

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

INTERAKCE VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK

S FARNESIODNÍM X RECEPTOREM

Rigorózní práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Eliška Trojanová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

Na tomto místě bych ráda poděkovala Prof. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky při tvorbě této rigorózní práce.

Poděkování také patří prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. a celému týmu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK za dodání izolovaných alkaloidů z *Fumaria officinalis*.

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Mgr. Eliška Trojanová

Školitel: Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název rigorózní práce: Interakce vybraných přírodních látek s farnesoidním X receptorem

Metabolismus řady látek přijímaných ve stravě, tvořených v těle a podávaných ve formě léčiv a potravinových doplňků, může být ovlivněn prostřednictvím specifických struktur označovaných jako nukleární receptory. Středem zájmu této práce je farnesoidní X receptor (FXR) a jeho interakce s vybranými přírodními látkami, konkrétně anthocyanidiny peonidinem, petunidinem, pelargonidinem, malvidinem, cyanidinem a delphinidinem a dále vybranými alkaloidy obsaženými ve *Fumaria officinalis*.

U těchto látek bylo již v minulosti v různých studiích pozorováno a popsáno jejich pozitivní ovlivnění vzniku a progresu aterosklerózy, metabolismu triacylglycerolů, sekrece žlučových kyselin, celkového a nízkodenzitního lipoproteinového (LDL) cholesterolu, metabolismu glukózy a rovněž ovlivnění inzulinové signální dráhy. Vzhledem k zásadní roli FXR v těchto procesech byly pro analýzu vybrány zmíněné sloučeniny. Pro určení zda se jedná o potenciální agonisty FXR byla užita TR-FRET LanthaScreenTM koaktivátorová esej. Pomocí této metody se podařilo identifikovat několik potenciálních ligandů FXR receptoru.

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Mgr. Eliška Trojanová

Supervisor: Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of rigorous thesis: Interaction of chosen natural compounds with farnesoid X receptor

Metabolism of many substances taken in the diet, formed in the body and administered in the form of pharmaceuticals and dietary supplements may be influenced by the specific structures called the nuclear receptors. The focus of this work is farnesoid X receptor (FXR) and its interaction with selected natural ingredients, specifically anthocyanidins peonidin, petunidin, pelargonidin, malvidin, cyanidin and delphinidin and chosen alkaloids from *Fumaria officinalis*. For these substances has been previously observed and described in different studies the positive influence of the development and progression of atherosclerosis, metabolism of triglycerides, bile acids secretion, total and low density lipoprotein (LDL) cholesterol, glucose metabolism and also the influence on the insulin signaling pathway. Given the critical role of FXR in these processes, these compounds have been selected for the examination as the potential agonists of FXR. Substances were tested using TR-FRET LanthaScreen™ farnesoid X receptor co-activator analysis. We found several promising ligands of FXR among tested compounds.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK.....	8
2. ÚVOD	12
3. TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1 NUKLEÁRNÍ RECEPTORY	13
3.1.1 Struktura nukleárních receptorů.....	13
3.2 FARNESOIDNÍ X RECEPTOR (FXR)	15
3.2.1 Role FXR v metabolismu žlučových kyseliny	15
3.2.2 Role FXR v řízení lipidového metabolismu.....	21
3.2.3 Role FXR v metabolismu triglyceridů	22
3.2.4 Role FXR v glukózové homeostáze	23
3.2.5 FXR a jeho ligandy	25
3.2.6 FXR a ovlivnění onemocnění.....	26
3.3 PŘÍRODNÍ LÁTKY REAGUJÍCÍ S FXR RECEPTOREM.....	28
3.3.1 <i>Ganoderma lucidum</i>	28
3.3.2 <i>Coptis chinensis</i>	32
3.3.3 <i>Commiphora mukul</i>	35
3.4 PROANTHOCYANIDINY	38
3.4.1 Absorbce anthocyanidinů a jejich biodostupnost.....	43
3.5 VYBRANÉ ANTHOCYANIDINY	46
3.5.1 Cyanidin	47
3.5.2 Pelargonidin	48
3.5.3 Delphinidin.....	48
3.5.4 Peonidin	49
3.5.5 Petunidin	50
3.5.6 Malvidin.....	51
3.6 VYBRANÉ ALKALOIDY <i>FUMARIA OFFICINALIS</i>	52
3.6.1 Protopin	52
3.6.2 Fumaricin, fumarilin, fumaritin, O-methyl- fumarofycin, parfumin, parfumidin.....	53
3.6.3 Bikukulin	54
3.6.4 O-Methylfumarofin	54
4. CÍL PRÁCE	55

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	56
5.1 POMŮCKY, PŘÍSTROJE	56
5.2 REAGENCIE	56
5.3 METODA	57
5.3.1 Princip FRET a TR-FRET	58
5.3.2 Vazba agonisty	59
5.3.3 Vlastnosti přístroje	59
5.4 POSTUP	62
5.4.1 Analýza agonistů.....	62
5.4.2 Příprava sloučenin na experiment	62
5.4.3 Příprava 2X zásobních roztoků agonisty a potenciálních agonistů FXR	63
5.4.4 Příprava 4X zásobního roztoku FXR-LBD.....	63
5.4.5 Příprava 4X roztoku Fluorescein-SRC2-2/4X Tb anti-GST protilátky ..	63
5.4.6 Inkubace a odečtení výsledků.....	63
5.4.7 Objemy reagentů a kontrol užitých při analýze potenciálních agonistů	64
5.4.8 Vlastní postup	64
6. VÝSLEDKY	67
6.1 EXPERIMENT Č. 1 - OVĚŘENÍ FUNKČNOSTI ANALÝZY	67
6.2 EXPERIMENT Č. 2 – TESTOVÁNÍ VLASTNÍCH ANTHOCYANIDINŮ	68
6.3 EXPERIMENT Č. 3 – TESTOVÁNÍ LÁTEK OBSAŽENÝCH VE FUMARIA OFFICINALIS	69
7. DISKUZE	71
8. ZÁVĚR	74
9. LITERATURA	75

1. SEZNAM ZKRATEK

AF-1 aktivační funkce 1 v N-terminální části

AGN ligand pro FXR

AKT proteinkináza B

apoA apolipoprotein A

apoC-II, apoC-III apolipoproteiny CII a CIII

ATP adenosintrifosfát

BA žlučové kyseliny

BACS žlučové kyseliny-koenzym A syntetáza

BAR receptor pro žlučové kyseliny (bile acid receptor)

BARE responzibilní elementy pro žlučové kyseliny

BAT žlučové kyseliny-CoA-aminokyselinová N-acetyltransferáza

BSEP exportní pumpa žlučových kyselin

CA cholová kyselina

Caco-2 buněčná linie z buněk lidského epiteliálního kolorektálního adenokarcinomu

CAE alkaloidový extrakt z *Rhizoma Coptidis*

CAR konstitutivní androstanový receptor

CDCA chenodeoxycholová kyselina

DCA deoxycholová kyselina

DBD DNA vázající doména

DM2 diabetes mellitus 2.typu

DMSO dimethylsulfoxid

DR5 smrtící receptor

DTT dithiothreitol

6-ECDC kyselina 6-ethyl-chenodeoxycholová

EC₅₀ koncentrace látky, při které je dosaženo 50% maximálního účinku

EGFR receptor pro epidermální růstový faktor

FBP1 fruktóza-1,6-bifosfatáza 1

FGF fibroblastový růstový faktor

FOXO1 forkhead box O1

FRET fluorescenční rezonanční transfer energie

FXR farnesoid X receptor

FXREs FXR responzibilní elementy

GIT gastrointestinální trakt

GLUT přenašeč glukózy

GSPE proanthocyanidinový extrakt z hroznových jader

GST glutathion S-transferáza

GW4064 specifický agonista pro FXR

HDAC3 histon-deacetyláza 3

HDL lipoprotein s vysokou hustotou

HepG2 kultivované lidské hepatické buňky

HMG-CoA reduktáza (3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymA) reduktáza

HNF-4 α jaterní nukleární faktor-4 α

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HRE hormon responzibilní elementy

HTS vysoce propustný či vysokokapacitní screening

I-BABP intestinální žlučové kyseliny vážící protein

JNK c-Jun N-terminální kináza

LBD ligand vážící doména

LCA lithocholová kyselina

LDL-C níkodenzitní lipoproteinový cholesterol

LPL lipoproteinová lipáza

LRH jaterní receptorový homolog

LXR jaterní X receptor (y)

MAPK mitogenem aktivovaná proteinkináza

mRNA informační ribonukleová kyselina

MRP2 protein spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí

NR nukleární receptor(y)

PCR polymerázová řetězová reakce

PFIC II progresivní familiární intrahepatické cholestázy typu II

PGC-1 α koaktivátor pro receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory

PPAR receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory

PUFA polynenasycené mastné kyseliny

PXR pregnanový X receptor

RT-PCR polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

RXR α retinoidní X receptor α

SHP malý heterodimerní partner

ROS reaktivní formy kyslíku

SRC-2 steroidní koaktivátor 2

SXR steroidní a xenobiotický receptor

TNF α tumor nekrotizující faktor α

TRAIL ligand indukující apoptózu spojenou s tumor nekrotizujícím faktorem

TR-FRET fluorescenční rezonanční přenos energie s časovým rozlišením

TRRAP transkripční koaktivátor

UGT2B uridindifosfo-glukuronyltransferáza

UV-VIS ultrafialové a viditelné oblasti spektra

VEGFR2 vaskulární endoteliální růstový faktor

WT fenotyp typicky se vyskytující u druhů v přírodě

XRE xenobiotický DNA responzibilní element

ŽK žlučové kyseliny

2. ÚVOD

Od nejstarších dob člověk využíval částí rostlin či rostlinných přípravků nejen ve stravě, ale také pro ošetření ran a při léčbě onemocnění. Mezi důkazy patří dochované písemné předpisy dávných kultur například z období antického Řecka a Říma. Ve středověku byly informace o léčivých rostlinách spolu se svými účinky zapisovány do herbářů. Tyto znalosti vycházely často z lidového, ale i oficiálního léčitelství. V současnosti bylo množství údajných účinků vyvráceno studii a důkazy o obsahu látek těchto rostlin a jejich účincích na lidský organismus. Dlouhou dobu byl upřednostňován vývoj a studium chemických struktur jako léčiv, dnes lze ale pozorovat nárůst zájmu o tradiční medicíny, studium biologické aktivity a mechanismů účinků přírodních látek a jejich směsí. Nové informace tak mohou položit základ pro tvorbu nových terapeutických možností a odhalení zásadních lékových interakcí. (Chang 2009, Lüllmann et al. 2012)

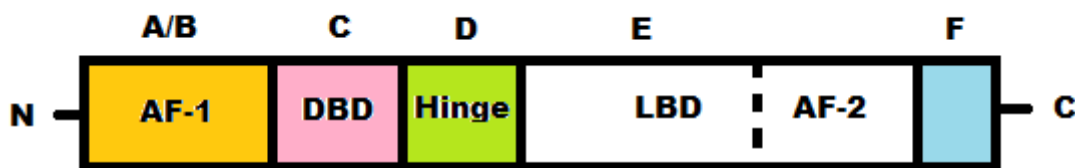
Biotransformace látek přijímaných ze stravy, podávaných ve formě léčiv nebo tvořených v těle, může být ovlivněna jejich interakcí se strukturami označovanými jako nukleární receptory. Ty tak představují potenciální terapeutické cíle a jejich existence je nezbytná pro množství biologických procesů. Současný výzkum se tak stále více zabývá identifikací látek, které s nukleárními receptory interagují a prostřednictvím tohoto mechanismu vykazují farmakologickou aktivitu, případně vyvolávají zásadní lékové interakce. Tato práce se zabývá farnesoidním X receptorem a jeho interakcí s vybranými anthocyanidiny a vybranými alkaloidy z *Fumaria officinalis*. Vazba těchto látek na farnesoidní X receptor by pak mohla představovat mechanismus jejich působení v organismu prostřednictvím následné regulace exprese genů, jež dále ovlivňují fyziologické a patologické procesy lipidového a glukózového metabolismu, vývoj aterosklerózy jako zánětlivého procesu. Současné studie také poukazují na zásadní roli FXR jako potenciálního cíle v léčbě steatózy jater, zánětlivých onemocněních, metabolického syndromu, kardiovaskulárních chorob souvisejících s tímto syndromem. Výsledky ovlivnění FXR zkoumanými strukturami by tak mohly představovat zajímavý směr v podpoře či samotné léčbě tzv. civilizačních chorob. (Chang 2009, Lüllmann et al. 2012, Stibotová et al. 1999).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

Do nadrodiny nukleárních receptorů zahrnujeme jaderné receptory hormonů, receptory, jejichž ligandy byly nalezeny až po jejich popisu a tzv. „sirotčí“ receptory, u kterých není dosud žádný ligand znám (Murray et al. 2012).

