derivátů resveratrolu se také mění jejich izomerizací (Cardile et al., 2007). Methylovaní hydroxylových skupin v molekule resveratrolu vede ke zlepšení biologické dostupnosti, a tedy i ke zvýšení biologické účinnosti (Walle et al., 2007; Aldawsari et al., 2015).

### **1.3. Farmakologické interakce**

#### **1.3.1. Lékové interakce**

Lékové interakce mohou nastat mezi dvěma a více současně použitými léčivými látkami, které se navzájem ovlivňují a mění tak účinek jednoho z nich. Může dojít buď ke snížení farmakoterapeutického účinku, tzv. antagonismus či kompetice o cílové místo farmakodynamického účinku, nebo může dojít ke zvýšení farmakoterapeutického účinku, tzv. synergismu, kdy se jeden z léků může akumulovat v organismu a působit tak toxicky nebo může jeden lék násobit účinek druhého léku. Léčiva se také mohou ovlivňovat ve vedlejších účincích, včetně těch nežádoucích nebo mohou vznikat nové vedlejší účinky.

Lékové interakce se dají také rozdělit podle převažujících interakčních mechanismů na:

1) farmaceutické interakce, kdy dochází k interakci mezi jednotlivými léčivými látkami v jedné lékové formě (např. v infuzní láhvi), tedy ještě před podáním pacientovi, jedná se spíše o farmaceutickou inkompatibilitu 2) farmakokinetické interakce, u kterých sledujeme, kde při cestě na místo účinku dochází ke vzájemným interakcím, tj. na úrovni absorpce z trávicího systému, biodistribuce, biotransformace či renální exkrece. 3) farmakodynamické interakce, které působí na receptorové úrovni, kdy dochází k interakci mezi léčivými látkami až na cílovém recepčním místě biologického systému, na jehož konci je farmakologický účinek (Květina et al., 2003). Farmakologických interakcí se dotýká i tato studie, interagujícími látkami s léčivými látkami mohou být také látky vyskytující se v běžné stravě, jako jsou anthokyanidiny a stilbeny, kdy dochází k tzv. potravinovým interakcím.



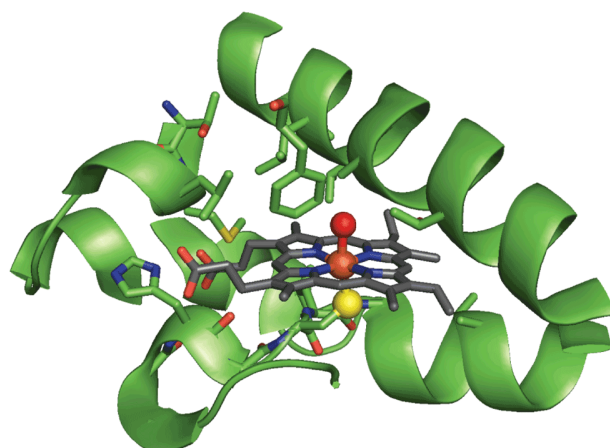
### 1.3.2. Potravinové interakce

K potravinové interakci dochází při konzumaci určité stravy, nápoje či potravinového doplňku, které mění aktivitu enzymů metabolizující léčiva, což vede ke změně farmakokinetiky současně metabolizujících se léčiv (Schulz, 2006). Dodnes již bylo zaznamenáno velké množství těchto potravinových interakcí. Potraviny obsahující komplexní směs fytochemických látek jako je ovoce, zelenina, bylinky, koření a čaje, mají největší potenciál indukovat nebo inhibovat aktivitu enzymů metabolizující léčiva (Foster et al., 2003). Při výzkumu látek, které jsou za tyto interakce zodpovědné, byly nalezeny i takové, které jsou v rostlinné říši zcela běžné a nejsou považovány za toxické, např. flavonoidy a polyfenolické látky (Tsunoda et al., 2001), mezi které patří studované anthokyanidiny a stilbeny. Hlavními enzymy metabolizující léčiva jsou cytochromy P450, které jsou zodpovědné za biotransformační reakce.

### 1.4. Cytochrom P450

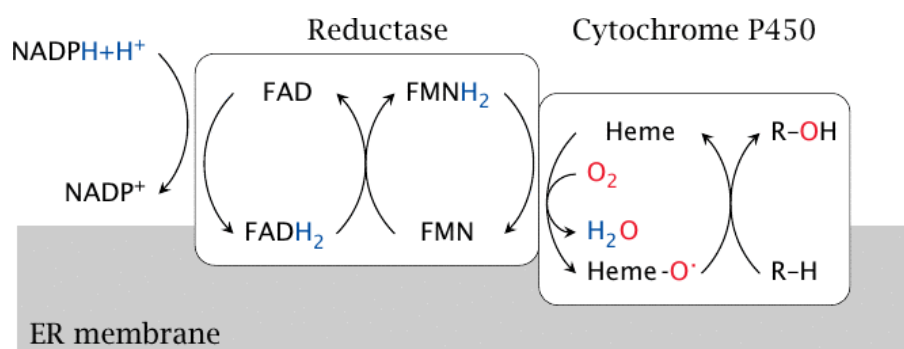
Cytochrom P450 (CYP) představuje velkou skupinou enzymů metabolizující léčiva, ale také endogenní látky jako jsou steroidy, eikosanoidy, vitamíny aj. Vyskytují se u všech eukaryot (rostliny, houby, živočichové) i některých prokaryot. Cytochromy P450 představují hlavní systém enzymů metabolizující cizí látky, který hraje hlavní roli v ochraně organismu proti potenciálně škodlivým látkám z prostředí (polutanty, pesticidy aj.). Regulace cytochromu P450 probíhá na transkripční úrovni. Jaderné a steroidní receptory jsou klíčovými mediátory v kontrole enzymů metabolizující léčiva. Jejich ligandy jsou jak exogenní tak endogenní molekuly, které mohou snižovat či zvyšovat regulaci těchto transkripčních faktorů. Působením léků nebo xenobiotik, které jsou agonisty či antagonisty jaderných receptorů, může dojít k závažné toxicitě, ztrátě terapeutického účinku nebo poruše metabolismu endogenních látek. Skupinu cytochromů P450 kóduje 57 genů a jejich genetický polymorfismus hraje důležitou roli v aktivitě těchto enzymů, na což by měl být dán zřetel při podávání léků. Aktivita cytochromů P450 tedy závisí na genotypu a prostředí. Proto jsou tyto enzymy používány jako biomarkery k určení působení environmentálních látek na člověka nebo k předpovídání náchylnosti k určitým patologiím (Guéguen et al., 2006).

Cytochromy P450 získaly svůj název podle toho, že jejich redukovaná forma v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje výrazné absorpční maximum ve viditelném spektru při 450 nm, tzv. Soretův pík. Jsou také nazývány hem-thiolátové proteiny, jelikož nesou hemovou prosthetickou skupinu, přičemž iont železa je vázán přes cystein do porfyrinového jádra (Werck-Reichhart et al., 2000) (Obr. 3).



**Obr. 3: Struktura cytochromu P450 s typickým vazebným místem hem-thiolátových proteinů (Groves, 2015)**

Tyto enzymy jsou silnými oxidanty, které jsou schopny katalyzovat hydroxylaci vazeb nasycených uhlovodíků, epoxidaci dvojných vazeb, oxidaci heteroatomů, dealkylační reakce, oxidace aromatických sloučenin atd. Prostředníkem oxidace je zde molekulární kyslík, kdy jeden z atomů kyslíku je využit substrátem a druhý je redukován na molekulu vody za využití dvou elektronů, které poskytuje NAD(P)H z cytochrom P450 reduktázy. Tato reakce probíhá na membráně mitochondrií nebo endoplasmatického retikula (ER). Protože zůstává v oxidovaném substrátu pouze jeden z atomů kyslíku z původní molekuly  $O_2$ , jsou cytochromy P450 nazývány monooxygenázy (Obr. 4). Hydrofobní exogenní látky jsou modifikovány a následně vylučovány ve formě rozpustné ve vodě. Tyto dva odlišné kroky jsou popisovány jako fáze I (oxidační krok) a fáze II (konjugační krok), kde oxidační krok zajišťují právě cytochromy P450 a konjugační krok uskutečňují aryl-sulfatázy, UDP-glukuronyl transferázy a glutation S-transferázy (Meunier et al., 2004).



**Obr. 4: Schéma oxidačně-redukční reakce cytochromu P450**

(<http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/DrugMetabolism.html> ke dni 4.6.2019)

Cytochromy P450 tvoří velkou superrodinu enzymů, které můžeme rozdělit do podrodin a rodin podle homologie v sekvenci genů, potažmo aminokyselin. Nomenklatura cytochromu P450 používá označení CYP, za nímž následuje číslo, např. CYP1, které označuje rodinu (více než 40% shoda v aminokyselinové sekvenci) a dále následuje písmeno, které označuje podrodinu, např. CYP1A (více než 55% shoda v aminokyselinové sekvenci) a nakonec označení konkrétního genu opět písmenem, např. CYP1A1 (Nebert et al., 1999). Pro metabolismus léčiv je nejdůležitější polymorfismus v genech kódující CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4/5, které mohou vést k terapeutickému selhání nebo k závažným nežádoucím účinkům. Geny kódující CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 a CYP2E1 jsou zase nejvíce zodpovědné za biotransformaci chemických látek, zejména při metabolické aktivaci pre-karcinogenů (Bozina et al., 2009).

#### **1.4.1. Cytochromy P450 1A (CYP1A)**

Nejvýznamnějšími cytochromy z této podrodiny jsou CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. CYP1A1 se nejvíce nachází v extrahepatických tkáních, zejména epiteliální tkáni. Důležitým rysem tohoto enzymu je schopnost katalyzovat první krok metabolismu polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), obsažených také v tabákovém kouři, což může vést k tvorbě elektrofilních karcinogenních molekul. CYP1A1 také oxiduje xenobiotika (7-ethoxyresorufin, theofylin, 7-ethoxykumarin a chlorzoxazon) a endogenní látky (17 $\beta$ -estradiol a estron) (Shimada, 1997). Polymorfismus CYP1A1 ovlivňuje jak jeho regulaci, tak strukturu. Regulace probíhá vazbou ligandu na jaderný receptor AhR. Tento vysoce afinitní receptor je spojen s vysokou inducibilitou CYP1A1.

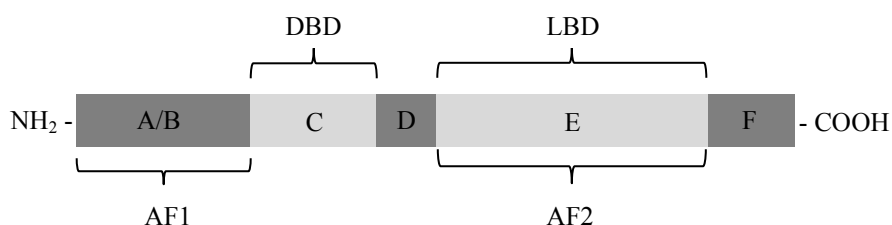
CYP1A2 je exprimován převážně v játrech. Jeho hladina se pohybuje mezi 10-15% z celkového množství cytochromů P450 v játrech dospělého člověka. Úroveň exprese se může mezi jednotlivci lišit až čtyřicetinásobně. CYP1A2 katalyzuje metabolickou aktivaci různých arylů a heterocyklických aminů jako jsou 2-aminantracen a 2-acetylaminofluoren. CYP1A2 katalyzuje aktivaci polycyklických aromatických diolů mnohem pomaleji než CYP1A1 a CYP1B1. CYP1A2 oxiduje další xenobiotika včetně paracetamolu, antipyrinu, lidokainu, fenacetinu, R-warfarinu a kofeinu. CYP1A2 má více než 16 polymorfických alel (Bozina et al., 2009).

## 1.5. Jaderné a steroidní receptory

### 1.5.1. Jaderné receptory

Jaderné receptory jsou jednou z nejčtenějších skupin transkripčních faktorů u živočichů. Regulují rozmanité procesy jako homeostázu, reprodukci, vývoj a metabolismus. Jaderné receptory fungují jako transkripční faktory indukované ligandem a tak poskytují přímé spojení mezi signální molekulou, která kontroluje tyto procesy a transkripční odpovědí. Velké množství receptorů bylo identifikováno přes shodnou sekvenci známého receptoru, ale nejsou známy jejich přirozené ligandy, tyto receptory se nazývají sirotčí. Ligandy jaderných receptorů jsou slibnými farmaceutickými cíli, jelikož jsou to malé molekuly, které jsou snadno modifikovatelné při návrhu léčiv a kontrolují funkce spojené s chorobami jako je rakovina, osteoporóza či diabetes (Robinson-Rechavi et al., 2003).

Všechny jaderné receptory se skládají z pěti až šesti odlišných oblastí a domén, označených A-F od N-koncové po C-koncovou oblast (Obr. 5). Domény jsou rozděleny na základě konzervativnosti sekvencí a jejich funkcí. DNA vazebná doména (oblast C) a ligand vazebná doména (oblast E) jsou vysoce konzervativní domény. Tyto dvě domény jsou nejdůležitější a mohou fungovat i samostatně. N-koncová oblast A/B a oblast D jsou méně konzervativní, to znamená, že zde existují i variabilní sekvence. C-koncová oblast F není přítomná u všech receptorů a její funkce není zcela známá (Germain, 2006).



**Obr. 5: Schéma stavby jaderného receptoru.** DBD: DNA binding domain (DNA vazebná doména), LBD: ligand binding domain (ligand vazebná doména), AF1: ligand independent transactivation domain (doména nezávislá na transaktivaci ligandem), AF2: ligand dependent transactivation domain (doména závislá na transaktivaci ligandem)

Tato práce se zaměřuje hlavně na jaderné receptory: AhR, VDR, RXR, RAR, PXR a TR. **AhR** (aryl hydrokarbonový receptor) je transkripční faktor, který se nachází v inaktivní formě v cytoplazmě v komplexu s chaperonovými proteiny. Po aktivaci ligandem se přemísťuje do jádra, kde tvoří heterodimer s AhR jaderným translokátorem (ARNT). Heterodimer AhR/ARNT se váže na DNA do responzivního elementu pro xenobiotika (XRE) a umožňuje tak transkripci např. CYP1A1 genu (Denison et al., 2002). AhR je zapojen do mnoha buněčných a biologických procesů, včetně regulace buněčného cyklu, reparace DNA, imunitní odpovědi, apoptózy a ochrany proti xenobiotikům (Abel et al., 2010; Esser et al., 2013; Brush et al., 2015;

Dittmann, 2016). Exogenními aktivátory AhR jsou environmentální polutanty jako polycyklické aromatické uhlovodíky, dibenzodioxiny a dibenzofurany; léky jako omeprazol (Quattrochi et al., 1993) ketokonazol a itrakonazol (Korashy et al., 2007); syntetické sloučeniny jako TSU-16 (Matsuoka-Kawano et al., 2010), SP600125 (Dvořák et al., 2008), U0126 (Andrieux et al., 2004) a přírodní sloučeniny jako kurkuma (Rinaldi et al., 2002), berberin (Vrzal et al., 2005), genistein a quercetin (Zhang et al., 2003). Endogenní ligandy AhR jsou indirubin, bilirubin, tryptamin, indolové kyseliny, prostaglandiny a další (Denison et al., 2003; Stejskalová et al., 2011).

**VDR** (receptor vitamínu D) je jaderný transkripční faktor, který zprostředkovává účinek 1,25-dihydroxyvitamínu D<sub>3</sub>, což je hormonálně aktivní forma vitamínu D. Jeho mechanismus účinku spočívá v přímé vazbě na VDR, který se spolu s RXR (retinoid X receptor) v heterodimerním komplexu váže do specifické sekvence DNA (Christakos et al., 2016). Biologický účinek zahrnuje udržení minerální homeostázy tím, že VDR reguluje genovou expresi v cílových tkáních (Lee et al., 2018; Pike et al., 2012). Ačkoliv bylo zjištěno, že mnoho typů buněk a tkání exprimuje VDR a byly navrženy jako cíl 1,25-dihydroxyvitamínu D<sub>3</sub>, endokrinní systém vitamínu D primárně reguluje homeostázu vápníku a fosfátu působením ve střevech, ledvinách, kostech a příštítných tělíscích (Jones et al., 1998).

**RAR** (receptor kyseliny retinové) je ligandem kontrolovaný transkripční faktor, který působí v heterodimeru s **RXR** (retinoidní X receptor) jako regulátor velkého množství fyziologických procesů, od embryonálního vývoje po orgánovou homeostázu. Oba receptory existují v isoformách  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Na buněčné úrovni vykonávají tyto receptory svoji funkci ve vzájemné interakci s dalšími signálními dráhami regulujícími genovou síť, která kontroluje růst, diferenciaci, smrt a přežití buněk. Na molekulární úrovni heterodimery RAR-RAX reagují velice dobře na ligandy RAR. RXR heterodimerizují i s jinými jadernými receptory, viz VDR. Některé z nich se stávají transkripčně aktivní pouze za přítomnosti selektivního ligandu RXR. RAR-RXR heterodimer nereaguje pouze na retinoidy, avšak transkripce je těmito agonisty RAR velmi dobře aktivována (Altucci et al., 2007).

**PXR** (pregnanový X receptor) je jaderný receptor považovaný za hlavní xenobiotický receptor, který reguluje expresi genů kódujících enzymy metabolizující léčiva (cytochrom P450) a transportéry léčiv, které zajišťují eliminaci xenobiotik a endotoxinů v těle (Oladimeji & Chen, 2018). PXR tedy působí jako takový senzor xenobiotik vyvinutý k rozpoznávání a vazbě širokého spektra strukturně různých ligandů, a to díky svému velkému a flexibilnímu vazebnému místu (Watkins et al., 2001). Bylo však zjištěno, že PXR hraje také roli i při buněčné odpovědi na zánět, proliferaci a migraci buněk. PXR přispívá k dysregulaci těchto procesů u patologických stavů (Oladimeji & Chen, 2018).

**TR** (thyroidní receptor) je hormonem aktivovatelný transkripční faktor, který zprostředkovává účinky hormonů štítné žlázy a je kodován geny thyroidního receptoru alfa

(*TR $\alpha$* ) a thyroïdního receptoru beta (*TR $\beta$* ). Hlavní isoformy thyroïdního receptotu jsou *TR $\alpha$ 1*, *TR $\beta$ 1* a *TR $\beta$ 2*, které jsou převážně zodpovědné za účinek triiodothyroninu (T3), který je rozhodující pro normální vývoj, růst a metabolismus. Vazba T3 na TR může vést buď ke snížení, nebo zvýšení transkripční rychlosti cílových genů. Thyroïdní receptor však může být také aktivní nezávisle na vazbě ligandu, takže transkripční rychlost cílových genů pak není závislá na tom, zda je či není T3 vázán na receptor (Ortiga-Carvalho et al., 2014).

### 1.5.2. Steroidní receptory

Steroidní receptory zprostředkovávají mnoho zásadních biologických procesů a jsou považovány za transkripční faktory působící v jádře. Podle klasického modelu signalizace steroidních receptorů vstupují steroidy do buňky přes plasmatickou membránu a váží se na své receptory lokalizované buď v cytoplazmě, např. androgenový receptor (AR), glukokortikoidní receptor (GR), nebo v jádře např. estrogenový receptor (ER). Poté jsou aktivované receptory translokovány do jádra, kde nasedají na specifickou jadernou DNA do svého responzivního elementu a regulují transkripci cílových genů. Popřípadě mohou steroidní receptory regulovat transkripci tak, že interagují s koregulátory nebo jinými transkripčními faktory, které se váží na DNA. Ukázalo se však, že většina steroidních receptorů se vyskytuje v extracelulárním prostoru a plasmatické membráně, což vysvětluje rychlou reakci steroidů v mnoha orgánech, která nemůže být zprostředkována pomalou genovou regulací. Steroidní ligandy rychle aktivují signály, které ovlivňují různé aspekty buněčné biologie (Levin & Hammes, 2016). Tato práce se zaměřuje hlavně na steroidní receptory: PR, ER, AR a GR.

**PR** (progesteronový receptor) je transkripční faktor exprimovaný hlavně v reprodukční tkáni žen a v centrálním nervovém systému. Jeho ligandem je steroidní hormon progesteron a odpovědí jeho vazby na PR je regulace exprese genů, které kontrolují vývoj, diferenciaci a proliferaci cílové tkáně během reprodukčního cyklu a těhotenství. PR reguluje také patologické procesy při rakovině endokrinního systému. Variabilita biologických účinků progesteronu je závislá na faktorech jako jsou tkáňový a buněčný typ a dostupnost koregulátorů interagujících s PR v závislosti na vývojovém stádiu. Účinek progesteronu je také ovlivněn dostupností cílových genů v chromatinové oblasti pro interakci s PR a také dostupností protein-signální dráhy specifické pro buněčný typ, která buď aktivuje, nebo deaktivuje účinky PR (Grimm et al., 2016).

**ER** (estrogenový receptor) existuje ve dvou subtypech ER $\alpha$  a ER $\beta$ , přičemž se jejich hladina liší podle typu tkáně. ER je intracelulární protein fungující jako transkripční faktor aktivovaný ligandem, estrogenem (Katzenellenbogen et al., 2000). Vazba tohoto agonisty vede ke konformačním změnám, které umožňují vazbu koaktivátorů a následnou vazbu receptoru do

DNA (Skowron et al., 2019). Estrogeny mají výrazný vliv na růst, diferenciaci a fungování mnoha reprodukčních tkání. Ovlivňují však činnost i kostní a jaterní tkáně, kardiovaskulárního systému a mozku (Katzenellenbogen et al., 2000).

**AR** (androgenový receptor) zprostředkovává účinek androgenů jako je testosteron a dihydrotestosteron, což jsou mužské pohlavní hormony zodpovědné za vývoj mužského reprodukčního systému a sekundárních pohlavních znaků. AR působí jako transkripční faktor, závislý na ligandu. Vzhledem k jeho rozsáhlé expresi v mnoha tkáních a buňkách, má také široký rozsah biologických účinků včetně důležité role při vývoji a chodu reprodukčního, pohybového, kardiovaskulárního, imunitního a hemopoetického systému. AR signalizace může být také zahrnuta do vývoje nádorů prostaty, močového měchýře, jater, ledvin a plic. Androgeny mohou působit přes AR buď vazbou na DNA a regulovat transkripci cílového genu, nebo způsobem bez vazby na DNA k inicializaci rychlých buněčných pochodů jako je fosforylace druhého posla v signalizační kaskádě. Navíc bylo nedávno zjištěno, že AR může být aktivní nezávisle na ligandu (Davey et al., 2016).

**GR** (glukokortikoidní receptor) je intracelulární protein přítomný téměř ve všech typech lidských buněk. Působí primárně jako transkripční faktor závislý na ligandu a pozitivně i negativně reguluje expresi cílových genů. V nepřítomnosti ligandu se GR nachází v cytosolu v komplexu s chaperonovými proteiny včetně heat shock proteinů. Po vazbě ligandu, komplex chaperonů disociuje a odhalí tak sekvenci jaderné lokalizace, což napomáhá translokaci do jádra. Tam se GR váže jako homodimer do glukokortikoidního responzivního elementu (GRE) v promotorové oblasti cílového genu a zajišťuje tak jeho aktivaci nebo potlačení v závislosti na GRE sekvenci a kontextu promotoru (Nicolaidis et al., 2010; Ratman et al., 2013; Gulliver, 2017). Přírodními ligandy jsou glukokortikoidy, což jsou lipofilní steroidní hormony odvozené od cholesterolu, produkované nadledvinkami. Endogenně produkované glukokortikoidy jsou kortison, kortisol a kortikosteron. Hladiny hormonů se mění v průběhu cirkadiálního rytmu (Biddie et al., 2012). Endogenní glukokortikoidy se také mohou vázat na mineralokortikoidní receptor (MR) a mineralokortikoidy (aldosteron) zase na GR (Farmana & Rafestin-Oblin, 2001). GR je také aktivován širokým rozsahem nedávno objevených nesteroidních agonistů (De Bosscher, 2010).

## 1.6. Interakce mezi stilbenoidy a AhR-CYP1A signální dráhou

Existuje velké množství důkazu o interakci mezi stilbenoidy a AhR-CYP1A signální dráhou. Mnoho stilbenoidů včetně resvetarolu (Potter et al., 2002), trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbenu (D) (Mikstacka et al., 2012), 2,3',4,5' tetramethoxystilbenu (E) (Chun et al., 2001), pterostilbenu a pinostilbenu (Mikstacka et al., 2007) bylo popsáno jako substráty a inhibitory enzymů CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Resveratrol mění transkripční aktivitu AhR mnohočetnými mechanismy. Například byl proveden experiment, kde byla vyvolána exprese CYP1A1 v jaterních nádorových buňkách HepG2 pomocí modelového agonisty AhR (dioxinu) a následně byla resveratrolem inhibována. Resveratrol neovlivňoval vazbu dioxinu na AhR, avšak blokoval transformaci AhR do jeho DNA vazebné formy (Ciolino et al., 1998). Casper et al. (1999) popsali resveratrol jako kompetitivního antagonistu dioxinu a dalších ligandů AhR v HepG2 a T47D buňkách. Aktivovaný AhR se sice přemístil do jádra a vázal se do responzivního elementu, avšak následně již nedošlo k transaktivaci (aktivaci transkripce genu). Později bylo ukázáno, že resveratrol inhibuje geny CYP1A indukované dioxinem, a to přímým nebo nepřímým zamezením přísunu AhR a ARNT k responzivnímu elementu těchto genů (Beedanagari et al., 2009). Lee & Safe et al. (2001) navrhli, že resveratrol snižuje transkripci CYP1A1 v T47D a MCF7 buňkách díky post-transkripčnímu mechanismu nezávislém na AhR. Mechanismus nepřímé aktivace AhR resveratrolem je vysvětlován inhibicí metabolické přeměny FICZ (6-formylindolo(3,2-b)karbazol), což je endogenní ligand AhR (Mohammadi-Bardbori et al., 2012). Gouedard et al. (2004) pozorovali, že resveratrol indukuje AhR-dependetní gen paraoxogenázy v HuH7 hepatocytech. Tento jev vysvětlují agonistickým účinkem resveratrolu, který je specifický pro gen paraoxogenázy, ne však pro klasický AhR responsivní element. Naproti tomu Aluru & Vijayan (2006) popisují resveratrol jako efektivního antagonistu AhR, avšak v malých dávkách také induktora CYP1A1 v hepatocytech pstruha duhového, což naznačuje projev parciálního agonisty. Účinek resveratrolu jako parciálního agonisty byl také potvrzen v lidských hepatocytech a HepG2 buňkách (Dvořák et al., 2008). Obecně bylo prokázáno, že mnoho přírodních i syntetických stilbenoidů inhibuje nebo aktivuje AhR signální dráhu (Licznarska et al., 2016; de Medina et al., 2005; Guyot et al., 2012).



## **2. Souhrn výsledků**

### **2.1. Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu jaderných a steroidních receptorů**

Tato část práce se zabývá hodnocením nejběžnějších anthokyanidinů: kyanidinu, delfinidinu, malvidinu, pelargonidinu a peonidinu na transkripční aktivitu jaderných a steroidních receptorů. Z jaderných receptorů byly testovány: VDR, RXR, RAR, PXR a TR. Steroidní receptory byly zastoupeny těmito receptory: PR, ER, AR a GR. Transkripční aktivita receptorů byla zjišťována pomocí tranzientně nebo stabilně transfekovaných buněčných liniích s luciferázovým reportérovým genem (gene reporter assay). Anthokyanidiny byly testovány se vzrůstajícím rozsahem koncentrací (10 nM - 50 μM). Těmto testům předcházely testy cytotoxicity v daných buněčných liniích ve stejném koncentračním rozsahu.

#### **2.1.1. Cytotoxicita anthokyanidinů v lidských buněčných kulturách**

Cytotoxicita anthokyanidinů byla testována na buněčných liniích HEK293 (embrionální buňky ledvin), HeLa (buňky nádoru děložního hrdla), HepG2 (hepatoblastomové buňky), LS180 (buňky adenokarcinomu tlustého střeva), MCF-7 (buňky nádoru prsu) a 22Rv1 (buňky karcinomu prostaty). Nejprve byly buňky vysety na 96-jamkové kultivační desky v různé hustotě v závislosti na dané buněčné linii. Po 16h stabilizaci byly k buňkám aplikovány testované látky se vzrůstajícím rozsahem koncentrací (10 nM - 50 μM), jako negativní kontrola byl použit 0,1% dimethylsulfoxid (DMSO), v němž byly látky rozpuštěny a pozitivní kontrolu představoval detergent Triton X-100. Následně byly buňky inkubovány 24 h při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Pro zjištění viability buněk byl použit konvenční MTT test, založený na tvorbě fialového formazánu v přeživších buňkách po přidání žluté tetrazoliové soli (MTT). Intenzita zbarvení odpovídá míře viability a je měřena spektrofotometricky při 540 nm.