3.1.1 Struktura nukleárních receptorů



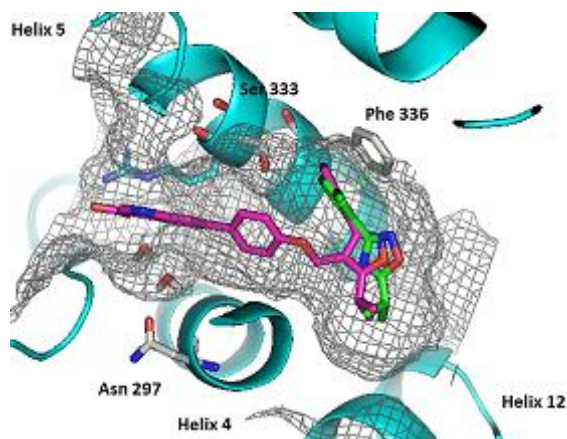
Obr. 1 Nadrodina jaderních receptorů. Členové této rodiny jsou rozděleni do šesti strukturních domén (A-F). Doména A/B je také nazývána AF-1 či modulační oblast, jelikož se účastní aktivace transkripce. C-doména se skládá z DNA-vazebné domény (DBD). Oblast D obsahuje hinge-region, který zajišťuje flexibilitu mezi DBD a ligand-vazebnou doménou (LBD, oblast E). C-terminální část oblasti E obsahuje AF-2, další doménu důležitou pro transaktivaci. Oblast F je špatně definovaná (Upraveno dle Murray et al. 2012).

Mezi společné strukturní znaky patří centrálně lokalizovaná DNA-vazebná doména (DBD). Díky ní se receptor může vázat na hormon responsivní element (HRE) s vysokou afinitou. DBD je tvořena dvěma vazebnými motivy zinkových prstů. Ty existují ve formě monomerů, homodimerů a heterodimerů, a řídí tak vazbu. Cílový HRE je tvořen jedním nebo dvěma polovinami sekvence DNA v podobě obrácené či přímé repetice. Ligand-vazebná doména (LBD) se nachází na c-terminální části receptoru. Selektivně váže hormony či metabolity, a tím specifikuje biologickou odpověď. Její součástí jsou dále domény zprostředkovávající navázání heat-shock proteinů, dimerizaci, nukleární lokalizaci a transaktivaci. Ta je ulehčena samotnou transaktivací c-terminální části (AF-2 doména), jež je nezbytná pro interakci s koaktivátory. DBD je od LBD oddělena flexibilní oblastí ohybu – tzv. „hinge“ regionem, který je vysoce variabilní. Vzhledem k flexibilitě této oblasti je umožněna rovněž variabilita v DNA-vazebných konformacích. Druhou vysoce variabilní funkci AF-1 nalezneme v N-terminální části. Dochází zde k vazbě koagulačních proteinů, a tím i k různým

fyziologickým funkcím. Zde je umožněna iniciace translace izoformy receptoru díky promotorům, alternativním místům sestřihu, a počtu míst. Ty sdílí stejně LBD a DBD, ale vzhledem k možnému spojení s různými koagulátory v N-terminální AF-1 doméně umožňují různé fyziologické odpovědi (Obr. 1) (Murray et al. 2012).

Způsob dělení receptorů je různý. Dle způsobu vazby na HRE rozlišujeme klasické receptory pro glukokortikoidy, mineralokortikoidy, estrogeny, androgeny a progestiny, jež se vážou jako homodimery na opačné repetice. Receptory ostatních hormonů např. tyreoidálních, kyseliny retinové, vitamínu D a receptory vážící jiné metabolity, jako je PPAR α , β , γ , FXR, LXR, PXR/SXR a CAR, vytvářejí heterodimer s retinoidním receptorem X jako partnerem přímé repetice. Sirotčí receptory se potom váží jako homodimery či monomery na sekvence přímých repetic. Objev jaderných receptorů byl zásadní pro pochopení ovlivnění genové regulace metabolity a xenobiotiky, a tím také látkové transformace, detoxifikace a odstranění běžných produktů a exogenních látek a nacházení nových terapeutických cílů a postupů (Murray et al. 2012).

3.2 FARNESOIDNÍ X RECEPTOR (FXR)



Obr. 2 Krystalová struktura látky v komplexu s FXR-LBD : Isoxazolová skupina této látky a jejich dvou substituentů jsou zaměřeny na helix 11 a 12, které jsou esenciální pro aktivaci FXR (Převzato z Flesch et al. 2015).

Farnesoidní X receptor (FXR, NR1H4) byl původně identifikován jako tzv. sirotčí hormonální nukleární receptor (Obr. 2). Později byla zjištěna jeho schopnost vazby žlučových kyselin jako fyziologicky relevantních ligandů. FXR je primárně exprimován v játrech, ledvinách a střevě a dalších tkáních bohatých na cholesterol jako jsou nadledviny (Schuster et al. 2011, Wang et al. 2006, Ma et al. 2006).

Tento na ligandu závislý transkripční faktor je členem superrodiny nukleárních hormonálních receptorů, jež zahrnují vysoce konzervativní DNA-vážíci doménu na N-terminálním regionu a mírně konzervativní ligand-vážíci doménu na C-terminálním regionu. Dvě aktivační funkce, jedna na ligandu nezávislá (AF-1) a jedna na ligandu závislá (AF-2), jsou příslušně situovány v N-terminálních a C-terminálních regionech. Dva cisteinem koordinované Zn výběžky, lokalizované v DNA vážíci doméně, jsou kritické pro vazbu DNA a dimerizaci. Při regulaci genové exprese FXR vytváří buď heterodimer s RXR, 9- cis- retinoovým kyselinovým receptorem, nebo homodimer (Schuster et al. 2011, Ma et al. 2006).

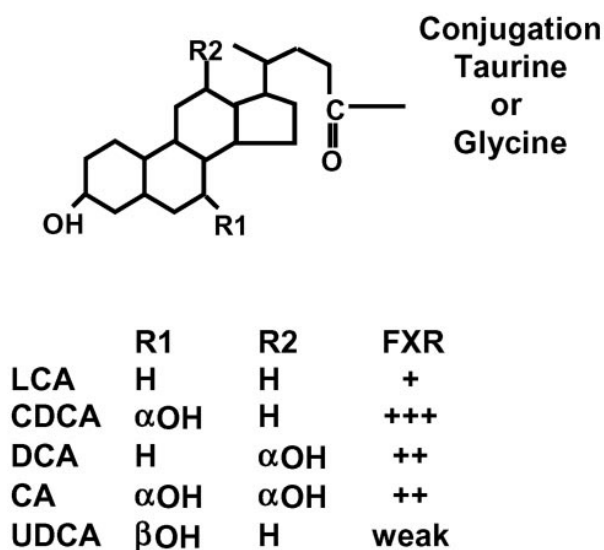
3.2.1 Role FXR v metabolismu žlučových kyseliny

ŽK jsou syntetizovány z cholesterolu v játrech. Biosyntetické kroky, jež vedou ke konverzi ve vodě nerozpustných molekul cholesterolu na ve vodě více rozpustné sloučeniny, také udělují ŽK detergentní vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou zásadní pro

fyziologické funkce u žlučových formací včetně intestinální tukové absorpce (Claudel et al. 2005).

Ke žlučovým kyselinám je stále častěji přistupováno jako ke komplexu metabolických integrátorů a signálních faktorů a ne jen jako molekulám zodpovědným za lipidovou solubilizaci a regulaci homeostázy cholesterolu. Proto není překvapující, že se řada signálních drah aktivovaných žlučovými kyselinami stala atraktivními terapeutickými cíli metabolických poruch. Tyto cesty mohou být využívány při vývoji léčiv na léčbu obezity, DM2, hypertriglyceridemii a aterosklerózu, stejně jako asociovaných chronických onemocnění jako je například nealkoholová steatohepatitida (Thomas et al. 2008).

ŽK jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem sekvenčním působením enzymů žlučových kyselin, a to ŽK-koenzym A (CoA)-syntetázy (BACS) a ŽK-CoA aminokyselinové N-acetyltransferázy (BAT). Dochází tak ke zvýšení jejich hydrofility v procesu regulovaném FXR (Claudel et al. 2005).