Ukázalo se, že ani jedna testovaná látka nejeví cytotoxický efekt v daném rozsahu koncentrací vůči žádné použité buněčné linii (Obr. 6 a 7).

#### **2.1.2. Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu jaderných receptorů VDR, RXR, RAR, PXR a TR v lidských buněčných kulturách**

Transkripční aktivita thyroïdního receptoru (TR) byla stanovována pomocí stabilně transfekované reportérové linie PZ-TR (HepG2). Transkripční aktivita všech ostatních zkoumaných jaderných receptorů byla hodnocena pomocí transientně transfekovaných

buněčných linií. Plasmidy receptoru vitamínu D (VDR), retinoidního X receptoru (RXR), receptoru kyseliny retinové (RAR) a pregnanového X receptoru (PXR) byly transfekovány do buněčných linií: LS180-VDR, HEK293-RXR, HEK293-RAR, LS180-PXR.

Experimenty v agonistickém módu byly provedeny tak, že k buněčným liniím byly aplikovány testované látky (kyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin a peonidin) v koncentračním rozsahu od 10 nM do 50  $\mu$ M a inkubovány 24 h. Pozitivní kontrola byla reprezentována modelovými agonisty: VD3 (1,25-dihydroxyvitamín D3) pro VDR, cisRA (kyselina 9-cis retinová) pro RXR, transRA (kyselina all-trans retinová) pro RAR, RIF (rifampicin) pro PXR a T3 (3,3,5-trijodo-L-thyronin) pro TR. Jako negativní kontrola bylo použito rozpouštědlo 0,1% DMSO. Po aplikaci modelových agonistů k buněčným liniím došlo k následujícím indukčním luciferázové aktivity, vyjádřeno jako násobek v porovnání s negativní kontrolou: LS180-VDR (50nM VD3) – 187,4 $\times$ , HEK293-RXR (1 $\mu$ M cisRA) – 18,2 $\times$ , HEK293-RAR (5 $\mu$ M transRA) – 49,9 $\times$ , LS180-PXR (10nM RIF) – 10,4 $\times$ , a PZ-TR (10nM T3) – 3,7 $\times$ . V případě testovaných anthokyanidinů nebylo pozorováno žádné významné zvýšení luciferázové aktivity s výjimkou LS180-PXR buněk po aplikaci kyanidinu o koncentraci 25  $\mu$ M, kdy luciferázová aktivita vzrostla trojnásobně. Mírné zvýšení luciferázové aktivity bylo zaznamenáno také u buněk LS180-VDR po aplikaci peonidinu o koncentraci 50  $\mu$ M a to s 2,3 násobnou indukcí. Avšak v porovnání s modelovými antagonisty nejsou indukce anthokyanidinů významně relevantní (Obr. 6).

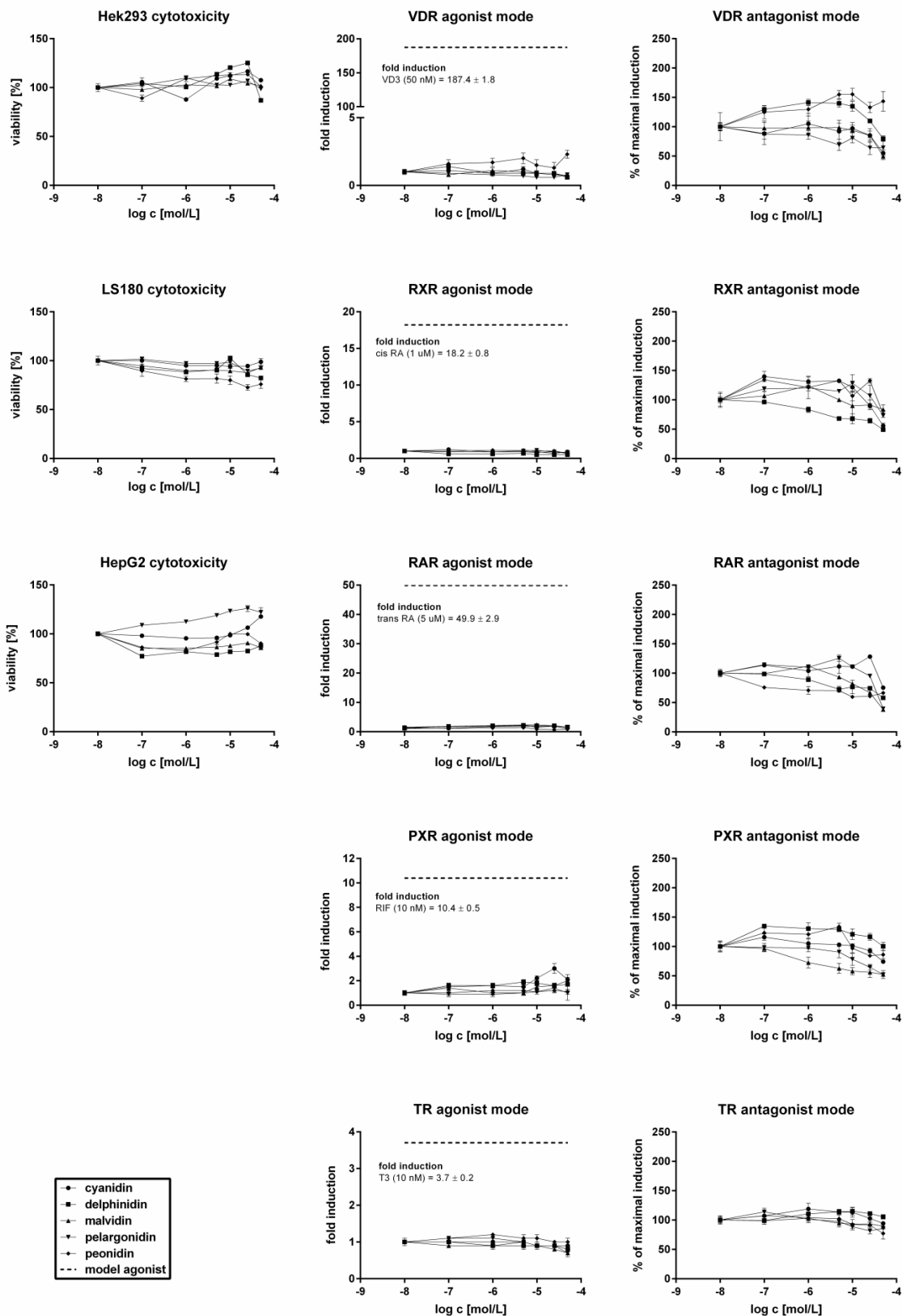
Paralelně byly provedeny experimenty v antagonistickém módu. Buněčné linie byly inkubovány 24 h s anthokyanidiny v koncentračním rozsahu od 10 nM do 50  $\mu$ M v kombinaci s jejich modelovými agonisty (VD3, cisRA, transRA, RIF a T3) ve stejné koncentraci jako v agonistickém módu. Obecně můžeme říci, že byla pozorována mírná inhibice luciferázové aktivity způsobená testovanými látkami u všech studovaných buněčných linií. Indukce luciferázové aktivity klesala s rostoucí koncentrací anthokyanidinů. Největší pokles u buněčné linie LS180-VDR byl zaznamenán v případě 50 $\mu$ M malvidinu na 49,4 % maximální možné indukce způsobené modelovým agonistou VD3 (50 nM). Podobně inhiboval luciferázovou aktivitu 50 $\mu$ M delfinidin v buněčné linii HEK293-RXR na 49,3 % luciferázové aktivity indukované modelovým agonistou cisRA (1  $\mu$ M). Mírný pokles luciferázové aktivity způsobil 50 $\mu$ M malvidin a 50 $\mu$ M pelargonidin v buněčné linii LS180-PXR, kde oba anthokyanidiny způsobily 52% pokles maximální indukce luciferázové aktivity indukované RIF (10 nM). Zatímco v buněčné linii HEK293-RAR způsobil 50 $\mu$ M malvidin 38% pokles a 50 $\mu$ M pelargonidin 39,4% maximální indukce způsobené modelovým agonistou transRA (5  $\mu$ M). Nejméně inhibovaly luciferázovou aktivitu testované látky v buněčné linii PZ-TR. Hodnoty se pohybovaly od 77,2% (50  $\mu$ M malvidin) po 118% (1  $\mu$ M kyanidin) maximální indukce způsobené T3 (10 nM) (Obr. 6).

### 2.1.3. Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu steroidních receptorů PR, ER, AR a GR v lidských buněčných kulturách

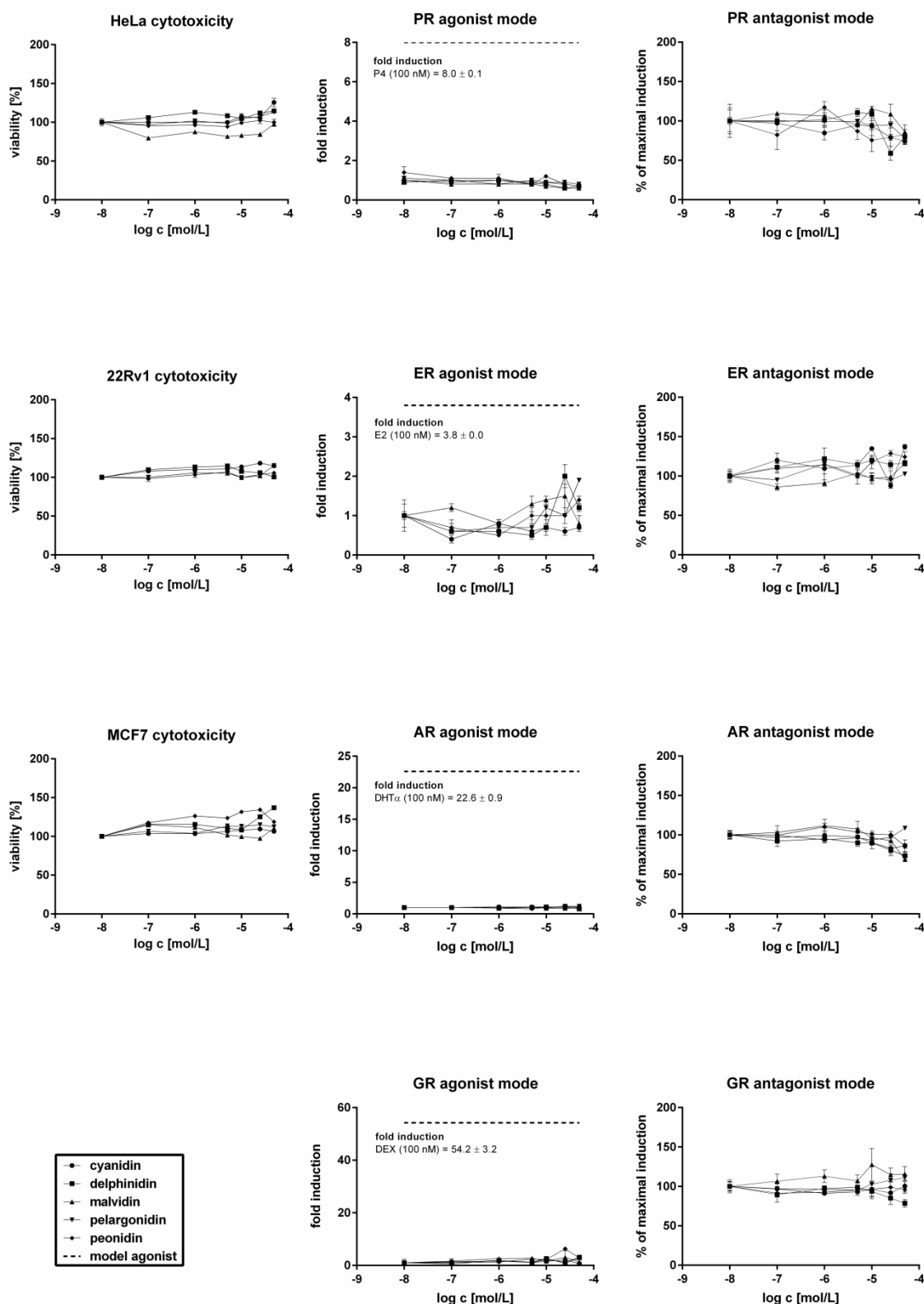
Transkripční aktivita glukokortikoidního receptoru (GR) a androgenového receptoru (AR) byla hodnocena ve stabilně transfekovaných reportérových liniích AZ-GR (HeLa) a AIZ-AR (22Rv1). Tranzientně transfekované linie MCF-7-ER a 22Rv1-PR byly použity pro posouzení transkripční aktivity estrogenového receptoru (ER) a progesteronového receptoru (PR).

Experimenty v agonistickém módu byly provedeny stejně jako u jaderných receptorů. K buněčným liniím byly aplikovány testované látky (kyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, a peonidin) v koncentračním rozsahu od 10 nM do 50  $\mu$ M a inkubovány 24 h. Jako modelový agonista byl pro PR použit progesteron (P4), pro ER 17 $\beta$ -estradiol (E2), pro AR 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (DHT) a pro GR dexametazon (DEX). Negativní kontrolu představovalo opět rozpouštědlo 0,1% DMSO. Indukce luciferázové aktivity v buněčné linii 22Rv1-PR po aplikaci P4 (100 nM) dosahovala osminásobku negativní kontroly, avšak žádný z testovaných anthokyanidinů nezpůsobil významnější indukci luciferázové aktivity. Po inkubaci buněčné linie MCF-7-ER s modelovým agonistou E2 (100 nM) vzrostla indukce 3,8 násobně. Testované látky způsobovaly jen mírné změny v luciferázové aktivitě, různě u všech anthokyanidinů od 0,4 násobku indukce (100 nM kyanidin) po dvojnásobek indukce (25  $\mu$ M delfinidin). Žádná významná indukce luciferázové aktivity nebyla pozorována ani v buněčné linii AIZ-AR v porovnání s modelovým agonistou DHT (100 nM), který indukoval luciferázovou aktivitu 22,6 násobně. Nakonec ani buněčná linie AZ-GR po aplikaci testovaných anthokyanidinů nevykazovala žádné změny v indukci luciferázové aktivity, zatímco modelový agonista DEX (100 nM) způsobil 54,2 násobnou indukci (Obr. 7).

Experimenty byly provedeny také v antagonistickém módu stejně jako u jaderných receptorů. Buněčné linie byly inkubovány 24 h s anthokyanidiny v koncentračním rozsahu od 10 nM do 50  $\mu$ M v kombinaci s jejich modelovými agonisty (P4, E2, DHT a DEX). Buněčná linie 22Rv1-PR po aplikaci anthokyanidinů projevovala mírné změny luciferázové aktivity indukované P4 (100 nM) v rozmezí od 58,9 % (25  $\mu$ M delfinidin) do 117,2 % (1  $\mu$ M peonidin). U buněčné linie MCF-7-ER nebyly pozorovány výrazné změny indukce luciferázové aktivity u žádné testované látky. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 86 % (10  $\mu$ M malvidin) do 137 % (50  $\mu$ M kyanidin) maximální indukce způsobené E2 (100 nM). Indukce luciferázové aktivity v buněčné linii AIZ-AR byla mírně snižována se vzrůstající koncentrací testovaných anthokyanidinů a to na nejnižší hodnotu 68,9 % (50  $\mu$ M malvidin) vztáženou ke 100 nM DHT. Nejvyšší hodnota luciferázové aktivity v této linii byla naměřena po aplikaci 1  $\mu$ M malvidinu (111,8 %). Podobně také velmi nepatrné změny v luciferázové aktivitě byly zaznamenány při testování anthokyanidinů v buněčné linii AZ-GR. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 78,6 % (50  $\mu$ M delfinidin) do 127,6 % (10  $\mu$ M malvidin) maximální luciferázové indukce, dosažené DEX (100 nM) (Obr. 7).



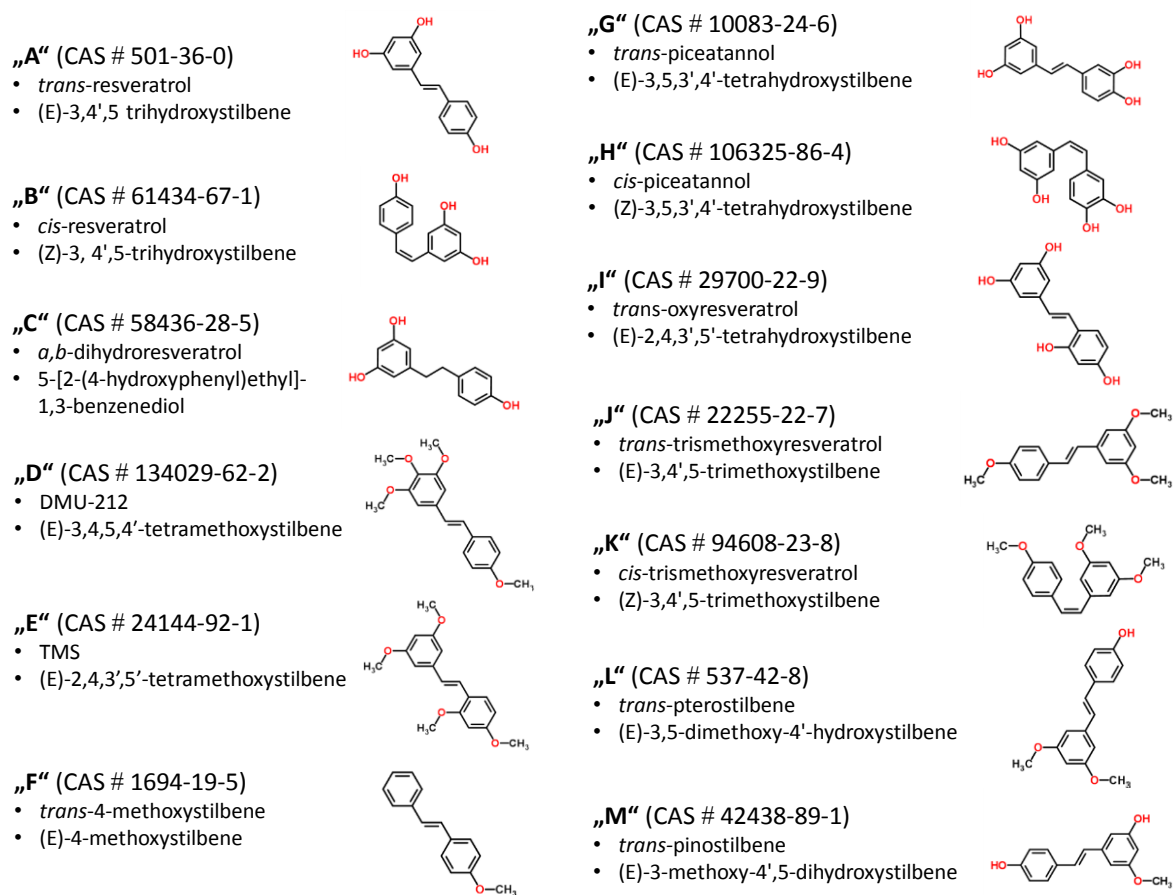
**Obr. 6:** Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu jaderných receptorů. Čárové grafy v levém sloupci ukazují cytotoxicitu anthokyanidinů na buněčných liniích Hek293, LS180 a HepG2. Prostřední sloupec představuje luciferázou aktivitu těchto buněk transfekovaných reportérovým plazmidem pro receptor vitamínu D (VDR), retinoidní receptor X (RXR), receptor kyseliny retinové (RAR), pregnanový receptor X (PXR) a thyroideální receptor (TR) v agonistickém módu a pravý sloupec představuje antagonistický mód. Data reprezentují průměrnou hodnotu  $\pm$  SD měření v triplicátech a jsou vyjádřeny buď jako procenta viability (cytotoxicita), nebo jako násobek indukce (fold induction) v porovnání s negativní kontrolou DMSO (agonistický mód), nebo jako procenta maximální indukce způsobené modelovým agonistou (antagonistický mód).



**Obr. 7:** Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu steroidních receptorů. Čárové grafy v levém sloupci ukazují cytotoxicitu anthokyanidinů na buněčných liniích HeLa, 22Rv1 a MCF-7. Prostřední sloupec představuje luciferázou aktivitu těchto buněk transfekovaných reportérovým plazmidem pro progesteronový (PR), estrogenový (ER), androgení (AR) a glukokortikoidní receptor (GR) v agonistickém módu a pravý sloupec představuje antagonistický mód. Data reprezentují průměrnou hodnotu  $\pm$  SD měření v triplicátech a jsou vyjádřeny buď jako procenta viability (cytotoxicita), nebo jako násobek indukce (fold induction) v porovnání s negativní kontrolou DMSO (agonistický mód), nebo jako procenta maximální indukce způsobené modelovým agonistou (antagonistický mód).

## 2.2. Vliv hydroxystilbenů a methoxystilbenů na aktivitu AhR a indukci CYP1A genů v jaterních nádorových buňkách a primárních lidských hepatocytech

Tato část studie se zabývá hodnocením účinku třinácti různých hydroxystilbenů a methoxystilbenů, včetně jejich *cis/trans* izomerů A-M (Obr. 8) na transkripční aktivitu aryl hydrokarbonového receptoru (AhR) a expresi genu cytochromu P450, podrodiny CYP1A jak v jaterních nádorových buňkách HepG2, tak v primárních lidských hepatocytech. K výzkumu byla využita stabilně transfekovaná buněčná linie (HepG2) s reportérovým genem pro AhR (AZ-AhR) a také metody jako qRT-PCR, Simple Western blotting pomocí přístroje Sally Sue™ a test posunu elektroforetické mobility (electrophoretic mobility shift assay - EMSA).



Obr. 8: Chemické struktury, číslo CAS, triviální a strukturální názvy derivátů stilbenu.

### 2.2.1. Vliv derivátů stilbenu na transkripční aktivitu AhR

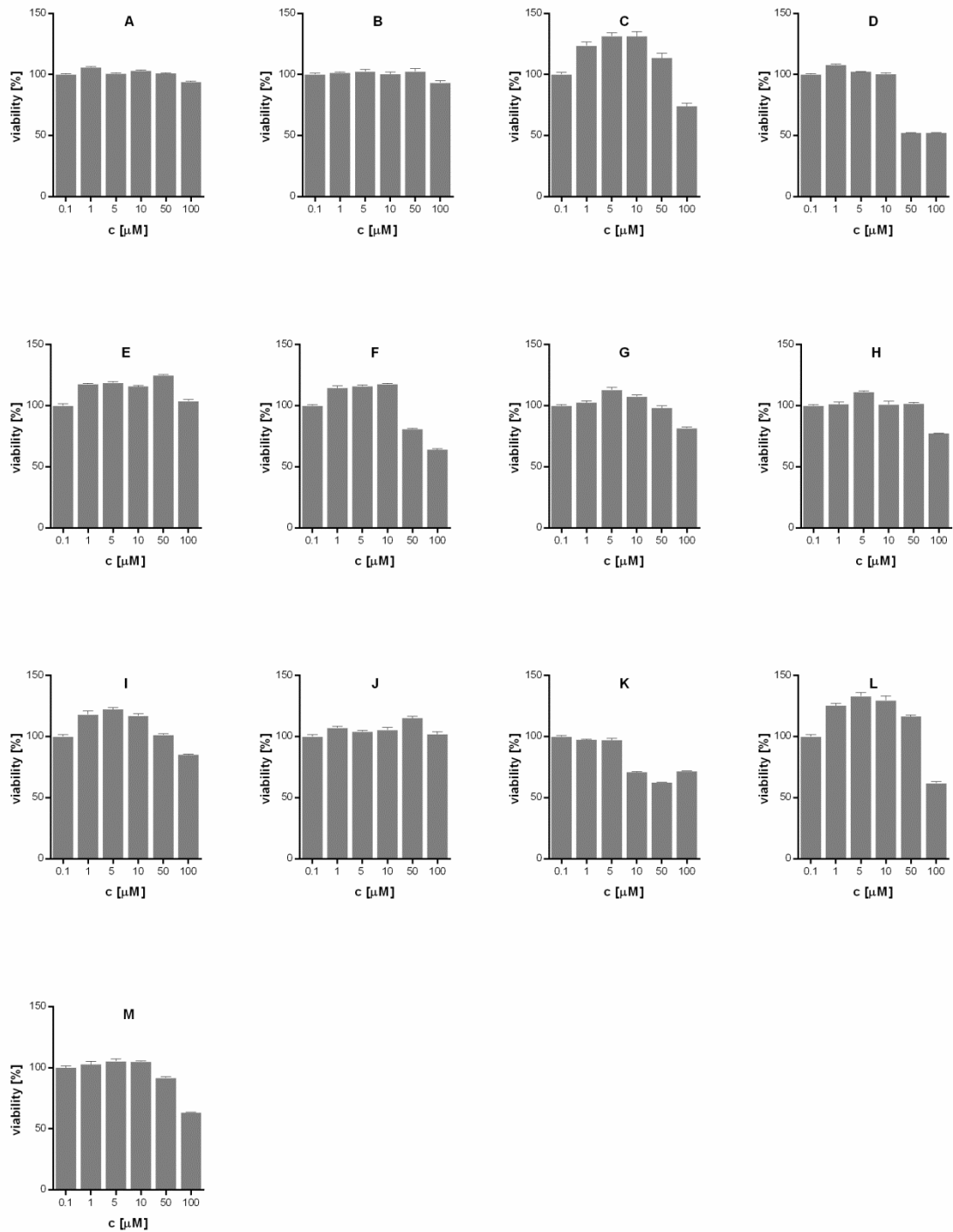
Nejprve byly provedeny konvenční MTT testy pro stanovení cytotoxicity derivátů stilbenů na buněčnou linii AZ-AhR, která je odvozena od HepG2 buněk. AZ-AhR buňky byly inkubovány 24 h s testovanými látkami (A-M) v koncentračním rozsahu 10 nM až 100  $\mu$ M, negativní kontrolou (0,1% DMSO) a pozitivní kontrolou (Triton X-100). Na základě těchto dat byla pro další *in vitro* experimenty použita nejvyšší koncentrace testovaných látek 50  $\mu$ M (Obr. 9).

Vliv derivátů stilbenů na transkripční aktivitu AhR byl testován na stabilně transfekované buněčné linii s reportérovým genem pro AhR (AZ-AhR). V tomto případě byly buňky inkubovány 24 h s testovanými látkami v koncentračním rozsahu 10 nM až 50  $\mu$ M za absence (agonistický mód) a v přítomnosti (antagonistický mód) modelového agonisty TCDD (2,3,7,8-tetrachlordibenzo-dioxin) o koncentraci 5 nM. Průměrná indukce luciferázové aktivity způsobená 5nM TCDD byla naměřena jako 1953 násobek indukce vztažené k negativní kontrole (0,1% DMSO). Všechny testované deriváty stilbenu určitým způsobem aktivovaly AhR, avšak jejich potence, tedy schopnost látky vyvolat měřitelnou funkční změnu ( $EC_{50}$ ), účinnost, tedy míra tvorby komplexu ligand-receptor (násobek indukce) a profil závislosti koncentrace a účinku se podstatně lišili (Obr. 10).

Podle velikosti indukce testovaných látek o koncentraci 50  $\mu$ M můžeme látky rozdělit do tří skupin podle porovnatelné účinnosti (aktivity): silně aktivující (násobek indukce > 100; D, G, H, J, M) středně aktivující (násobek indukce 10-100; A, B, I, K) a slabě aktivující (násobek indukce < 10; C, E, F, L). Hodnota poloviny maximální účinné koncentrace ( $EC_{50}$ ) se pohybovala v rozmezí od 3,4  $\mu$ M do 28  $\mu$ M. Obecně lze říci, že zde dochází k inverzní korelaci mezi potencí a účinností, což je běžné pro parciální agonisty, kteří nevyvolávají maximální odezvu ani při obsazenosti všech receptorů. Většina testovaných stilbenů způsobovala se vzrůstající koncentrací vyšší aktivaci AhR. Při koncentraci 50  $\mu$ M dosáhly plató látky B, F, I, K, L nebo zůstaly rostoucí látky A, D, G, H. Testovaná látka E aktivovala AhR pouze při koncentraci 5  $\mu$ M (25 $\times$ ) a látka C aktivovala AhR pouze zanedbatelně (2 $\times$ ).