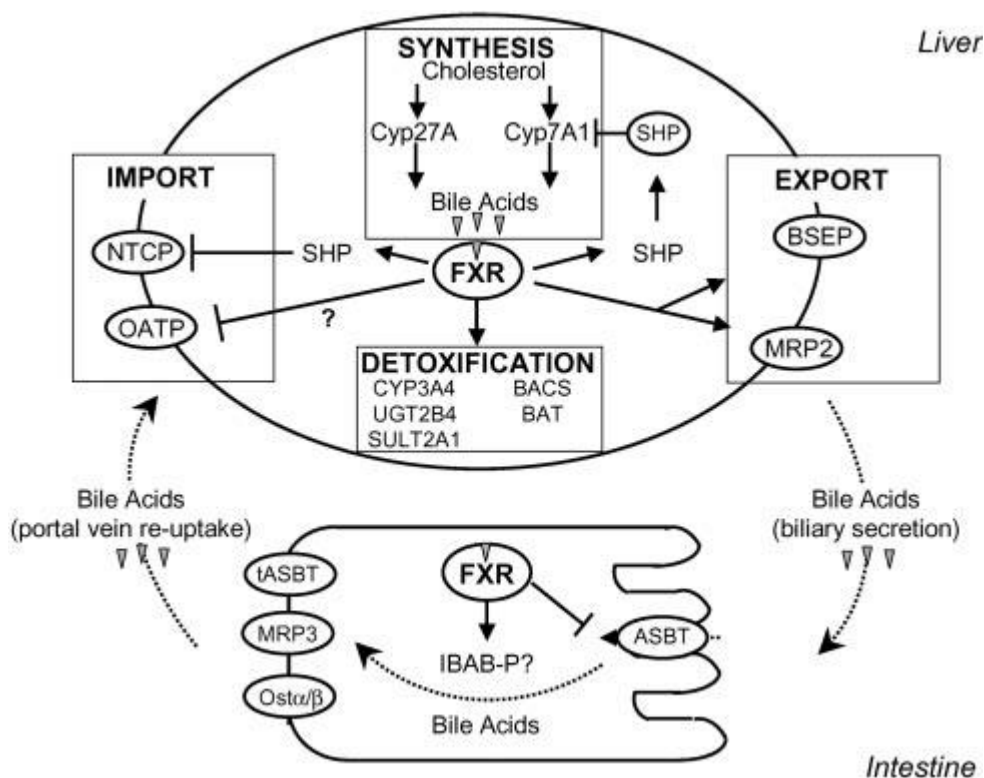


Obr. 3 Strukturní a aktivační potence žlučových kyselin na lidský FXR. Převzato z Claudel et al. 2005

Konjugované žlučové kyseliny potřebují pro cyklický proces redistribuce mezi játry a střevy transportérovou síť. Tento cyklus je do určité míry pod kontrolou FXR (Obr. 3). Po konjugaci jsou ŽK aktivně vylučovány hepatocyty do žlučových kanálků vedoucích do intrahepatálních žlučových duktů. Tento děj probíhá díky exportní pumpě žlučových kyselin (BSEP nebo ABCB11) prostřednictvím ATP dependentních procesů.

Následně jsou pak ŽK skladovány v žlučníku a vyloučeny do střevního lumenu jako reakce při příjmu jídla obsahujícího tuk. V tenkém střevě se ŽK chovají jako detergenty, emulgují a usnadňují absorpci tuků a vitaminů rozpustných v tucích ze stravy. 95% žlučových kyselin se vrací do jater, aby byly opět vyloučeny do žluče, čímž uzavírají enterohepatální cirkulaci, zatímco 5% přechází do výkalů. Frakce ztracená během cyklu je kompenzována jejich syntézou z cholesterolu, čímž zůstává zásoba žlučových kyselin konstantní (Ananthanarayanan et al. 2001, Claudel et al. 2005, Kuipers et al. 2007).

Rozlišujeme dvě hlavní cesty, jež jsou zapojeny do syntézy žlučových kyselin, tzv. neutrální a kyselá cesta. CYP7A1 je prvním a rychlost kontrolujícím enzymem neutrální cesty a je částečně kontrolován přes negativní zpětnovazebnou smyčku žlučových kyselin. CYP27A1 je hlavním enzymem kyselé cesty, jež není tímto způsobem regulován žlučovými kyselinami. (Obr. 4) Existence obou cest je esenciální pro regulaci exprese CYP7A1 a CYP8B1 (Wang et al. 2006).



Obr. 4 Přehled cirkulace žlučových kyselin mezi játry a střevy. FXR negativně reguluje produkci žlučových kyselin potlačením CYP7A1 rychlost limitujícím enzymem syntetické cesty. FXR indukuje expresi BACS a BAT, jež jsou zapojené do konjugace žlučových kyselin. FXR aktivuje expresi exportního transportéru žlučových kyselin MRP2 a BSEP a simultánně potlačuje import žlučových kyselin snížením regulace NTCP a možná OATP-C. FXR indukuje také expresi CYP3A4, UGT2B4 a SULT2A1 enzymů zapojených do detoxifikace žlučových kyselin. Sulfatované/glukuronované žlučové kyseliny jsou exportované transportérem MRP2 do kanalikulů. Na úrovni střeva FXR indukuje expresi IBAB-P, potenciálního kyvadla žlučových kyselin, a ovlivňuje import žlučových kyselin ovlivněním sítě transkripčních faktorů kontrolujících ASBT (Claudel et al. 2005).

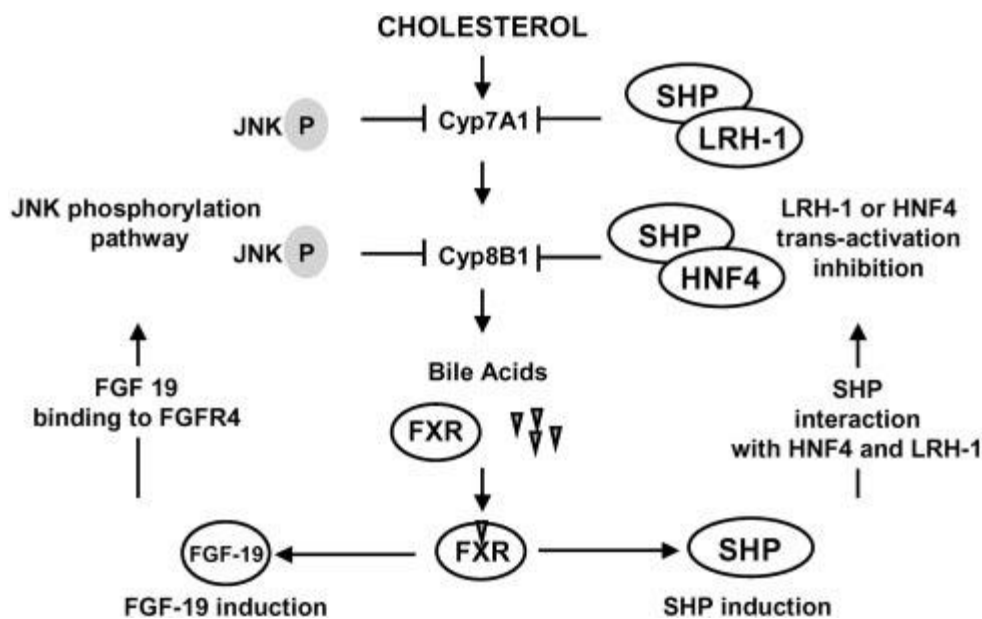
FXR je silně zapojen do regulace cílové genové exprese zásadní pro biosyntézu žlučových kyselin a jejich transport, a to regulací dvou cest (Kuipers et al. 2007, Schuster et al. 2011, Wang et al. 2006).

První cestou je FXR vazba na žlučové kyseliny uvnitř hepatocytů, kdy dochází k jeho konformační změně. Aktivovaný FXR následně indukuje expresi tzv. sirotčího nukleárního hormonálního receptoru – malého heterodimerního partnera (SHP, NR0B2), netypického člena rodiny nukleárních receptorů, kterému chybí DNA vázající doména. Zvýšené hladiny SHP vedou k inhibici exprese cholesterol 7 α -hydroxylázy (CYP7A1) a sterol 12 α -hydroxylázy (CYP8B1), dvou enzymů v syntéze žlučových

kyselin hrající zásadní roli v regulaci syntézy a složení zásoby žlučových kyselin (Claudel et al. 2005, Schuster et al. 2011, Wang et al. 2006, Ma et al. 2006).

K potlačení exprese CYP7A1, rychlost limitujícího enzymu v konverzi cholesterolu na žlučové kyseliny, dochází prostřednictvím interakce SHP s dvěma dalšími nukleárními receptory, které transaktivují expresi CYP7A1 prostřednictvím BARE regionu, tj. jaterního nukleárního faktoru 4 (HNF4 nebo NR2A1) a jaterní receptorového homologa 1 (LRH-1 nebo NR5A2). SHP represe genové transkripce CYP7A1 je realizována disociací koaktivátorů navázaných na HNF4 a LRH-1- stejně jako histonovou deacetylací promotoru (Obr. 8) (Boulias et al. 2005, Claudel et al. 2005, Schuster et al. 2011,3).

CYP8B1 je enzymem kontrolujícím 12- hydroxylaci a hydrofobní charakter zásobních žlučových kyselin. Usuzuje se, že je také pod negativní regulací žlučových kyselin, pravděpodobně prostřednictvím SHP/HNF4 α independentních mechanismů (Obr. 5) (Claudel et al. 2005).



Obr. 5 Přehled mechanismů potlačení syntézy žlučových kyselin působení FXR. Po vazbě žlučových kyselin FXR indukuje expresi SHP, jež interaguje s LRH-1 nebo s HNF4 α , což vede ke snížení transkripce CYP7A1 a CYP8B1. Simultánně FXR indukuje expresi FGF-19. FGF-19 interaguje s jejím příbuzným receptorem FGFR-4 a negativně tak reguluje produkci žlučových kyselin potlačením genové exprese CYP7A1 a CYP8B1 interferencí s JNK cestou (Claudel et al. 2005).

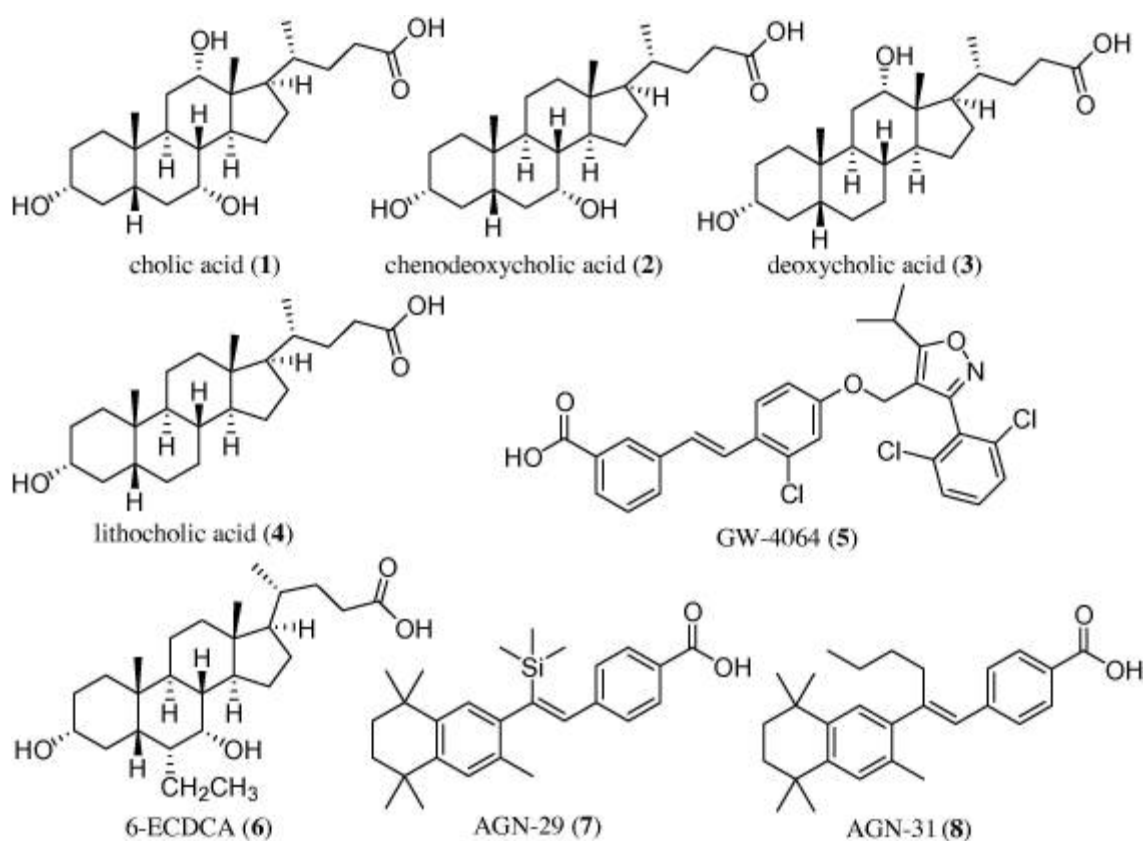
Druhou cestu regulace představuje aktivace FXR žlučovými kyselinami v ileu, jež indukuje expresi fibroblastového růstového faktoru 15 u myši a fibroblastového růstového faktoru 19 (FGF-19) u lidí. FGF-19 potlačuje CYP7A1 prostřednictvím c-Jun N-terminální kinázové aktivace (Obr. 5) (Wang et al. 2006, Claudel et al. 2005).