V antagonistickém módu, kde byly látky inkubovány společně s modelovým agonistou TCDD, inhibovaly AhR všechny testované deriváty stilbenu (Obr. 11). Hodnota poloviny maximální inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) se pohybovala v rozmezí od 1  $\mu$ M do 25  $\mu$ M. Jednotlivé testované látky tvořily různé profily závislosti koncentrace a účinku: sigmoidní profil (A, B, C, F, H, J, K, L, M), profil obráceného písmena U (I, K) nebo atypické profily (D,G,E) odhalující jak agonistický, tak antagonistický účinek testovaných látek.

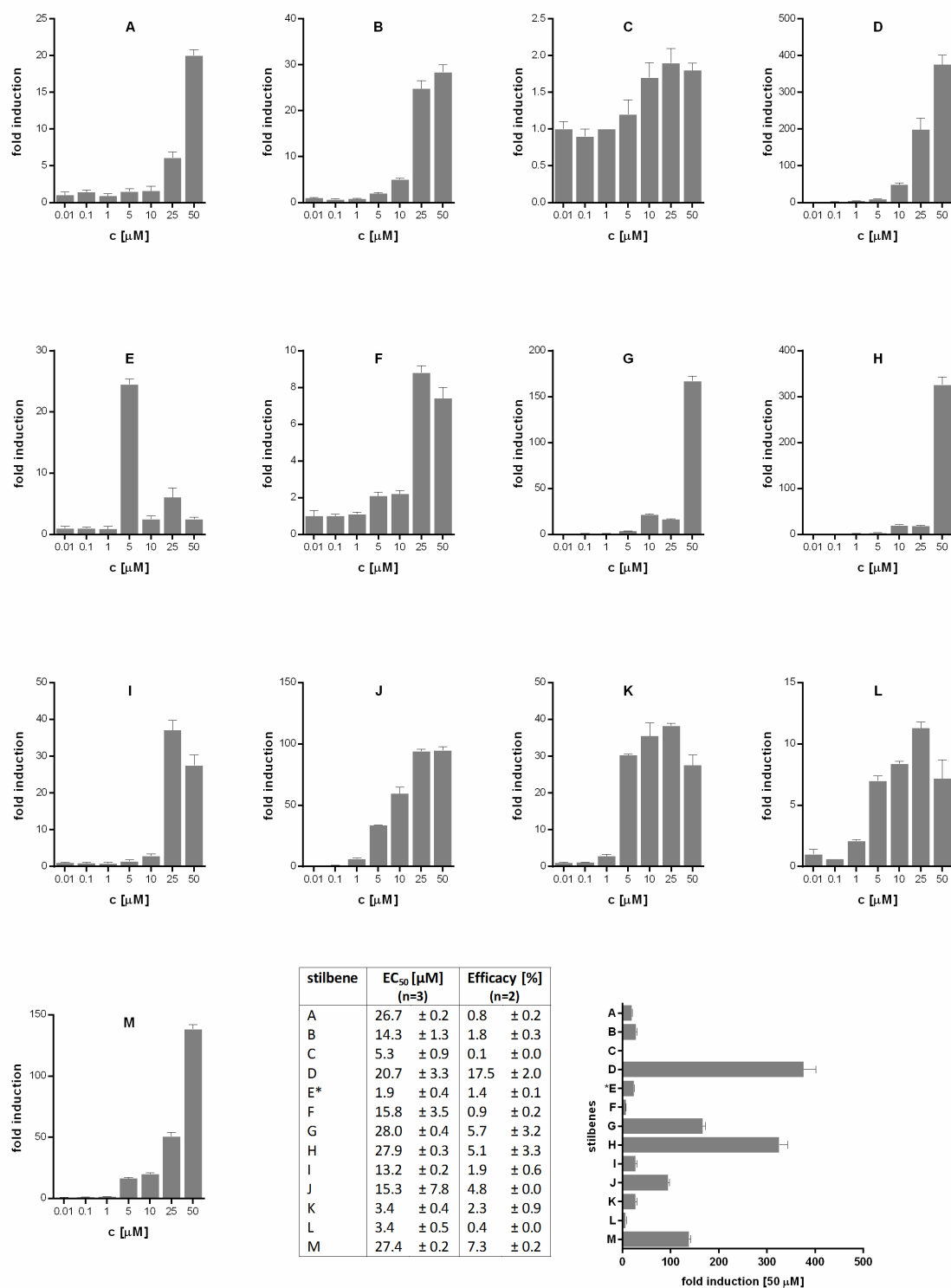
## Cytotoxicity in AZ- AhR



**Obr. 9:** Cytotoxicita derivátů stilbenu (A-M) na buněčnou linii AZ-AhR. Viabilita buněk byla zjištěna pomocí MTT testu, kde byla měřena absorbance při 540 nm. Data jsou vyjádřena jako procenta viability vztažená ke kontrolním buňkám a představují průměrnou hodnotu  $\pm$  SD reprezentativních experimentů.

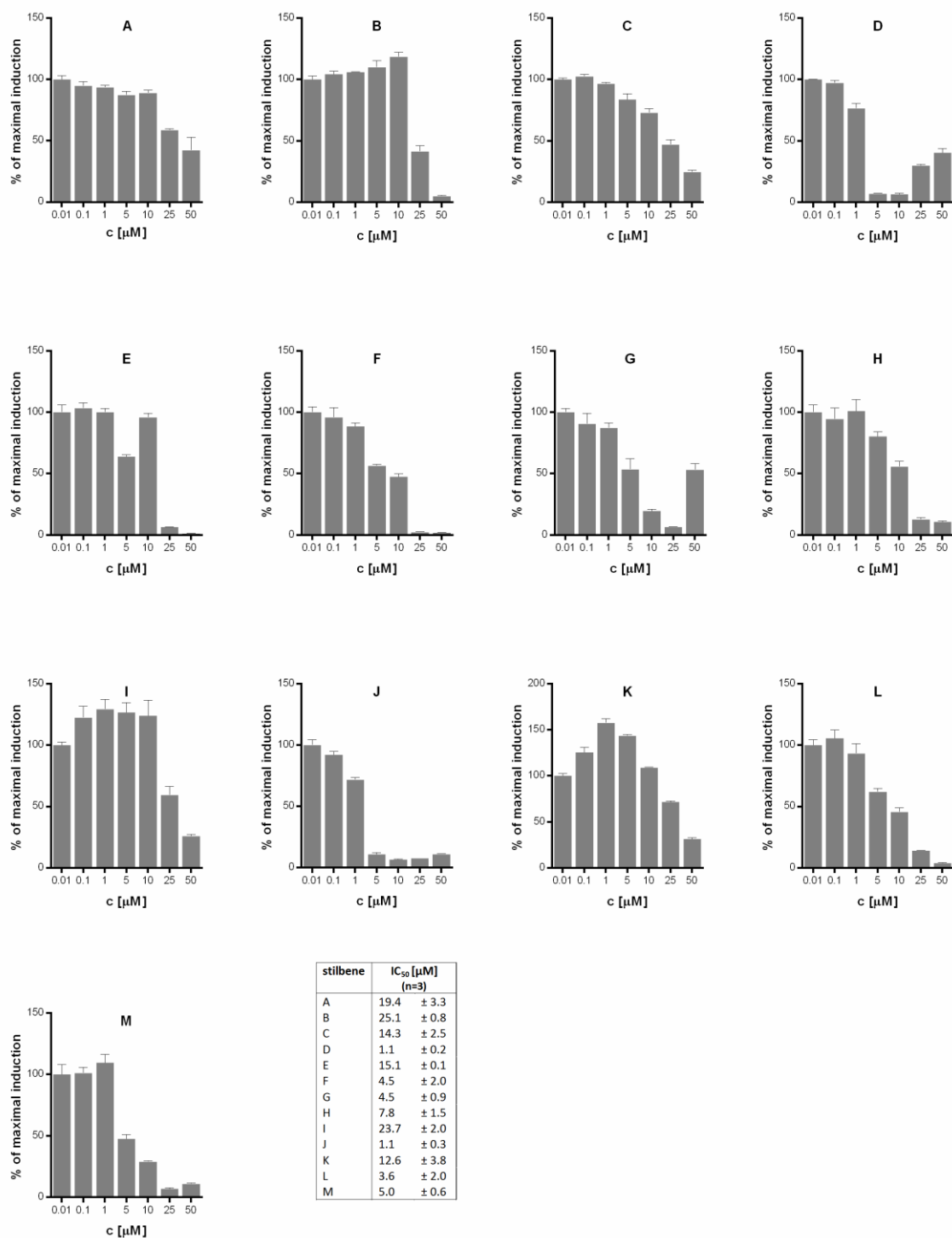


## Activation of AhR in AZ-AhR



**Obr. 10: Vliv derivátů stilbenů (A-M) na transkripční aktivitu AhR - agonistický mód.** Data jsou vyjádřeny jako násobek indukce luciferázové aktivity (fold induction) vztahený k negativní kontrole (DMSO) a představují průměrnou hodnotu ± SD reprezentativních experimentů. Ve vložené tabulce je prezentována hodnota poloviny maximální účinné koncentrace (EC<sub>50</sub>), vypočítaná ze tří nezávislých buněčných pasáží a účinnost látek v procentech. Horizontální sloupcový graf porovnává účinnost testovaných látek při 50 μM koncentraci.

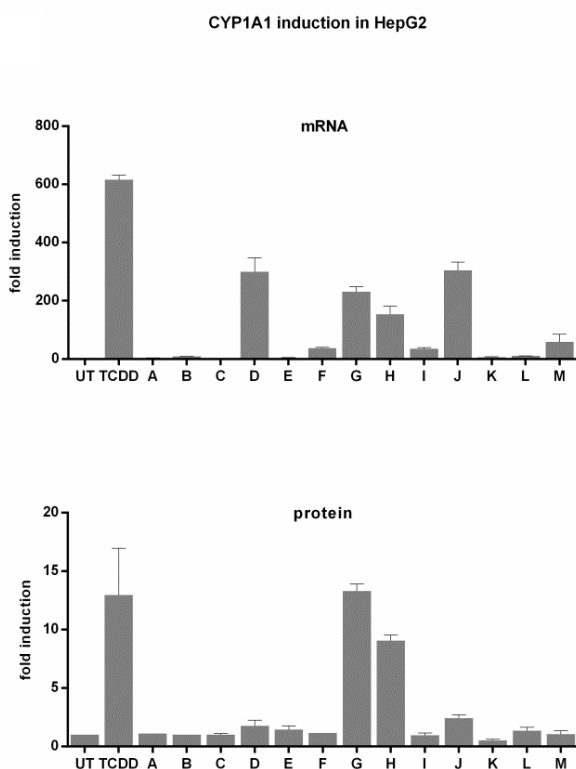
## Inhibition of AhR in AZ-AhR



**Obr. 11: Vliv derivátů stilbenů (A-M) na transkripční aktivitu AhR - antagonistický mód.** Data jsou vyjádřeny jako procenta maximální indukce dosažené TCDD a představují průměrnou hodnotu ± SD reprezentativních experimentů. Ve vložené tabulce je prezentována hodnota poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) vypočítaná ze tří nezávislých buněčných pasáží.

## 2.2.2. Vliv derivátů stilbenu na expresi CYP1A1 v HepG2 buňkách

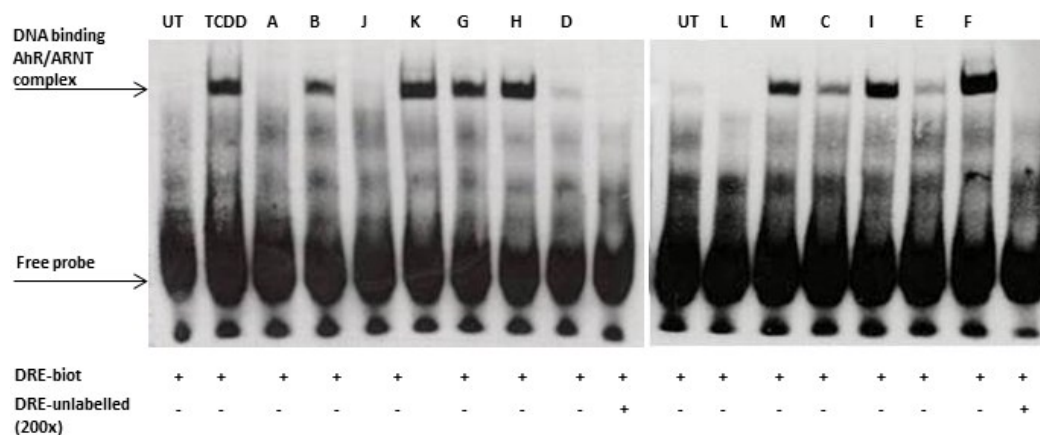
Účinek hydroxystilbenů a methoxystilbenů na expresi cytochromu P450, CYP1A1 byl v HepG2 buňkách studován jak na úrovni genu (mRNA), tak na úrovni proteinu (Obr. 12). HepG2 buňky byly inkubovány společně s testovanými látkami o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  po dobu 24 h pro mRNA analýzu a 48 h pro analýzu na úrovni proteinu. Buňky byly také inkubovány s 0,1% DMSO, jako negativní kontrola (UT) a 5nM TCDD jako pozitivní kontrola. Průměrná indukce CYP1A1 mRNA způsobena TCDD ve třech po sobě jdoucích pasážích buněk byla 605 násobně vyšší než negativní kontrola, Podle velikosti indukce CYP1A1 mRNA způsobené testovanými látkami o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  je můžeme rozlišit na silně indukující (násobek indukce  $> 100$ ; D, G, H, J) a slabě indukující (násobek indukce 10-100; B, F, I, L, M). Na úrovni proteinu byla průměrná indukce CYP1A1 způsobená TCDD ve třech po sobě jdoucích pasážích buněk 13 násobná. Významnou indukci CYP1A1 na proteinové úrovni vyvolaly testované látky G (13 $\times$ ), H (9 $\times$ ) a J (2,5 $\times$ ).



**Obr. 12: Vliv derivátů stilbenu na expresi CYP1A1 v HepG2 buňkách.** HepG2 buňky byly inkubovány s testovanými látkami (A-M) o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ; 0,1% DMSO (UT) a 5nM TCDD. Data jsou vyjádřeny jako násobek indukce luciferázové aktivity (fold induction) vztahovaný k negativní kontrole (DMSO) a představují průměrnou hodnotu  $\pm$  SD z experimentů provedených ve dvou po sobě jdoucích buněčných pasážích. Horní graf znázorňuje qRT-PCR analýzu CYP1A1 mRNA. Data jsou normalizována na úroveň GAPDH mRNA. Spodní graf znázorňuje analýzu proteinu CYP1A1 pomocí Simple Western Blotting Sally Sue<sup>TM</sup>. Data jsou normalizována na úroveň  $\beta$ -aktinu.