Aktivovaný FXR reguluje geny kódující protein, který váže intestinální žlučové kyseliny (IBABP), a exportní pumpu pro žlučové kyseliny (BSEP) (Schuster et al. 2011).

Studie u myši bez malého heterodimerního partnera (SHP) potvrdily důležitost této nukleární receptorové cesty při negativní regulaci syntézy žlučových kyselin a také odhalily SHP nezávislou cestu (Schuster et al. 2011).

BSEP mutace jsou základem progresivní familiární intrahepatické cholestázi typu II (PFIC II), vrozené cholestatické jaterní nemoci. Exprese BSEP je vyvolána FXR na úrovni transkripce. Aktivace FXR v hepatocytech potlačuje de novo syntézu žlučových kyselin, urychluje biliární exkreci a detoxifikaci a simultánně omezuje jejich import. FXR může být považován za senzor žlučových kyselin, který umožňuje udržení funkční jednotky enterohepatální cirkulace žlučových kyselin a protekci jaterních buněk před potenciálními škodlivými následky buněčného přetížení žlučovými kyselinami (Claudel et al. 2005).

Klíčovými žlučovými kyselinami u lidí je skupina primárních žlučových kyselin s cholovou kyselinou (CA, 1), chenodeoxycholovou kyselinou (CDCA, 2), stejně jako jejich glycinové a taurinové konjugáty a skupina sekundárních žlučových kyselin s deoxycholovou kyselinou (DCA, 3) a lithocholovou kyselinou (LCA, 4) (Obr. 6). Několik syntetických ligandů FXR ligandů bylo dále získáno v rámci biomolekulárních výzkumů. Jednalo se například o GW4064, 6-ethylchenodeoxycholovou kyselinu, AGN-29 a AGN-31 (Obr. 6) (Schuster et al. 2011).



Obr. 6 Příklady endogenních (1-4) a syntetických (5-8) ligandů FXR. Upraveno dle Schuster et al. 2011

3.2.2 Role FXR v řízení lipidového metabolismu

Jedna ze zásadních rolí FXR, je jeho uplatnění v lipoproteinovém metabolismu. Toto bylo pozorováno při identifikaci genové regulace fosfolipidového trasférového proteinu, apoC-II, apoC-III a apoA-I jako cílů FXR a potvrzeno demonstrací alterovaného lipidového metabolismu u FXR^{-/-} myši. U nich byla zaznamenána elevace hladin plazmatického cholesterolu a triglyceridů a nadměrná akumulace tuku v játrech. Ztukovatění jater nebo hepatická steatóza je jedno z nejběžnějších jaterních onemocnění u lidí a je spojeno s defekty v insulinové činnosti nesouvisející s celkovou hmotností těla. Proto pacienti s DM typu 2 se ztukovatělými játry vykazují podstatně významnější insulin rezistentní výsledky a mají vyšší hladiny plazmatických mastných kyselin než pacienti bez těchto obtíží. Přesný mechanismus mapující ztukovatění jater a diabetes nicméně není dosud dostatečně znám (Cariou et Staels 2007, Ma et al. 2006, Claudel et al. 2005).

V rámci studií bylo pozorováno, že polymorfismus CYP7A1 promotorů u lidí je hlavní determinantou ve variabilitě koncentrací plazmatického LDL. Ztráta aktivity

FXR má zásadní vliv na plazmatické hladiny cholesterolu a následný vývoj aterosklerózy u myši. Při aktivaci FXR byla sledována redukce plazmatických triglyceridových hladin s předpokládaným vícenásobným mechanismem zahrnujícím elevaci exprese apolipoproteinu CII (apoCII), represi exprese apoCIII a modulaci exprese sterolového regulačního elementu vážícího protein 1. Aktivita FXR tak hraje významnou roli v modulaci celkového lipidového profilu (Wang et al. 2006).

Sekvestranty vážící žlučové kyseliny v intestinálním lumen brání absorpci ŽK a přerušují enterohepatální cirkulaci. Ileální resekce má podobný efekt. Jako přímý následek exprese CYP7A1 dochází k potlačení represe a konverze cholesterolu na žlučové kyseliny je stimulována. Deplece jaterního (mikrosomálního) cholesterolu vede ke zvýšení aktivity SREBP2 (sterolového regulačního element vážícího proteinu 2), jež vede k indukci exprese LDL receptoru, který odpovídá za pokles celkového a LDL cholesterolu (Claudel et al. 2005).

3.2.3 Role FXR v metabolismu triglyceridů

U FXR deficientních myši krměných běžnou stravou byla pozorována hypertriglyceridemie, což vedlo k myšlence, že FXR hraje roli v kontrole triglyceridového metabolismu. Sérové hladiny triglyceridů reflektují s rovnováhou mezi produkcí a clearance lipoproteinů, VLDL a chylomikronů. Protože je lipoproteinová lipáza (LPL) klíčovým enzymem zapojeným do lipolýzy těchto částic, byly sledovány účinky FXR aktivace na LPL kofaktory. Apolipoprotein (apo) C-III je inhibitorem LPL, zatímco apoC-II a apoA-V (nedávno objevený apolipoprotein) jsou LPL aktivátory. Aktivace FXR indukuje expresi apoC-II a promotérovou aktivitu lidského apoA – V v jaterních buňkách. U přírodních a syntetických agonistů bylo pozorováno potlačení exprese apoC-III u myších i lidských primárních hepatocytů. Promotérová analýza společně s chromatinovou imunoprecipitační analýzou ukázala, že FXR/RXR heterodimer potlačuje expresi apoC-III. Navíc FXR indukuje expresi VLDL receptoru, proteinu hrajícího zásadní roli v metabolismu postprandiálních lipoproteinů, zvýšením triglyceridové hydrolýzy zprostředkované LPL. Byla pozorována zvýšená citlivost FXR na expresi syndecan-1 transmembránového proteinu, jež váže zbytek částic před jejich transferem na receptory. FXR tak kontroluje řadu genů zásadních pro triglyceridový metabolismus v krevním traktu. U lidí také překvapivě FXR reguluje expresi PPAR- α , jež je sám aktivován mastnými kyselinami a fibráty. Vzhledem k tomu, že PPAR- α

aktivace vede ke snížení hladiny plazmatických triglyceridů, pravděpodobně i FXR kontroluje žlučové kyseliny a triglyceridový metabolismus přímo i nepřímo. Celkově tak FXR snižuje hladiny triglyceridů modulací LPL aktivity a indukci PPAR- α u lidí a pravděpodobně inhibicí SREBP1c u myši (Claudel et al. 2005).

3.2.4 Role FXR v glukózové homeostáze

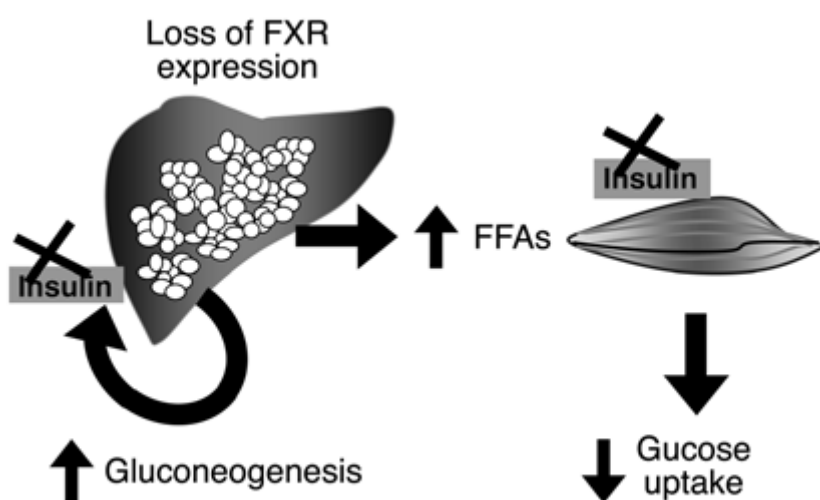
První důkazy o spojení mezi žlučovými kyselinami a glukózovým metabolismem se objevily u krátkodobých studií u pacientů s neinsulindependentním diabetem mellitem. Pacientům s vysokým LDL cholesterolem ale normálními hladinami triglyceridů byl kromě glyburidu či insulínu také podáván cholestyramin nebo placebo. Cholestyramin vedl ke snížení plazmatické glukózy a snížení glukózové exkrece močí s tendencí ke snížení koncentrace glykosylovaného hemoglobinu. Ve stejném čase cholestyramin redukoval celkový a LDL cholesterol a zvyšoval triglyceridové hladiny. Studie demonstrovaly spojení mezi hladinami triglyceridů a onemocněním žlučníku. Vzhledem k tomu, že FXR kontroluje triglyceridový metabolismus a protože je hypertriglyceridemie spojená s DM2 a složení žluče je u diabetických pacientů pozměněné, vzniklo tak potenciální spojení mezi FXR a glukózovým metabolismem (Ma et al. 2006, Claudel et al. 2005).

U kultivovaných hepatocytů glukóza indukovala FXR genovou expresi. Při experimentu navíc glukózy a syntetický agonista FXR GW4064 potlačovali expresi apoC-III. Současné studie ukázaly, že žlučové kyseliny modulují glukoneogenezi regulací exprese rychlost kontrolujícího enzymu fosfoenolpyruvátkarboxykinázy (PEPCK) stejně jako glukózo-6-fosfatázy (G6Pázy) a fruktózo-1,6-bifosfatázy (FBP1). Při hladovění a indukci glukoneogeneze byla zvýšena exprese Cyp7a1, Pcpk a Ppara a FXR (Ma et al. 2006, Claudel et al. 2005).

Pro další prozkoumání role FXR v glukózové homeostáze byl porovnán glukózový metabolismus u WT a FXR^{-/-} myši. U FXR^{-/-} myši byla sledována narušená glukózová tolerance, snížená glukózová senzitivita a významně zpomalená reakce kosterních svalů a jater. Na druhou stranu aktivace FXR cholovou kyselinou (CA) ze stravy vedla k potlačení exprese mnohých genů zapojených do glukoneogeneze a snížení glukózové hladiny. Výsledky odhalily, že FXR je nutný pro udržení normálního glukózového metabolismu a poskytuje specifické molekulární spojení mezi ztukovatěním jater a insulinovou rezistencí. FXR^{-/-} myši představují unikátní zvířecí

model pro prozkoumání role ztukovatění jater v souvislosti s metabolickým syndromem (Ma et al. 2006).

Výsledky další studie poskytly 2 nezávislé, ale spolu související linie důkazů, že receptor pro žlučové kyseliny FXR je klíčovým regulátorem glukózového metabolismu *in vivo* (Obr. 7). Ztráta FXR narušuje normální glukózovou homeostázu a vede k rozvoji insulinové rezistence projevující se hyperglykemií, narušenou glukózovou tolerancí a vážně zeslabenou insulinovou signalizací v játrech a svalech. To je spojeno se zvýšením sérových triglyceridů a lipidovou akumulací u FXR^{-/-} jater, což je připisováno zvýšené jaterní lipidové produkci (Obr. 7) (Cariou et Staels 2007, Ma et al. 2006).



Obr. 7 Dysregulace glukózové homeostázy v játrech a kosterním svalstvu FXR^{-/-} myší. Ztráta funkce FXR v játrech vede ke zvýšení jaterní lipidové akumulace a zvýšení volných mastných kyselin v séru. Insulinová rezistence v játrech, která nedokáže potlačit glukoneogenezi v kosterním svalstvu, kde redukuje glukózový uptake, přispívá k dysregulaci glukózové homeostázy u FXR^{-/-} myší (Ma et al. 2006).

Intestinální FXR pozitivně ovlivňuje glukózovou homeostázu. Proto aktivace intestinálního FXR v myším distálním ileu indukuje uvolňování fibroblastového růstového faktoru 15 (lidským orthologem je FGF19), hormonu, který je secernován do portální cirkulace a který vede játra k navázání receptoru fibroblastového růstového faktoru 4, potlačení syntézy žlučových kyselin a expresi glukoneogenických genů. Mechanismus ukazuje křížovatku mezi střevy a játry při regulaci jaterní glukózové produkce a představuje tak atraktivní farmakologický cíl (Obr. 12) (Mencarelli et al. 2013).

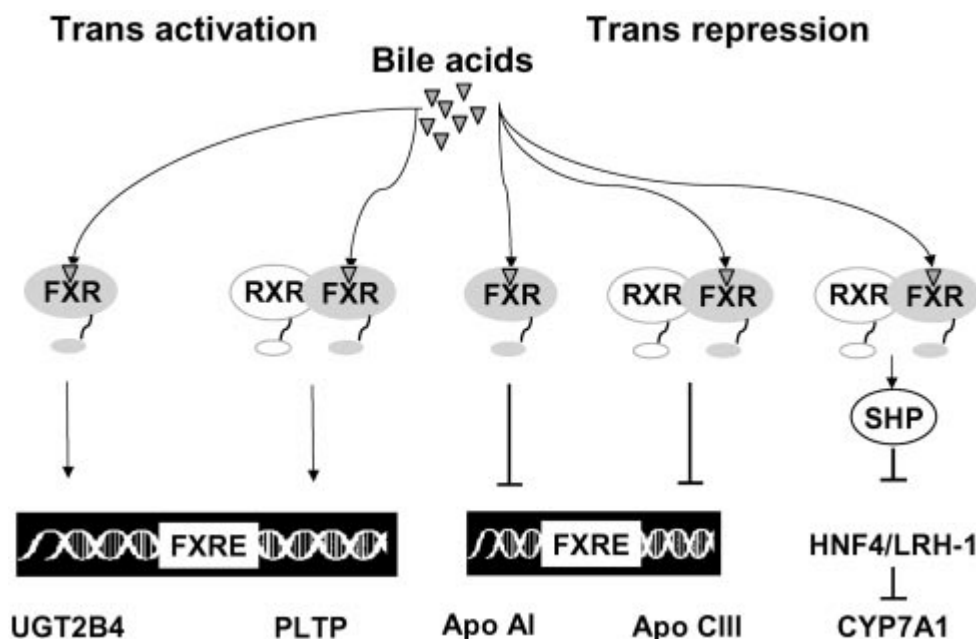
3.2.5 FXR a jeho ligandy

FXR je fyziologický regulátor řady metabolických a zánětlivých cest. FXR je zapojený do glukózové homeostázy, transportu mastných kyselin a metabolismu triglyceridů a cholesterolu, ochrany jater, střevních zánětů a řady forem rakoviny (Flesch et al. 2015).

Jako ligandy FXR a modulátory *in vitro* se projevují polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jako arachidonová, linolenová nebo dokosahexaenová kyselina stejně jako meziproducty syntetických cest žlučových kyselin. U triterpenoidů jako forskolin bylo sledováno snížení aktivity FXR (Claudel et al. 2005).

Prvním semisyntetickým agonistou byl 6-ethyl-CDCA (6-ECDCA), který byl zkoumán v rámci klinického výzkumu ukazujícího povzbuzující data pro léčbu primární biliární cirhózy, nealkoholického tukovatění jater a nealkoholické steatohepatitidy. Jako zajímavým syntetický ligandem byl základě informací o FXR a jeho účincích vyvinut GW4064. Kromě těchto a jiných syntetických sloučenin byla identifikována řada látek přírodního původu jako potenciálních ligandů a modulátorů FXR. Tyto sloučeniny zahrnují např. E a Z guggulsteron, stigmasterol a jejich 3- acetáty. (Obr. 12) (Li et al. 2012, Schuster et al. 2011).

Strukturální odlišnost syntetických FXR ligandů jako je GW4064 a fexaramin má odlišný efekt na celkovou genovou regulaci v hepatocytech. Na základě toho vznikl koncept, že odlišné ligandy mohou přemístit FXR-LBD do jiné konformace, což vede ke změně v genové regulaci. Po vazbě ligandu se FXR váže na elementy DNA zvané jako FXR responsivní elementy (FXREs). FXR se může vázat jako monomer nebo jako FXR/RXR heterodimer (Obr. 8) (Claudel et al. 2005).



Obr. 8 Různé modely FXR genové regulace. FXR může indukovat transkripci jako monomer (UGT2B4) nebo heterodimer s RXR (PLTP). FXR může potlačit nepřímo indukce SHP (CYP7A1) nebo přímo monomer (apoA-1) nebo heterodimer (apoC-III) (Claudel et al. 2005).

Současná identifikace některých FXR kofaktorů společně s popisem LBD struktury pomůže odhalit jak je FXR komplex stabilizován a reaguje s RNA polymerázou II při modulaci transkripční aktivity. FXR je exprimován z jednotlivých genových míst u lidí (chromosomy 12q23.1). Dva alternativní promotory vedli k expresi 4 isoformů zvaných FXR α 1/FXR α 2 a FXR α 3/FXR α 4 (odkazující k FXR β 1/FXR β 2), jež nejsou ekvivalentní z hlediska genové transaktivace. Nukleární receptor aktivovaný lanosterolem byl nazývaný FXR β (Claudel et al. 2005).

3.2.6 FXR a ovlivnění onemocnění

Metabolický syndrom byl definován jako souhrn alespoň 3 z 5 kritérií: inzulínová rezistence, glukózová intolerance, abdominální obezita, hypertenze, nízká hladina HDL cholesterolu a hypertriglyceridemie. Vzhledem ke spojení s predispozicí kardiovaskulárních onemocnění jsou stále hledány nové slibné terapeutické strategie. Z tohoto důvodu byla diskutována možnost využití FXR – modulátora lipidového a glukózového metabolismu (Claudel et al. 2005).

Ukázalo se, že syntetičtí FXR agonisté chrání proti vývoji aortálních plakových formací v myších modelech s proatherogenním lipoproteinovým profilem a akcelerovanou aterosklerózou (Schuster et al. 2011).

Regulační role v glukózovém a lipidovém metabolismu a navíc komplexní architektura činí FXR nukleární receptor atraktivním cílem pro výzkum nových bioaktivních sloučenin se schopností kontrolovat endogenní cesty v úzkém vztahu k nemocem zahrnujícím metabolický syndrom, dyslipidemii, aterosklerózu a diabetes typu 2 (Schuster et al. 2011).

Jak již bylo zmíněno, aktivace FXR steroidními a nesteroidními ligandy podporuje sekreci žlučových kyselin aktivací transportérů žlučových kyselin v apikální membráně hepatocytů. Tyto efekty jsou koordinovány s redukcí příjmu žlučových kyselin basolaterální membránou. Nicméně FXR agonisté interferují s regulační aktivitou CAT na hepatocytárních basolaterálních transportérech. Protože tyto účinky mohou zhoršit jaterní zranění u podskupiny pacientů s obstruktivní cholestázou, vývoj FXR antagonistů by mohl mít klinickou relevanci. Studie vztahu mezi strukturou a aktivitou ukázaly, že dostupní FXR antagonisté jsou slabě specifictí pro FXR, nicméně specifictí antagonisté FXR, jež jsou v současnosti užívány v preklinických modelech jaterního poškození, byly identifikovány u mořských organismů. Kombinace mezi FXR agonisty a CAR a PXR agonisty může představovat nástroj při léčbě pacientů s jaterními poruchami (Fiorucci et al. 2012).

Současné důkazy také ukazují klíčovou roli FXR v apoptóze a rakovině. Deficit FXR podporuje intestinální zánět a tumorigenezi, což naznačuje, že aktivace FXR by mohla představovat slibnou strategii při léčbě rakoviny kolonu. Deficit FXR u myši tak například vedl k vývoji spontánního hepatokarcinomu. Naopak inhibice FXR by mohla reprezentovat nový terapeutický přístup u Barrettova jícnu. U buněčných linií rakoviny prsu FXR agonisté vedly ke snížení exprese genu aromatázy u rakoviny prsu. FXR inhiboval Leidigův tumorózní růst a progresi, podporující důkaz, že FXR může být důležitým regulátorem androgenní homeostázi. Nicméně jsou nutné další studie pro prověření protirakovinných účinků tohoto receptoru (Koutsounas et al. 2012).