### 2.2.3. Vliv derivátů stilbenu na tvorbu komplexu AhR-DNA

Pomocí testu posunu elektroforetické mobility (EMSA) bylo zjišťováno, jakou roli hrají studované látky při vazbě AhR do vazebného místa jaderné DNA, ke které dochází po aktivaci AhR ligandem. Významná tvorba komplexu AhR-DNA byla pozorována v jaderných extraktech z buněk inkubovaných s testovanými látkami K, G, H, M, I a F. Nižší míra tvorby komplexu byla zaznamenána u látek B, C a E (Obr. 13).



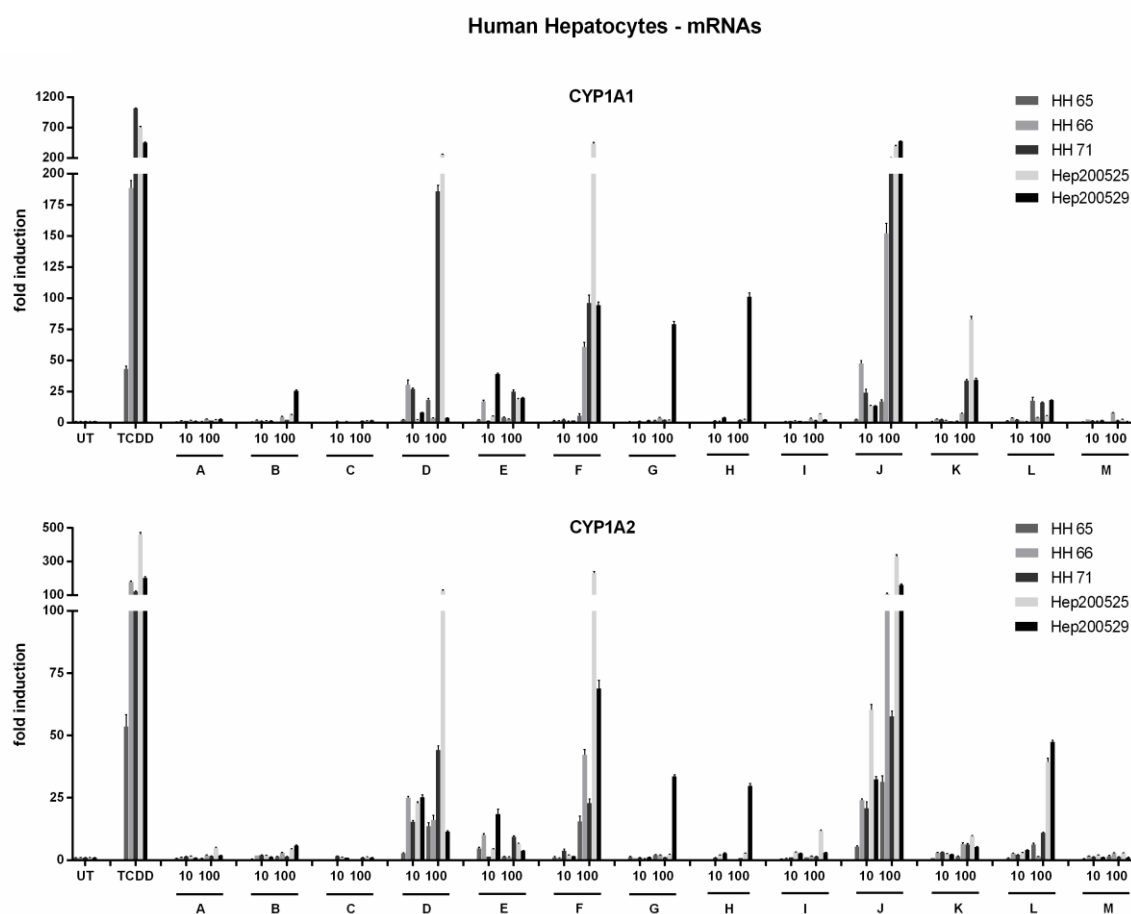
**Obr. 13: Vliv derivátů stilbenu na tvorbu komplexu AhR-DNA (EMSA).** MCF-7 buňky byly ve 100% konfluenci inkubovány 2 h s testovanými látkami (A-M) o koncentraci 50  $\mu$ M, rozpouštědlem 0,1% DMSO (UT) jako negativní kontrola a 5nM TCDD jako pozitivní kontrola. Jaderné extrakty byly inkubovány se sondou značenou biotinem obsahující dioxin responzivní element (DRE) a podrobeny elektroforéze v 5% polyakrylamidovém gelu. Komplex proteinu a DNA byl elektricky blotován na pozitivně nabitou nylonovou membránu a detekován pomocí konjugátu streptavidinu s křenovou peroxidázou a chemiluminiscentním substrátem. Experiment byl proveden ve čtyřech nezávislých buněčných pasážích; ukázán je reprezentativní experiment.

### 2.2.4. Vliv derivátů stilbenu na expresi CYP1A1 a CYP1A2 v primárních lidských hepatocytech

K tomuto experimentu byly využity primární lidské hepatocyty získané od pěti různých dárců tkání (HH65, HH66, HH71, Hep200525 a Hep200529). Primární kultury byly inkubovány s testovanými látkami po dobu 24 h pro analýzu mRNA a 48 h pro analýzu proteinů. Pozitivní kontrola TCDD způsobila indukci CYP1A1/CYP1A2 na úrovni mRNA v kulturách lidských hepatocytů HH6 (543 $\times$ /54 $\times$ ), HH66 (189 $\times$ /179 $\times$ ), HH71 (1020 $\times$ /122 $\times$ ), Hep200525 (702 $\times$ /461 $\times$ ) a Hep200529 (454 $\times$ /202 $\times$ ). Míra účinku testovaných látek na expresi CYP1A genů byla ovlivněna individuální variabilitou v závislosti na konkrétních lidských hepatocytech. Deriváty stilbenu A, C a M neindukovaly CYP1A geny ani v jedné kultuře hepatocytů. Látky B, G, I a H slabě indukovaly CYP1A geny, ale pouze při 100  $\mu$ M koncentraci a pouze v jedné

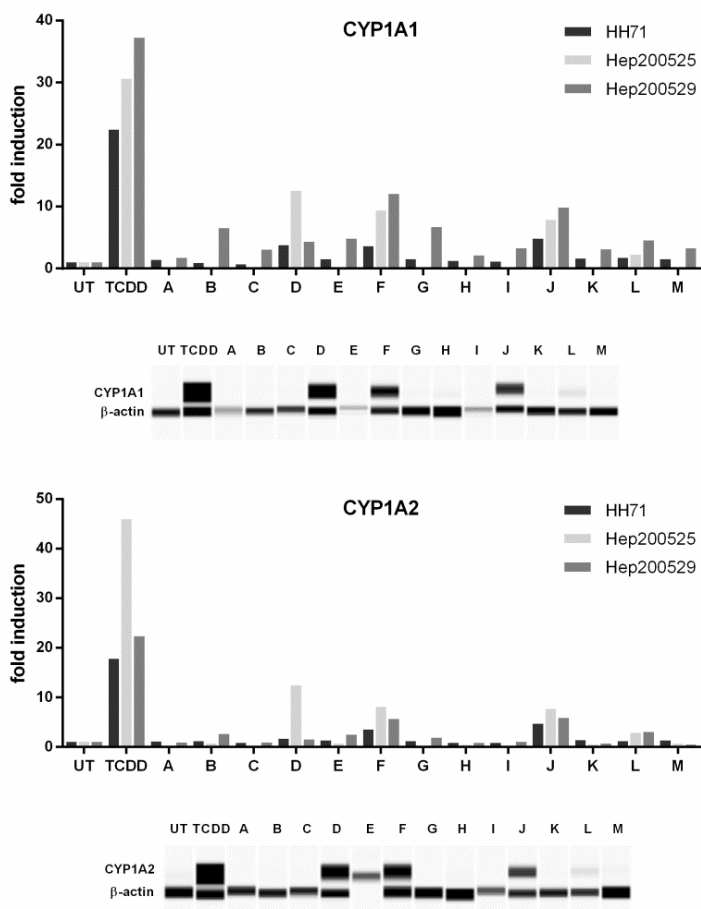
kultuře hepatocytů. Slabá indukce CYP1A genů způsobená nejméně ve třech kulturách hepatocytů byla pozorována u látek E, K a L. Silná indukce CYP1A1 a CYP1A2 mRNA v závislosti na koncentraci byla vyvolána deriváty stilbenu D, F a J (Obr. 14)

Analýza proteinů CYP1A1 a CYP1A2 byla provedena ve třech primárních kulturách lidských hepatocytů. Dioxin zvýšil hladinu proteinů CYP1A1/CYP1A2 v hepatocytových kulturách HH71 (22×/18×), Hep200525 (30×/45×) a Hep200529 (37×/22×). Významné indukce CYP1A1 a CYP1A2 proteinů bylo dosaženo působením látek D, F a J, což koreluje s mRNA analýzou (Obr. 15).



**Obr. 14: Vliv derivátů stilbenu na expresi CYP1A1 a CYP1A2 na úrovni mRNA v primárních kulturách lidských hepatocytů.** Buňky byly inkubovány 24 h s testovanými látkami (A-M) o koncentraci 10 μM a 100 μM; 0,1% DMSO (UT) a 5nM TCDD. Sloupcové grafy představují qRT-PCR analýzu exprese CYP1A1 a CYP1A2 mRNA. Data představují průměrnou hodnotu ± SD z měření v triplicátech u každé kultury a jsou vyjádřeny jako násobek indukce vztažený k negativní kontrole DMSO (UT). Data jsou normalizována na úroveň GAPDH mRNA.

### Human Hepatocytes - proteins



**Obr. 15: Vliv derivátů stilbenu na expresi CYP1A1 a CYP1A2 na úrovni proteinu v primárních kulturách lidských hepatocytů.** Buňky byly inkubovány 48 h s testovanými látkami (A-M) o koncentraci 100  $\mu$ M; 0,1% DMSO (UT) a 5nM TCDD. Sloupcové grafy představují Simple Western blot analýzu proteinů CYP1A1 a CYP1A2. Data jsou vyjádřeny jako násobek indukce vztažený k negativní kontrole DMSO (UT) a jsou normalizovány na úroveň  $\beta$ -aktinu. K obrázku je vložen ilustrativní záznam ze zařízení Sally Sue.

### 3. Diskuze

#### 3.1. Vliv anthokyanidinů na transkripční aktivitu jaderných a steroidních receptorů

Již dříve bylo zjištěno, že anthokyanidiny ovlivňují transkripční aktivitu některých receptorů (Jia et al., 2013; Kamenickova et al., 2013a, 2013b), scházela však komplexní studie popisující širší rozsah receptorů. Proto se tato práce zaměřuje na průzkum potenciálního vlivu nejběžnějších anthokyanidinů na transkripční aktivitu dvou skupin receptorů – jaderné a steroidní. Pomocí tranzientně nebo stabilně transfekovaných buněčných liniích s luciferázovým reportérovým genem (gene reporter assay) bylo zjištěno, že v agonistickém módu žádný z testovaných anthokyanidinů významně neovlivňuje indukci luciferázové aktivity jak u jaderných, tak u steroidních receptorových buněčných linií (viz Obr. 6 a7). Obdobně ani v antagonistickém módu testované látky nezpůsobovali výraznou změnu luciferázové aktivity u steroidních receptorů, přesto bylo pozorováno určité kolísání luciferázové aktivity (viz Obr. 7). V případě jaderných receptorů byl v antagonistickém módu zjištěn mírný pokles luciferázové aktivity po aplikaci testovaných látek (viz Obr. 6). Luciferázová aktivita klesala v závislosti na koncentraci testovaných látek. Nejvyšší koncentrace anthokyanidinů způsobily pokles pod polovinu aktivace modelovým agonistou. Tato zjištění ukazují, že nejběžněji se vyskytující anthokyanidiny (kyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin a peonidin) neovlivňují podstatným způsobem transkripční aktivitu jak jaderných, tak steroidních receptorů. Výjimku představuje potenciální inhibice transkripční aktivity jaderných receptorů indukovaných jejich přirozenými ligandy.

Některé nedávné studie popisují příznivý vliv anthokyanidinů na rakovinu prostaty zahrnující různé mechanismy, které nejsou závislé na AR. Kyanidin snižuje expresi genu cyklooxygenázy 2, což vede k snížení tvorby prostaglandinů (Munoz-Estada & Watkins, 2006). Delphinidin indukuje apoptózu buněk rakoviny prostaty jak u buněk závislých, tak u nezávislých na androgenu. Princip spočívá v aktivaci kaspáz a také tento efekt může podporovat inhibice signální dráhy jaderného receptoru kappa B (Bin Hafeez et al., 2008). Kyanidin-3-glukosid a pelargonidin-3-glukosid snižují hladinu cyklické D1 a inhibují růst buněk rakoviny prostaty v G1 fázi buněčného cyklu (Long et al., 2013).

Další protektivní účinky anthokyanidinů byly ukázány ve studii zabývající se extraktem ze zimolezu modrého, který vykazoval ochranné účinky při chemicky indukované hypertyreóze u laboratorních krys. Předpokládaným mechanismem účinku je narušení TR signální dráhy anthokyanidiny (Park et al., 2016). Delphinidin a kyanidin byly označeny jako slabé ligandy VDR a také slabé aktivátory VDR u tranzientně transfekovaných keratinocytů (Hoss et al., 2013; Austin et al., 2014). Existuje také velké množství zpráv o estrogenních účincích

anthokyanidinů, avšak vazebná afinita k ER $\alpha$  je až 20 000 $\times$  nižší než estradiolu (Schmitt & Stopper, 2001). Estrogenní účinek anthokyanidinů bez ohledu na resveratrol (Klinge et al., 2003) a alkohol (Simoncini et al., 2011) byl také popsán u extraktů z červeného a bílého vína. Účinek anthokyanidinů na ER je však kontroverzní. Zatímco některé studie ukazují, že se anthokyanidiny váží na ER a aktivují jej (Chalopin et al., 2010; Nanashima et al., 2015), jiné studie demonstrují estrogenní účinek přes aktivaci AMP kinázy, který není závislý na ER (Park et al., 2015).