3.3 Přírodní látky reagující s FXR receptorem

3.3.1 *Ganoderma lucidum*



Obr. 9 *Ganoderma lucidum*. Převzato z: <http://www.biolib.cz/cz/image/id179019/>

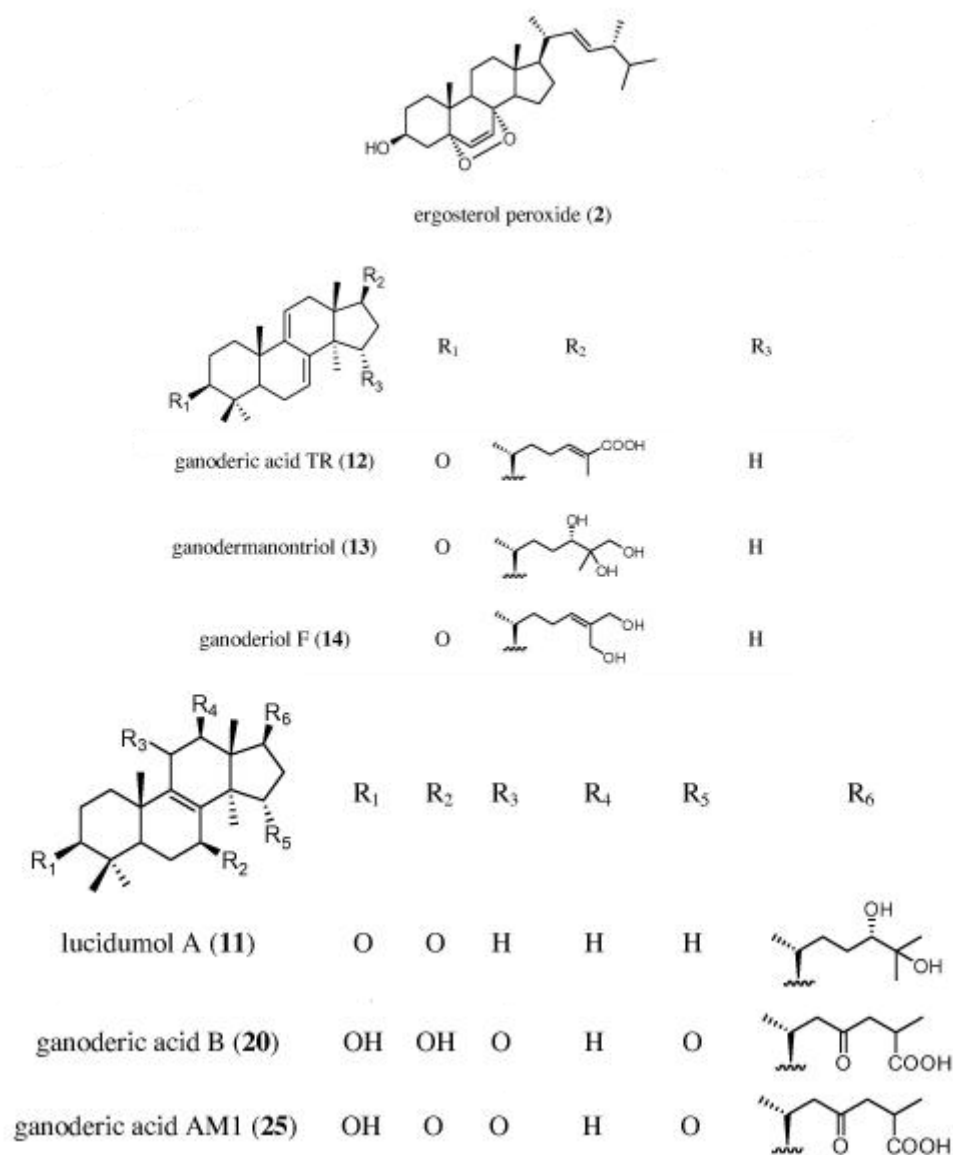
Plodnice *Ganoderma lucidum* Karst. (reushi v Japonsku či língzhí v Číně) (Obr. 9), člena *Ganodermataceae* rodiny, byla a je široce využívána v rámci tradiční asijské medicíny po více než 2000 let. Mnoho studií sloučenin této léčivé houby odhalilo její protirakovinné, imunostimulační, antidiabetické, protizánětlivé, antivirové, antibakteriální, antihypertenziní a hypolipidemické aktivity. Významné farmakologické efekty jsou způsobeny především triterpeny a polysacharidy. Přes 200 triterpenů, definovaných především nenasyceným lanostanovým skeletem, bylo izolováno z *G. lucidum* rodu *Ganoderma*. Vzhledem k širokému spektru farmakologických účinků spojených s velkým množstvím obsažených sloučenin byly mechanismy účinku popsány pouze u několika z nich (Sliva et al. 2012, Grienke et al. 2011).

Virtuální screeningové experimenty databáze čínské přírodní medicíny společně s farmakoforovými modely založenými na struktuře odhalily, že především lanostanový typ triterpenoidů v houbě *Ganoderma lucidum* Karst., může být považován za potenciální ligandy FXR. Pro ověření této domněnky byly použity dva extrakty z plodnice *G. lucidum* - dichloromethanový a methanolový, které byly společně s látkami z nich získanými farmalogicky testovány. Předvídané FXR indukující účinky byly pozorovány při koncentraci 10 µg/ml. Pět lanostanů z 25 sekundárních metabolitů *G. lucidum*, konkrétně ergosterol peroxid (2), lucidumol A (11), ganoderová kyselina TR (12), ganodermanontriol (13) a hanoderiol F (14) v závislosti na dávce indukovalo

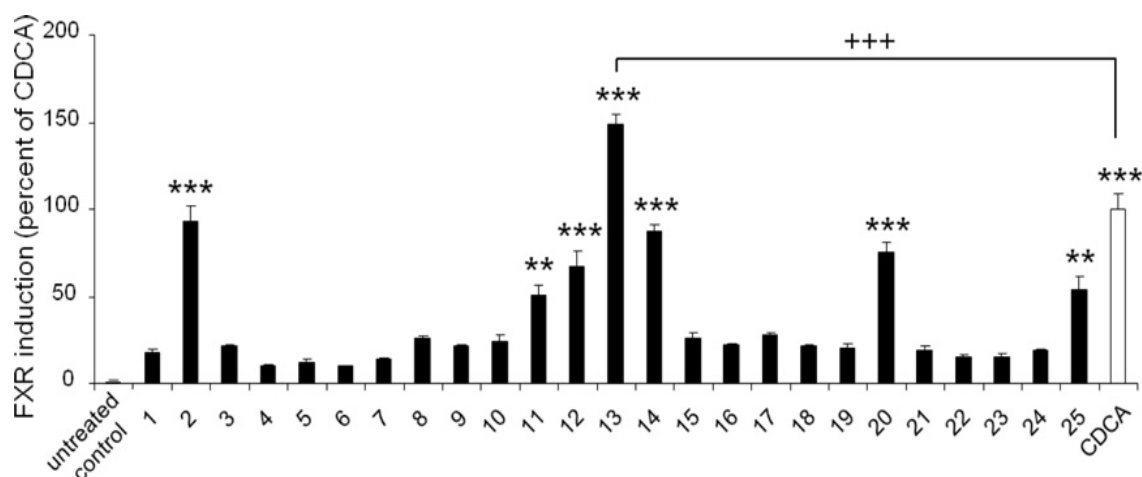
v rámci reportérové genové analýzy FXR v mikromolárním rozsahu (Grienke et al. 2011).

V další studii bylo testováno 25 látek izolovaných z *G. lucidum* pro jejich schopnost indukovat FXR (Obr. 16). S výjimkou tří derivátů mastných kyselin (5-7) se jednalo o triterpeny lanostanového typu, které mohou být dále děleny do ergosterolových derivátů (1, 2, 4), lanostanů s dvojnými vazbami v pozicích 7/8 a 9/11 (3, 9, 12-14) a lanostanů s dvojnou vazbou v pozici 8/9 (8, 10, 11, 15-25) (Sliva et al. 2012, Grienke et al. 2011).

Vybrané sloučeniny byly testované v reportérové genové analýze na schopnost aktivace FXR. Buňkám byly podány sloučeniny z *G. lucidum* nebo pozitivní kontrola CDCA (25 μ M). V testovaných koncentracích 10 μ M dosáhlo 7 sloučenin z *G. lucidum* statisticky významných výsledků a to 2, 12, 13, 14, 20 ($p < 0.001$) a 11, 25 ($p < 0.01$) (Obr. 10, 11) (Grienke et al. 2011).



Obr. 10 Struktury testovaných látek z *G. lucidum*, u kterých byly získány statisticky významné výsledky v souvislosti s aktivací FXR. Upraveno dle Grienke et al. 2011.



Obr. 11 Indukce na FXR závislé transkripci látkami z *G. lucidum* (sloučeniny 1–25, 10 μ M každá). Data (měřené hodnoty \pm SEM, $n = 4-8$) byla normalizována na luciferázovou aktivitu *Renilla reniformis*. Výsledky byly vyjádřeny jako rozdíl v luciferázové aktivitě světlušky mezi kontrolovanými a stimulovanými buňkami, normalizované na účinek u pozitivní kontroly (CDCA, 25 μ M); (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, +++ $p < 0.001$, ANOVA, Bonferroni post-test) (Grienke et al. 2011).

Pro cílově orientovanou selekci přírodních produktů a jejich sloučenin interagujících s FXR byla užitá kombinace na farmakoforech založeného virtuálního screeningu a experimentální validace vícekomponentních směsí. Pět lanostanů bylo identifikováno jako odlišně FXR indukující přírodní látky. Agonistická aktivita těchto sloučenin byla potvrzena užitím dvou nezávislých přístupů, kterými byla promotérová reportérová studie a analýza mRNA hladin FXR regulovaného genu *Cyp7a1*. Inhibice TNF α nebo LPS indukovaná exprese IL-8 a E-selektinu u lidských endoteliálních buněk dokládá protizánětlivý vliv těchto sloučenin. Tyto mechanismy mohou zahrnovat regulaci nukleárního receptoru FXR těmito sloučeninami (Grienke et al. 2011).

3.3.2 *Coptis chinensis*



Obr. 12 *Rhizoma Coptidis*. Převzato z: <http://evidencebasednaturalhealth.weebly.com/coptidis-rhizoma-huanglian.html>

Rhizoma Coptidis (Huang Lian) (Obr. 12) je běžně užívána v tradiční čínské medicíně pro jeho mnohé farmakologické účinky, jakými jsou hypolipidemický, protizánětlivý, antiaterosklerotický a protirakovinný protektivní vliv. Alkaloidy jsou hlavními aktivními látkami této drogy a berberin je jedním z těch zásadních. Berberin upravuje sérový lipidový profil u řady experimentální hyperlipidemických modelů. V současnosti se alkaloidní extrakt z *Rhizoma Coptidis* stal jasnou a klinicky ověřenou čínskou přírodní medicínou pro léčbu dyslipidemie, atherosklerózy a blízkých onemocnění (Kong et al. 2004; Yokozawa et al. 2003, Dong et al. 2011, Wu et al. 2009, Cao et al. 2012).