### **3.2. Vliv hydroxystilbenů a methoxystilbenů na aktivitu AhR a indukci CYP1A genů v jaterních nádorových buňkách a primárních lidských hepatocytech**

Při této studii byl popsán účinek třinácti různých derivátů stilbenu A-M (Obr. 8) na transkripční aktivitu AhR a expresi CYP1A genů v lidských jaterních buňkách. V závislosti na koncentraci vykazovala většina testovaných látek aktivaci AhR v testech s luciferázovým reportérovým genem (gene reporter assay). Zatímco aktivace AhR způsobená deriváty stilbenu B, F, I, J, K a L dosáhla plató, křivka závislosti účinku na koncentraci měla stále vzestupný charakter u látek A, D, G, H a M i v nejvyšší testované koncentraci. V každém případě nejvyšší hodnota ( $\sim 10^{-5}$ M) poloviny maximální účinné koncentrace (potence, EC<sub>50</sub>) ukazuje spíše na nepřímý účinek derivátů stilbenu na AhR než na přímý důsledek tvorby komplexu receptoru s ligandem. Všechny testované látky také vykazovaly antagonistickou aktivitu na AhR, ale jejich profil závislosti koncentrace a účinku se podstatně lišil: sigmoidní křivka (A, B, F, H, J, L, M), křivka obráceného písmena U (I, K) a atypická křivka (D, G, E). Testy s luciferázovým genovým reportérem odhalily kombinaci agonistického a antagonistického účinku derivátů stilbenu nebo jejich parciálně agonistický účinek. Látka C nevykazovala žádnou aktivitu, což je jediný derivát stilbenu, který má nasycenou ethanovou strukturu místo nenasycené ethenové. Zdá se tedy, že přítomnost ethenové struktury je nezbytná pro aktivaci AhR. Co se týče *cis* a *trans* isomerů derivátů stilbenu (páry A-B, G-H, J-K), nebyly mezi nimi systematicky pozorovány rozdíly v aktivitě vůči AhR. Derivát stilbenu E aktivoval AhR pouze při koncentraci 5  $\mu$ M (25 $\times$ ), kdežto látka D se jeví jako nejsilnější aktivátor AhR ze všech testovaných derivátů stilbenu. To je zajímavé, jelikož obě tyto látky jsou poziční isomery *trans*-tetramethoxystilbenu (E = 2,4,3',5'-; D = 3,4,5,4'-). Obecně byla pozorována mnohem vyšší potence, avšak ne účinnost, methoxylovaných stilbenů v porovnání s jejich hydroxylovanými protějšky. Příkladem jsou látky A vs. J a B vs. K.

Všechny deriváty stilbenu, kromě látky C, indukovaly CYP1A1 v jaterních nádorových buňkách HepG2 a to tak, že velikost exprese mRNA CYP1A1 byla srovnatelná s aktivací AhR



v testech s luciferázovým genovým reportérem. Na rozdíl od toho, indukce CYP1A1 a CYP1A2 v kulturách lidských hepatocytů neodpovídaly zcela účinkům derivátů stilbenu v HepG2 ani v AZ-AhR buňkách, pouze u některých látek. Tento nesoulad mohou vyvolávat zejména tyto dvě skutečnosti: 1) Interindividuální variabilita – kultury primárních lidských hepatocytů jsou připravovány z jaterní tkáně dárců různého věku, pohlaví, rasy, epigenetického vlivu, fyziologického a patologického stavu (Dvořák, 2016). Buňky se tak na molekulární bázi liší v expresi a funkci enzymů biotransformace fáze I/II, transportérů xenobiotik a regulační dráhy detoxifikace. Tyto rozdíly v indukcích enzymů CYP1A jsou v této studii zřejmé, proto bylo využito pěti různých kultur primárních lidských hepatocytů pro snížení vlivu interindividuální variability a spolehlivé interpretaci dat. 2) Metabolický aparát – na rozdíl od buněk rakoviny jater, primární hepatocyty jsou z hlediska intermediárního metabolismu a metabolismu xenobiotik vybaveny komplexním plně funkčním metabolickým aparátem. Molekulární účinek testovaných látek také mohou ovlivňovat jejich metabolity, které vznikají ve fázích I a II biotransformace. Metabolity mohou vést k aktivaci nebo inaktivaci zkoumaného buněčného cíle (Dvořák, 2016). V této studii byly pozorovány podstatné odlišnosti mezi buňkami rakoviny jater a lidskými hepatocyty. Nejsilnějšími aktivátory AhR (v AZ-AhR buňkách) a induktory CYP1A1 (v HepG2 buňkách) byly deriváty stilbenu D, G, H a J. Zatímco látky D a J zůstaly silnými induktory CYP1A1/CYP1A2 v primárních kulturách lidských hepatocytů, látky G a H svůj účinek ztratily. Strukturně jsou totiž látky D a J plně methoxylované deriváty stilbenu, kdežto G a H jsou plně hydroxylované deriváty stilbenu. Pravděpodobným vysvětlením snížení účinku látek G a H by mohla být jejich inaktivace při glukuronidaci, která probíhá v lidských hepatocytech a je popsána pro látku G zde (Setoguchi et al., 2014). Testovaná látka F byla nejslabším aktivátorem AhR a nejslabším induktorem CYP1A1 mRNA v HepG2 buňkách, avšak velmi silným induktorem CYP1A1/CYP1A2 na úrovni mRNA i proteinu v několika kulturách lidských hepatocytů. Strukturně je tato látka jediná mono-substituovaná ze všech třinácti testovaných derivátů stilbenů. Jelikož je hydroxylace benzenového jádra obvyklým metabolickým vzorcem aromatických sloučenin, je pravděpodobné, že látka F se stává induktorem CYP1A až v lidských hepatocytech metabolickou aktivací zahrnující hydroxylaci benzenového jádra.

## 4. Závěr

V první studii byl zkoumán vliv nejběžnějších anthokyanidinů vyskytujících se v přírodě (kyanidinu, delphinidinu, malvidinu, pelargonidinu a peonidinu) na transkripční aktivitu jaderných (VDR, RXR, RAR, PXR a TR) a steroidních receptorů (PR, ER, AR a GR) v nádorových buněčných liniích. Obecně můžeme říci, že žádný z testovaných anthokyanidinů ani v jedné buněčné linii nezpůsobil dramatické změny v luciferázové aktivitě, tedy jak v indukci (agonistický mód), tak v inhibici (antagonistický mód) transkripční aktivity.

V případě druhé studie byla demonstrována aktivace AhR a indukce CYP1A genů strukturně odlišnými hydroxylovanými a methoxylovanými deriváty stilbenu, včetně jejich *cis/trans* izomerů. Indukce CYP1A se lišila u nádorových HepG2 buněk a u lidských hepatocytů nejspíše kvůli narušenému metabolismu nádorových buněk. Zatímco mezi *cis* a *trans* isomery stilbenů nebyly pozorovány systematické odlišnosti, methoxylované deriváty byly silnějšími aktivátory AhR v porovnání s hydroxylovanými.

Anthokyanidiny a deriváty stilbenu jsou látky vyskytující se v ovoci, zelenině a jiných plodech. Nedávné objevy klíčové role AhR ve střevní fyziologii a imunitě (Schiering et al., 2017; Qiu et al., 2012; Li et al., 2011) naznačují, že data získaná v této studii mohou mít toxikologický význam v oblasti potravin a prohloubit znalosti v tomto odvětví.

## 5. Seznam použitých zkratek

22Rv1 - buněčná linie odvozená od karcinomu prostaty  
AhR - aryl hydrokarbonový receptor  
AMP - adenosinmonofosfát  
AMPK - protein kináza aktivovaná AMP  
AR - androgenový receptor  
ARNT - AhR jaderný translokátor  
cisRA - kyselina 9-cis retinová  
CYP - cytochrom P450  
DEX - dexametazon  
DHT - 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron  
DMSO - dimethylsulfoxid  
DNA - deoxyribonukleová kyselina  
DRE - dioxin responzivní element  
E2 - 17 $\beta$ -estradiol  
EC<sub>50</sub> - hodnota poloviny maximální účinné koncentrace  
EMSA - electrophoretic mobility shift assay, test posunu elektroforetické mobility  
ER - estrogenový receptor  
ERK - signálem regulované extracelulární kinázy  
FICZ - 6-formylindolo(3,2-b)karbazol  
GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza  
GR - glukokortikoidní receptor  
GRE - glukokortikoidní responzivní element  
HEK293 - buněčná linie odvozená od embrionálních buněk ledvin  
HeLa - buněčná linie odvození od nádoru děložního hrdla  
HepG2 - buněčná linie odzvozená od rakoviny jater  
HH - lidské hepatocyty  
HuH7 - buněčná linie odzvozená od hepatokarcinomu  
IC<sub>50</sub> - hodnota polovina maximální inhibiční koncentrace  
LS180 - buněčná linie odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva  
MAPK - mitogenem aktivovaná protein kináza  
MCF-7 - buněčná linie odvozená od nádoru prsu  
MR - mineralokortikoidní receptor  
mRNA - messenger ribonukleotidová kyselina  
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid

NAD(P)H - fosforylovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát  
OATP - organic anion transporting peptides, peptidy transpotující organické anionty  
P4 - progesteron  
PAH - polycyklický aromatický uhlovodík  
PPAR-alpha - peroxisome proliferator-activated receptor-alpha  
PR - progesteronový receptor  
PXR - pregnanový X receptor  
qRT-PCR - kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase  
RAR - receptor kyseliny retinové  
RIF - rifampicin  
RXR - retinoidní X receptor  
SD - směrodatná odchylka  
SIR - sirtuiny  
SP600125 - 1,9-pyrazoloantron  
T3 - 3,3,5-trijodo-L-thyronin  
T3 - trijodothyronin  
T47D - buněčná linie odvozená od rakoviny prsu  
TCDD - 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-dioxin  
TR - thyroidní receptor  
transRA - kyselina all-trans retinová  
TSU-16 - (Z)-3-[(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidenyl]-2-indolinon  
U0126 - 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien  
UT - untreated, bez aplikace látky  
VD3 - 1,25-dihydroxyvitamín D3  
VDR - receptor vitamínu D  
XRE - reseponzivní element pro xenobiotika

## 6. Seznam použité literatury

- Abel J, Haarmann-Stemmann T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol. Chem.* 2010; 391 (11): 1235-1248.
- Aldawsari FS, Velazquez-Martinez CA. 3,4',5-trans-Trimethoxystilbene; a natural analogue of resveratrol with enhanced anticancer potency. *Invest New Drugs.* 2015; 33 (3): 775-786.
- Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(10):793-810.
- Aluru N, Vijayan MM. Resveratrol affects CYP1A expression in rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol.* 2006; 77 (3):291-297
- Andrieux L, Langouët S, Fautrel A, Ezan F, Krauser JA, Savouret JF, Guengerich FP, Baffet G, Guillouzo A. Aryl hydrocarbon receptor activation and cytochrome P450 1A induction by the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 2004; 65(4):934-43.
- Austin HR, Hoss E, Batie SF, Moffet EW, Jurutka PW, Haussler MR, Whitfield GK. Regulation of late cornified envelope genes relevant to psoriasis risk by plant-derived cyanidin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 443(4):1275-1279.
- Beedanagari SR, Bebenek I, Bui P, Hankinson O. 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. *Toxicol Sci.* 2009; 110(1):61-67.
- Biddie SC, Conway-Campbell BL, Lightman SL. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51(3):403-412.
- Bin Hafeez B, Asim M, Siddiqui IA, Adhami VM, Murtaza I, Mukhtar H. Delphinidin, a dietary anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables: a new weapon to blunt prostate cancer growth. *Cell Cycle.* 2008; 7(21):3320-3326.
- Bozina N, Bradamante V, Lovrić M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009; 60(2):217-242.
- Britton RG, Kovoov C, Brown K. Direct molecular targets of resveratrol: identifying key interactions to unlock complex mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1348 (1):124-133.
- Bruhs A, Haarmann-Stemmann T, Frauenstein K, Krutmann J, Schwarz T, Schwarz A. Activation of the arylhydrocarbon receptor causes immunosuppression primarily by modulating dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2015; 135(2):435-444.
- Cao L, Chen X, Xiao X, Ma Q, Li W. Resveratrol inhibits hyperglycemia-driven ROS-induced invasion and migration of pancreatic cancer cells via suppression of the ERK and p38 MAPK signaling pathways. *Int J Oncol.* 2016; 49(2):735-743.
- Cardile V, Chillemi R, Lombardo L, Sciuto S, Spatafora C, Tringali C. Antiproliferative activity of methylated analogues of E- and Z-resveratrol. *Z Naturforsch C.* 2007; 62(3-4):189-195.
- Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E, Savouret JF. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol.* 1999; 56(4):784-790.
- Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* 1998; 58 (24): 5707-5712.

- Cui J, Sun R, Yu Y, Gou S, Zhao G, Wang C. Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. *Phytother Res.* 2010; 24(11):1637-1644.
- Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev.* 2016; 37(1):3-15.
- De Bosscher K. Selective Glucocorticoid Receptor modulators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 120(2-3):96-104.
- de Medina P, Casper R, Savouret JF, Poirot M. Synthesis and biological properties of new stilbene derivatives of resveratrol as new selective aryl hydrocarbon modulators. *J Med Chem.* 2005; 48(1):287-291.
- Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact.* 2002; 141(1-2):3-24.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43:309-334.
- Dittmann KH, Rothmund MC, Paasch A, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Frauenstein K, Fritsche E, Haarmann-Stemmann T, Braeuning A, Rodemann HP. The nuclear aryl hydrocarbon receptor is involved in regulation of DNA repair and cell survival following treatment with ionizing radiation. *Toxicol Lett.* 2016; 240(1):122-129.
- Dvorak Z. Opportunities and challenges in using human hepatocytes in cytochromes P450 induction assays. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016; 12 (2):169-174
- Dvorak Z, Vrzal R, Henklova P, Jancova P, Anzenbacherova E, Maurel P, Svecova L, Pavek P, Ehrmann J, Havlik R, Bednar P, Lemr K, Ulrichova J. JNK inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75(2):580-588.
- Dvorak Z, Srovnalova A, Svecarova M, Vrzal R. The effect of anthocyanins on the expression of selected phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *Food Funct.* 2014; (9):2145-2151.
- Esser C, Bargen I, Weighardt H, Haarmann-Stemmann T, Krutmann J. Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin Immunopathol.* 2013; 35(6):677-691.
- Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280(2):F181-192
- Foster BC, Vandenhoeck S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, Budzinski JW, Ramputh A, Arnason JT. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine.* 2003;10(4):334-42.
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(25):14138-43.
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews.* 2006; 58(4): 685-704.
- Ghosh D, Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 2007; 16: 200-208.
- Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 2004; 24 (12): 2378-2383.
- Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol.* 2016; 428(19):3831-3849.