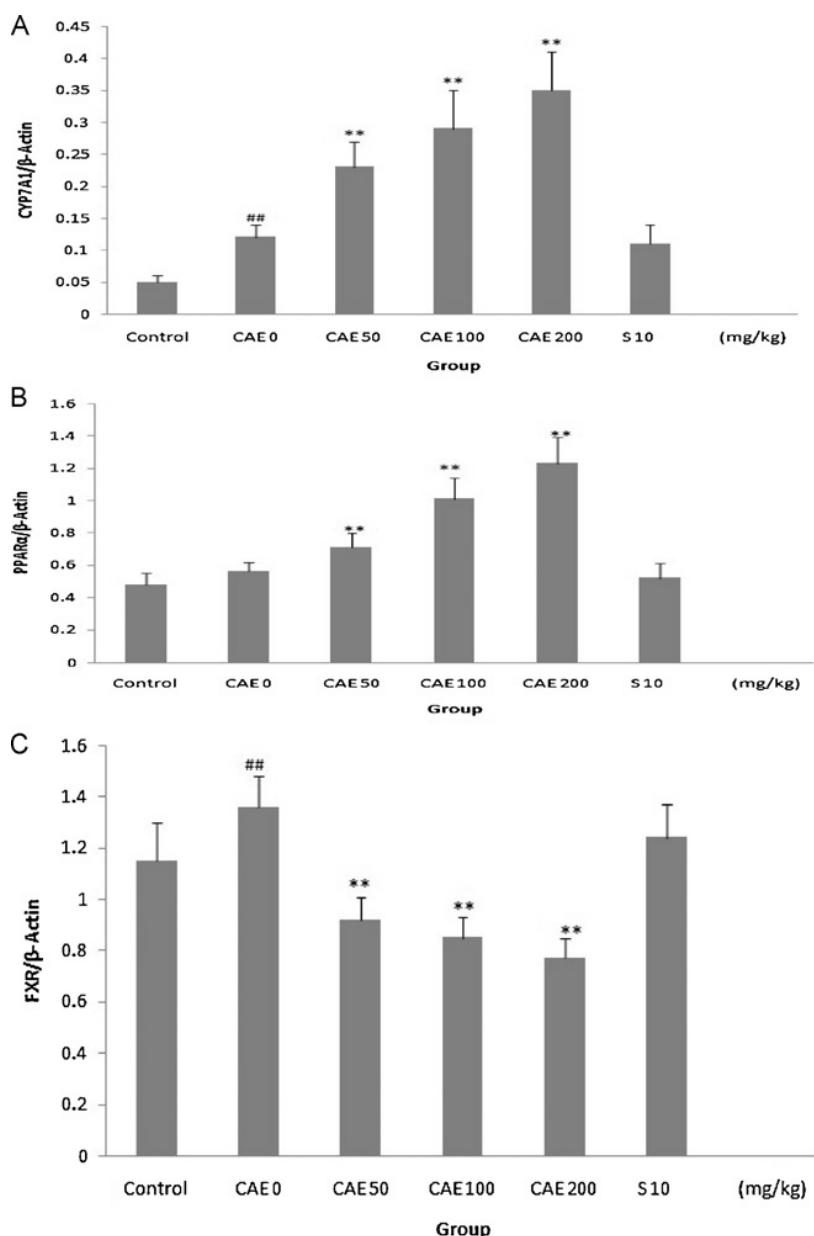
Studie sledovala cholesterol snižující efekt alkaloidů z *Rhizoma Coptidis* u hyperlipidemických potkanů na vysoce tučné stravě. Extrakt alkaloidů této drogy (CAE) byl připraven extrakcí *Rhisoma Coptidis* v alkoholu, tento proces probíhal dle kvalitativních požadavků daných protokolem. U SD potkanů na tučné stravě byl sledován cholesterol snižující efekt CAE. Sérové hladiny lipidů, žlučových kyselin a cholesterolu v játrech a výkalech byly měřeny kolorimetrickým analytickým kitem. Při analýze mRNA a proteinové exprese genů spojených s cholesterolovým metabolismem včetně cholesterol-7-hydroxylázy, PPAR α a FXR u jater potkanů byly užity RT-PCR a Western Blot. Pro posouzení aktivity Cyp7a1 pak byla využita HPLC analýza (Durrington 2003; Arsenault et al. 2009, Cao et al. 2012).

Výsledky ukázaly, že CAE redukoval hladiny celkového sérového cholesterolu, triglyceridů, LDL cholesterolu. Po podání CAE hyperlipidemickým potkanům byla genová exprese Cyp7a1 a jeho aktivita zvýšeně regulována a to v závislosti na dávce.

Při podání CAE hyperlipidemickým potkanům byla exprese mRNA PPAR v závislosti na dávce více regulována a společně s tím došlo ke snížení modulace exprese mRNA FXR v játrech. Výsledky indikují, že cholesterol snižující efekt alkaloidového extraktu z *Rhizoma Coptidis* lze alespoň částečně přičítat jeho podpoře cholesterolové konverze na žlučové kyseliny zvýšenou regulací genové exprese CYP7A1, a proto dochází ke zvýšení jeho aktivity v játrech hyperlipidemických potkanů, což může být spojeno s pozitivní regulací PPAR α a negativní modulací FXR (Durrington 2003; Arsenault et al. 2009, Cao et al. 2012).

Předchozí studie ukázaly, že nová formule složená z *Rhizoma Coptidis* a dalších bylin zlepšuje sérový lipidový profil u hyperlipidemických potkanů na vysoce tučné stravě down regulací HMG-CoA reductázy a upregulací Cyp7a1 (Obr. 13). Alkaloidy *Rhizoma Coptidis* zahrnující berberin, koptisin a epiberberin jsou jedny z důležitých složek nové formule (Guo et al. 2011, Zhong et al. 2012).

Existuje stále více zpráv demonstrujících významné lipidy redukující efekty přírodních složek, zvláště u receptur tradiční čínské medicíny, které bývaly a bývají užívány v prevenci koronární vaskulární nemoci (Wu et al. 2009, Cao et al. 2012).



Obr. 13 Vliv CAE na jaterní mRNA expresi CYP7A1, PPAR α a FXR u hyperlipidemických potkanů krmených vysoce tučnou stravou. mRNA v játrech hyperlipidemických potkanů byla detekována RT-PCR. Hodnoty jsou normalizované hodnoty relativní mRNA exprese u β -aktinových jaterních vzorků. Hodnoty se rovnají \pm SD, n = 10. #p < 0.05, #*p < 0.01 oproti kontrole; *p < 0.05, **p < 0.01 oproti nosiči (CAE 0 mg/kg).

(A) Vliv alkaloidového extraktu na jaterní expresi mRNA Cyp7a1 u hyperlipidemických potkanů na vysoce tučné stravě; (B) Vliv alkaloidového extraktu *Rhizoma Coptidis* na jaterní expresi mRNA PPAR α u hyperlipidemických potkanů na vysoce tučné stravě; (C) Vliv extraktu na jaterní expresi mRNA FXR u hyperlipidemických potkanů na vysoce tučné stravě. Převzato z Cao et al. 2012

3.3.3 *Commiphora mukul*

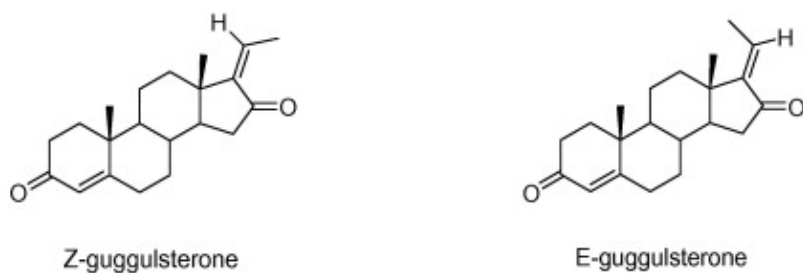


Obr. 14 *Commiphora mukul*. Převzato z: <http://toddcaldcott.com/herbs/guggulu/>

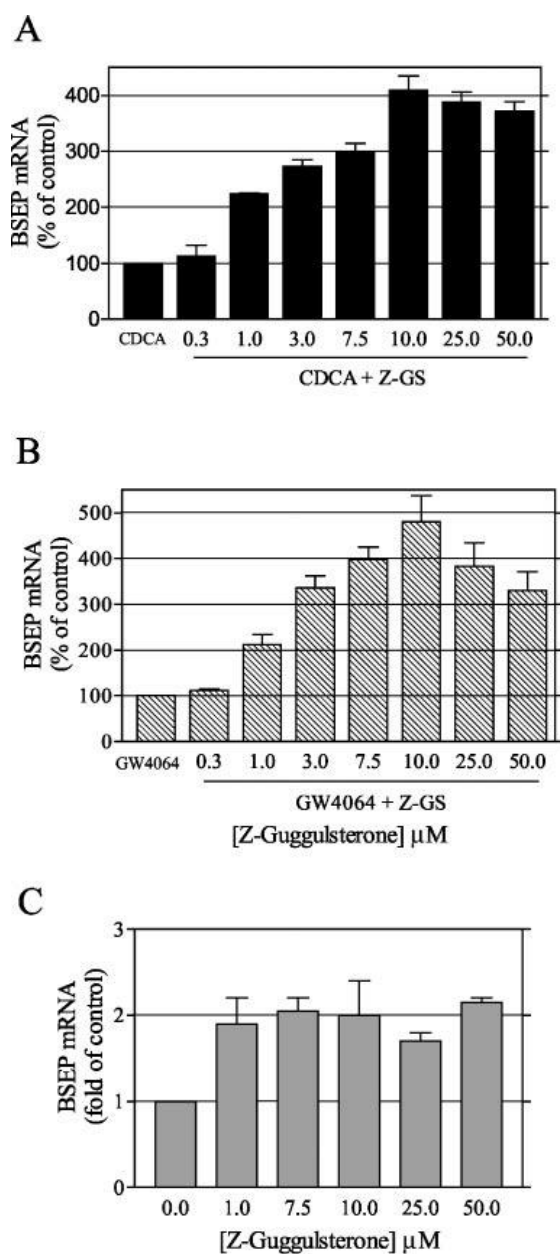
Guggulipid je extraktem z pryskyřice kůry guggulového stromu *Commiphora mukul* (Obr. 14). Byl široce rozšířen v léčbě hyperlipidemie u lidí. Mnoho klinických studií demonstrovalo, že guggulipid efektivně snižoval sérové hladiny LDL cholesterolu a triglyceridů a zvyšoval hladiny HDL. Rostlinné guggusterony (GS) E a Z (stereoizomery) v guggulipidu byly identifikovány jako aktivní složky snižující tuky (Obr. 15) (Satyavati et al. 1988, Dev et al. 1999, Nityanand et al. 1989, Singh et al. 1994, Beg et al. 1996).

Současné studie ukázaly, že GS se může chovat jako antagonistu u FXR a snižovat expresi genů indukovaných žlučovými kyselinami. Ve studii bylo pozorováno, že GS FXR antagonistu také zlepšuje FXR agonisty indukovanou transkripci exportní pumpy pro žlučové kyseliny (BSEP), hlavního transportéru jaterních žlučových kyselin. U HepG2 buněk v přítomnosti agonistů FXR jako je chenodeoxychololát či GW 4064 GS zlepšuje endogenní expresi BSEP s maximální indukcí o 400-500 % v porovnání s indukcí vyvolanou agonisty samotnými. Zesílení bylo také čitelně pozorováno u FXR dependentní BSEP promotérové aktivace užitím luciferázové reportérové součástky. V nepřítomnosti agonistů FXR GS samotný zvyšuje promotérovou aktivaci BSEP jen lehce. Konsistentně s výsledky u HepG2 zvyšovalo podání guggulipidu u Fisherových potkanů mRNA BSEP. Expresí sirotčího nukleárního receptoru SHP u těchto zvířat byla významně zvýšena, zatímco exprese dalších cílů FXR včetně cholesterol – 7-hydroxylázy (Cyp7a1), sterol-12 hydroxylázy (Cyp8b1) a intestinální žlučové kyseliny vázícího proteinu (I-BABP) zůstaly nezměněny. Z tohoto důvodu je GS pravděpodobně

selektivním modulátorem receptoru pro žlučové kyseliny, který reguluje expresi cílových genů FXR. Podání guggulipidu u potkanů snižuje sérové triglyceridy a zvyšuje hladiny sérového HDL. Data ze studie tak usuzují, že guggulsteron definuje novou třídu FXR ligandů (Obr. 16) (Deng et al. 2007, Urizar et al. 2002, Wu et al. 2002, Cui et al. 2003).