- Groves JT. Cytochrome P450 enzymes: understanding the biochemical hieroglyphs [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research* 2015, 4(F1000 Faculty Rev):178.
- Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M. [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2006; 64(6):535-548.
- Gulliver LS. Xenobiotics and the Glucocorticoid Receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017; 319:69-79.
- Guyot E, Coumoul X, Chassé JF, Khallouki F, Savouret JF, Poirot M, Barouki R. Identification of a new stilbene-derived inducer of paraoxonase 1 and ligand of the Aryl hydrocarbon Receptor. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83(5):627-632.
- Hoss E, Austin HR, Batie SF, Jurutka PW, Haussler MR, Whitfield GK. Control of late cornified envelope genes relevant to psoriasis risk: upregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and plant-derived delphinidin. *Arch Dermatol Res*. 2013; 305(10):867-878.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003; 425(6954):191-196.
- <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/DrugMetabolism.html> ke dni 4.6.2019
- Huang WY, Davidge ST, Wu J. Bioactive natural constituents from food sources-potential use in hypertension prevention and treatment. *Crit Rev FoodSci. Nutr*. 2013; 53 (6): 615-630.
- Chalopin M, Tesse A, Martínez MC, Rognan D, Arnal JF, Andriantsitohaina R. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *PLoS One*. 2010; 5(1):8554.
- Chimento A, Sirianni R, Saturnino C, Caruso A, Sinicropi MS, Pezzi V. Resveratrol and Its Analogs As Antitumoral Agents For Breast Cancer Treatment. *Mini Rev Med Chem*. 2016; 16(9):699-709.
- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016; 96(1):365-408.
- Chun YJ, et al., 2001. A new selective and potent inhibitor of human cytochromeP450 1B1 and its application to antimutagenesis. *Cancer Res*. 61 (22):8164-8170.
- Chun YJ, Kim S, Kim D, Lee SK, Guengerich FP. A new selective and potent inhibitor of human cytochrome P450 1B1 and its application to antimutagenesis. *Cancer Res*. 2001; 61(22):8164-8170.
- Jia Y, Kim JY, Jun HJ, Kim SJ, Lee JH, Hoang MH, Kim HS, Chang HI, Hwang KY, Um SJ, Lee SJ. Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reducing hepatic lipid. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1831(4):698-708.
- Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev*. 1998; 78(4):1193-231.
- Kamenickova A, Anzenbacherova E, Pavek P, Soshilov AA, Denison MS, Zapletalova M, Anzenbacher P, Dvorak Z. Effects of anthocyanins on the AhR-CYP1A1 signaling pathway in human hepatocytes and human cancer cell lines. *Toxicol Lett*. 2013a; 221(1):1-8.
- Kamenickova A, Anzenbacherova E, Pavek P, Soshilov AA, Denison MS, Anzenbacher P, Dvorak Z. Pelargonidin activates the AhR and induces CYP1A1 in primary human hepatocytes and human cancer cell lines HepG2 and LS174T. *Toxicol Lett*. 2013b; 218(3):253-259.
- Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000; 74(5):279-285.

- Klinge CM, Risinger KE, Watts MB, Beck V, Eder R, Jungbauer A. Estrogenic activity in white and red wine extracts. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(7):1850-1857.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 2003; 64(5):923-933.
- Korashy HM, Shayeganpour A, Brocks DR, El-Kadi AO. Induction of cytochrome P450 1A1 by ketoconazole and itraconazole but not fluconazole in murine and human hepatoma cell lines. *Toxicol Sci.* 2007; 97(1):32-43.
- Kruger MJ, Davies N, Myburgh KH, Lecour S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International.* 2014; 59:41–52.
- Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, Satofuka S, Noda K, Ozawa Y, Oike Y, Ishida S, Tsubota K. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(7):3512-3519.
- Kulkarni SS, Canto C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1852 (6):1114-1123.
- Květina J., Grundmann M. Farmakologické interakce. *Klinická farmakologie a farmacie.* 2003; 17(1):17-21.
- Lee SM, Meyer MB, Benkusky NA, O'Brien CA, Pike JW. The impact of VDR expression and regulation in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018; 177:36-45.
- Lee JE, Safe S. Involvement of a post-transcriptional mechanism in the inhibition of CYP1A1 expression by resveratrol in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 62 (8):1113-1124.
- Levin ER, Hammes SR. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; 17(12):783-797.
- Li Y, Innocentin S, Withers DR, Roberts NA, Gallagher AR, Grigorieva EF, Wilhelm C, Veldhoen M. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell.* 2011; 147(3):629-640.
- Licznarska B, Szaefer H, Wierzchowski M, Sobierajska H, Baer-Dubowska W. Resveratrol and its methoxy derivatives modulate the expression of estrogen metabolism enzymes in breast epithelial cells by AhR down-regulation. *Mol Cell Biochem.* 2017; 425(1-2):169-179.
- Long N, Suzuki S, Sato S, Naiki-Ito A, Sakatani K, Shirai T, Takahashi S. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Sci.* 2013; 104(3):298-303.
- Malaguti M, Angeloni C, Hrelia S. Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:825928.
- Matsuoka-Kawano K, Yoshinari K, Nagayama S, Yamazoe Y. TSU-16, (Z)-3-[(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidene]-2-indolinone, is a potent activator of aryl hydrocarbon receptor and increases CYP1A1 and CYP1A2 expression in human hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 2010; 185(1):33-41.
- Meunier B, de Visser SP, Shaik S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev.* 2004; 104(9):3947-3980.
- Mikstacka R, Przybylska D, Rimando AM, Baer-Dubowska W. Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by trans-resveratrol methyl ethers. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(5):517-524.
- Mikstacka R, Rimando AM, Dutkiewicz Z, Stefański T, Sobiak S. Design, synthesis and evaluation of the inhibitory selectivity of novel trans-resveratrol analogues on human recombinant CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(17):5117-5126.



- Mohammadi-Bardbori A, Bengtsson J, Rannug U, Rannug A, Wincent E. Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem Res Toxicol.* 2012; 25(9):1878-1884.
- Munoz-Espada AC, Watkins BA. Cyanidin attenuates PGE2 production and cyclooxygenase-2 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2006; 17:589-596.
- Nanashima N, Horie K, Tomisawa T, Chiba M, Nakano M, Fujita T, Maeda H, Kitajima M, Takamagi S, Uchiyama D, Watanabe J, Nakamura T, Kato Y. Phytoestrogenic activity of blackcurrant (*Ribes nigrum*) anthocyanins is mediated through estrogen receptor alpha. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59(12):2419-2431.
- Nebert DW, Ingelman-Sundberg M, Daly AK. Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme genes, their functional importance, and nomenclature issues. *Drug Metab Rev.* 1999; 31(2):467-487.
- Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids.* 2010; 75(1):1-12.
- Oladimeji PO, Chen T. PXR: More Than Just a Master Xenobiotic Receptor. *Mol Pharmacol.* 2018; 93(2):119-127.
- Ortiga-Carvalho TM, Sidhaye AR, Wondisford FE. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10(10):582-591.
- Oyenihi OR, Oyenihi AB, Adeyanju AA, Oguntibeju OO. Antidiabetic effects of resveratrol: The way forward in its clinical utility. *J Diabetes Res.* 2016; 2016:9737483.
- Park S, Kang S, Jeong DY, Jeong SY, Park JJ, Yun HS. Cyanidin and malvidin in aqueous extracts of black carrots fermented with *Aspergillus oryzae* prevent the impairment of energy, lipid and glucose metabolism in estrogen-deficient rats by AMPK activation. *Genes Nutr.* 2015; 10(2):455.
- Park SI, Lee YJ, Choi SH, Park SJ, Song CH, Ku SK. Therapeutic effects of blue honeysuckle on lesions of hyperthyroidism in rats. *Am J Chin Med.* 2016; 44(7):1441-1456.
- Pike JW, Meyer MB, Bishop KA. Regulation of target gene expression by the vitamin D receptor - an update on mechanisms. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012; 13(1):45-55.
- Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia KC, Lamb JH, Farmer PB, Stanley LA, Burke MD. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br J Cancer.* 2002; 86(5):774-8.
- Prior RL, Wu X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res.* 2006; 40(10):1014-28.
- Qiu J, Heller JJ, Guo X, Chen ZM, Fish K, Fu YX, Zhou L. The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity.* 2012; 36(1):92-104.
- Quattrochi LC, Tukey RH. Nuclear uptake of the Ah (dioxin) receptor in response to omeprazole: transcriptional activation of the human CYP1A1 gene. *Mol Pharmacol.* 1993; 43 (4):504-508.
- Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, De Bosscher K. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 380(1-2):41-54.
- Renaud J, Bournival J, Zottig X, Martinoli MG. Resveratrol protects DAergic PC12 cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: effect on p53 and GRP75 localization. *Neurotox Res.* 2014; 25(1):110-123.

- Riha J, Brenner S, Srovnalova A, Klameth L, Dvorak Z, Jäger W, Thalhammer T. Effects of anthocyanins on the expression of organic anion transporting polypeptides (SLCOs/OATPs) in primary human hepatocytes. *Food Funct.* 2015; 6(3):772-779.
- Rinaldi AL, Morse MA, Fields HW, Rothas DA, Pei P, Rodrigo KA, Renner RJ, Mallery SR. Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Res.* 2002; 62(19):5451-5456.
- Riviere C, Pawlus AD, Merillon JM. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat Prod Rep.* 2012; 29:1317-1333.
- Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 4):585-6.
- Setoguchi Y, Oritani Y, Ito R, Inagaki H, Maruki-Uchida H, Ichiyanaagi T, Ito T. Absorption and metabolism of piceatannol in rats. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(12):2541-2548.
- Shimada T, Gillam EM, Sutter TR, Strickland PT, Guengerich FP, Yamazaki H. Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25(5):617-622.
- Schiering C, Wincent E, Metidji A, Iseppon A, Li Y, Potocnik AJ, Omenetti S, Henderson CJ, Wolf CR, Nebert DW, Stockinger B. Feedback control of AHR signalling regulates intestinal immunity. *Nature.* 2017; 542(7640):242-245.
- Schmitt E, Stopper H. Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins. *Nutr Cancer.* 2001; 41(1-2):145-149.
- Schulz V. Safety of St. John's Wort extract compared to synthetic antidepressants. *Phytomedicine.* 2006; 13(3):199-204.
- Simoncini T, Lenzi E, Zöchling A, Gopal S, Goglia L, Russo E, Polak K, Casarosa E, Jungbauer A, Genazzani AD, Genazzani AR. Estrogen-like effects of wine extracts on nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *Maturitas.* 2011; 70(2):169-175.
- Skowron KJ, Booker K, Cheng C, Creed S, David BP, Lazzara PR, Lian A, Siddiqui Z, Speltz TE, Moore TW. Steroid receptor/coactivator binding inhibitors: An update. *Mol Cell Endocrinol.* 2019; 493:110471.
- Srovnalova A, Svecarova M, Zapletalova MK, Anzenbacher P, Bachleda P, Anzenbacherova E, Dvorak Z. Effects of anthocyanidins and anthocyanins on the expression and catalytic activities of CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, and CYP3A4 in primary human hepatocytes and human liver microsomes. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(3):789-797.
- Stejskalova L, Dvorak Z, Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Curr. Drug Metab.* 2011; 12 (2):198-212.
- Tao L, Ding Q, Gao C, Sun X. Resveratrol attenuates neuropathic pain through balancing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines release in mice. *Int Immunopharmacol.* 2016; 34:165-172.
- Tsunoda SM, Harris RZ, Christians U, Velez RL, Freeman RB, Benet LZ, Warshaw A. Red wine decreases cyclosporine bioavailability. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 70(5):462-467.
- Vrzal R, Zdarilová A, Ulrichová J, Bláha L, Giesy JP, Dvořák Z. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by berberine in HepG2 and H4IIE cells: Biphasic effect on CYP1A1. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70(6):925-936.
- Walle T, Ta N, Kawamori T, Wen X, Tsuji PA, Walle UK. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids--methylated versus unmethylated flavones. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(9):1288-1296.

Wang S, Liang X, Yang Q, Fu X, Zhu M, Rodgers BD, Jiang Q, Dodson MV, Du M. Resveratrol enhances brown adipocyte formation and function by activating AMP-activated protein kinase (AMPK)  $\alpha$ 1 in mice fed high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*. 2017; 61(4).

Watkins RE, Wisely GB, Moore LB et al. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science*. 2001; 292:2329-2333.

Welch CR, Wu Q, Simon JE. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*. 2008; 4:75–101.

Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*. 2000;1(6):REVIEWS3003

Yang Q, Wang HC, Liu Y, Gao C, Sun L, Tao L. Resveratrol cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury involves upregulation of adiponectin levels and multimerization in type 2 diabetic mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016; 68(4):304-312.

Yuan B, Imai M, Kikuchi H, Fukushima S, Hazama S, Akaike T, Yoshino Y, Ohyama K, Hu X, Pei X, Toyoda H. Cytocidal effects of polyphenolic compounds, alone or in combination with, anticancer drugs against cancer cells: Potential future application of the combinatory therapy. *Apoptosis and Medicine*. 2012; chapter 6:155-174.

Yuan SX, Wang DX, Wu QX, Ren CM, Li Y, Chen QZ, Zeng YH, Shao Y, Yang JQ, Bai Y, Zhang P, Yu Y, Wu K, Sun WJ, He BC. BMP9/p38 MAPK is essential for the antiproliferative effect of resveratrol on human colon cancer. *Oncol Rep*. 2016; 35(2):939-47.

Zhang S, Qin C, Safe SH. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/ antagonists: effects of structure and cell context. *Environ. Health Perspect*. 2003; 111 (16):1877-1882.

## 7. Přílohy

**Pastorková B**, Illés P, Dvořák Z. Profiling of anthocyanidins against transcriptional activities of steroid and nuclear receptors. *Drug Chem Toxicol.* 2017; 41(4):434-440.

(IF 1.53)

**Pastorková B**, Vrzalová A, Bachleda P, Dvořák Z. Hydroxystilbenes and methoxystilbenes activate human aryl hydrocarbon receptor and induce CYP1A genes in human hepatoma cells and human hepatocytes. *Food Chem Toxicol.* 2017; 103:122-132.

(IF 3.98).