Obr. 15 Struktury guggulsteronů. Modifikováno dle: Grienke et al. 2011



Obr. 16 Zvýšení FXR agonisty indukované BSEP exprese působením Z-guggulsteronu. Hep2G2 buňkám v hustotě 1 milion buněk/jamku v 6-jamkových destičkách byly podávány různé koncentrace Z-guggulsteronů (Z-GS) v přímomnosti 25 μ M CDCA (A) nebo 100 nM GW4064 (B) po 24h v DMEM obsahující 0,5% CS-FBS. Celková RNA byla připravena a BSEP m RNA byla analyzována TaqMan-PCR. Výsledky byly normalizovány kontrolou (buňky *versus* nosič) a data jsou míněna \pm S. D. tří stanovení (Cui et al. 2003).

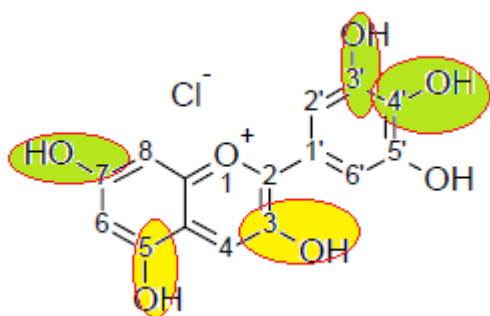
3.4 PROANTHOCYANIDINY



Obr. 17 Brusnice brusinka (*Vaccinium vitis - idaea*). Převzato z http://www.nasevyziva.cz/img_data_arch/1/1323520822cla_ML505_IMG0092.jpg

Existuje velký zájem o terapeutické účinky bioaktivních polyfenolických sloučenin přítomných ve stravě – flavonoidů. Mezi ty farmakologicky nejaktivnější z nich patří anthocyaniny - největší a nejdůležitější skupina ve vodě rozpustných přírodních pigmentů ve vaskulárních rostlinách (Skemiene et al. 2015, Klimaviciute et al. 2015, Castaneda-Ovando et al. 2009).

Proanthocyanidiny (procyanidiny) či také anthocyaniny patří do skupiny pyranových barviv. Název vychází z latinského athos – květ. Jedná se o kondenzované tříslloviny, tedy oligomerní i polymerní sloučeniny strukturně vycházející z flavan-3-olů (katechinů) (Obr. 18). Ohřátím jejich ethanolických roztoků dochází k rozkladu, a vznikají tak anthocyanidiny (Obr. 25). To je důvod proč bývají anthocyaniny označovány také přesnějšími pojmy proanthocyanidiny či procyanidiny. Základem jejich struktury jsou deriváty již zmíněného flavan-3-olu (+)-katechin a (-)-epikatechin. Vzhledem k tomu, že flavan-3-ol obsahuje dvě centra chiralit na uhlíku C2 a C3,



Obr. 20 Obvyklé polohy glykosylace anthocyaninů. Upraveno dle Čopíková et al. 2005.

Byly zaznamenány O-methylace, C-, O- glykosylace, O-galloylace. Glykosylované jednotky a acylované skupiny se zachytí na aglykonu společně se sítí jejich vazeb a mají významný vliv na stabilitu a reaktivitu molekul anthocyaninů (Kolečkář et al. 2012, Klimaviciute et al. 2015, Cavalcanti et al. 2011, Skemiene et al. 2015).

Najčastěji jsou glykosylovány v polohách 3 a 5 (Obr. 20 žlutě), někdy 7,3' a 4' (Obr. 20 zeleně). Jejich barevné kombinace vycházejí z červené, modré a fialové barvy. Specifické barvy mají sloučeniny tvořené aglykony a cukernými zbytky, často s D-glukozou, L-rhamnosou, D-arabinosou, rutinovou (α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glukosa) a soforosou (β -D-glukosyl-(1 \rightarrow 2)-D-glukosa) (Obr. 20) (Čopíková et al. 2005, Skemiene et al. 2015).

Rozlišuje procyanidiny skupiny B (dimery) a C (trimery). Charakteristické je u nich C-C přemostění často mezi C-4 horního flavanolu a C-6 nebo C-8 dolní jednotky. Procyanidiny A mají ještě etherový můstek mezi C-2 horní jednotky a C-7 a/nebo C-5 dolní jednotky. Vytvářejí množství polymerů s dalšími flavany. Největší část izolovaných proanthocyanidinů tvoří procyanidiny B skupiny. B1 tak například nalezneme v grepu, čiroku, brusinkách (Obr. 17), B2 pak v jablcích, třešních a B3 v jahodách, chmelu, B4 v malinách a ostružinách. Mezi další zdroje patří červené víno, zelený čaj, kakao či čokoláda (Kolečkář et al. 2012).

Rostliny typicky produkují anthocyaniny jako ochranný mechanismus proti environmentálním stresovým faktorům včetně UV záření, nízkých teplot a sucha. Chromofor 8 konjugovaných dvojných vazeb, nesoucí pozitivní náboj na heterocyklickém kyslíkovém kruhu, je zodpovědný za intenzivní červeno oranžové až modro fialové zbarvení produkované anthocyaniny v kyselých podmínkách. Anthocyaniny vykazují maximální vlnovou délku mezi 465 a 550 nm, stejně jako signifikantní absorpci UV v rozmezí 270 a 280nm. Bylo identifikováno přes 635

anthocyaninů. Mají vysoký potenciál pro užití jako přírodní barviva vzhledem ke svým atraktivním barvám, netoxicitě a antioxidační aktivitě, díky čemuž hrají zásadní roli v prevenci různých onemocnění. (Klimaviciute et al. 2015, Delgado-Vargas et al. 2000).

Extrakty bohaté na anthocyaniny jsou tak stále atraktivnější pro potravinový průmysl jako přírodní varianty k syntetickým barvivům (Wallace 2011).

Již zmíněný antioxidační vliv anthocyaninů byl pozorován *in vitro* společně se schopností těchto látek snižovat zánět, lipidovou peroxidaci, škodlivé účinky ROS a v souvislosti s tím byl také zkoumán jejich vliv na rozvoj atherosklérozou jako zánětlivého onemocnění. Další pozorované účinky anthocyaninů zobrazuje tabulka Tab. 1 (Aboonabi et Singh 2015, Amorini et al. 2003, Prior et Wu 2006).

Tab. 1 Biologické odpovědi anthocyaninů, anthocyanidinů či extraktů bohatých na anthocyaniny pozorované *in vitro* (Upraveno dle Prior et Wu 2006)

Vliv na zdraví	Zdroj anthocyaninů či anthocyanidiny	Koncentrace	Buňky	Citace
Kardiovaskulární				
1. ↑endotel. závislá relaxace	<i>Aronia</i> nebo borůvka	0,05 mg/l	Prasečí koronární arterie	Bell et Gochenaur 2006
2. ↓HUVEC proliferace (angiogeneze)	Del-3-(cr)-5-glc	5-200 μM	Lidské endotel. buňky z pupeční žíly (HUVEC)	Matsubara et al. 2005
3. ↑uvolnění cholesterolu a mRNA exprese ABCA1	Cy-3-glc, Peon-3-glc	1-100 μM	Medvědí peritoneální makrofágy	Xia et al. 2005
4. ↓proliferace ↑eNOS	Delphinidin	50-100 μM	HUVEC	Lazze et al. 2006
Protizánětlivý vliv				
1. ↓exprese COX-2	Delphinidin		Makrofágová bun. linie RAW264.7	Hou et al. 2005a
1. ↓NO, PGE2, COX-2	<i>Aronia</i>	1-100 mg extraktu <i>Aronia</i>	Makrofágová bun. linie RAW264.7	Ohgami et al. 2005

Tab. 1 Biologické odpovědi anthocyaninů, anthocyanidinů či extraktů bohatých na anthocyaniny pozorované *in vitro* (pokračování) (Upraveno dle Prior et Wu 2006)

Vliv na zdraví	Zdroj anthocyaninů či anthocyanidiny	Koncentrace	Buňky	Citace
Rakovina				
1. ↑apoptotická buň. smrt	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	0-4 mg/l	HL-60	Hou et al. 2005b
2. ↑apoptóza a buň. diferenciace	Cy-3-glc	nedostupné	HL-60 a Jurkat	Fimognari et al. 2005
3. ↓ <i>in vitro</i> invazivnost rakovinných buněk	Moruše, Cy-3-glc a Cy-3-rut	nedostupné	A549 buňky lidského plicního karcinomu	Chen et al. 2006
4. ↑apoptóza ↓ERK aktivity ↑exprese p38 kinázy	Mal-3-glc	0-200 μM	Buňky lidského žalud. adenokarcinomu	Shih et al. 2005
5. ↑apoptóza ↑ kaskáda c-Jun-terminální kináza	Delphinidin	10-200 μM	Lidská hepatomární buněčná linie Hep G(2)	Yeh et Yen 2005
6. ↓buněčná proliferace	Extrakt z borůvek	50-100 μg/ml	HT-29 a CaCo-2 buňky rakoviny tlustého střeva	Yi et al. 2005
7. ↓tumorózní buň. prolifer. s anthocyanidiny, bez efektu s anthocyaniny	4 anthocyaniny, 5 anthocyanidinů	12,5-200 μg/ml	AGC, HCT-116, MCF-7, NCI H460 & SF268	Zhang et Vareed 2005
Oxidativní poškození				
1. ↓Fragmentace DNA v důsledku mykotoxinu	Cy-3-glc	50 μM	HepG2 (hepatomární) CaCO2	Guerra et al. 2005
2. ↓volná produkce radikálů a genomové poškození DNA	Cy-3-glc	125 & 250 μM	Lidské fibroblasty	Russo et al. 2005
3. ↓UVA indukované reaktivní formy kyslíku	Cy-3-glc	nedostupné	Lidská keratinocyt. buň. linie (HaCaT)	Tarozzi et al. 2005

Denní příjem polyfenolů byl stanoven na 1000 mg na den, což je značné množství v porovnání s denní konzumací mikroživin jako jsou karotenoidy, vitamin E a vitamin C (stanovené přibližně na 5, 12 a 90 mg/den). Denní stanovený příjem anthocyaninů (okolo 180 a 215 mg/den) je vysoký v porovnání s dalšími flavonoidy

jako je genistein a kvercetin (20-25 mg/den). Anthocyaniny jsou vysoce nestabilní a jejich barevná stabilita je silně ovlivňována pH, teplotou, jejich koncentrací, působením světla, enzymy, a dalšími substancemi jako je například askorbová kyselina a cukry mimo dalších. Proto mají anthocyaniny velmi krátký poločas a malou biologickou dostupnost. Existují dva hlavní mechanismy stabilizace anthocyaninů, enkapsulace a asociace. Anthocyaniny mohou být s výjimkou několika rostlinných polyfenolů detekovány v plazmě v jejich přirozené intaktní formě (glykosidy) (Fleschhut et al. 2006, Jimenez et al. 2010, Giusti et Wrolstad 2003, Cavalcanti et al. 2011, Kader et al. 1997, Pacheco-Palencia et al. 2007, Rubinskiene et al. 2005, Klimaviciute et al. 2015).

3.4.1 Absorbce anthocyanidinů a jejich biodostupnost

V posledních letech bylo při studiu polyfenolů v ovoci a zelenině zaznamenáno velké množství biologických účinků. Nicméně máme jen málo informací o absorpci glykosylovaných a acylovaných anthocyaninů u lidí. Dlouhou dobu existoval předpoklad, že se anthocyanidiny nevstřebávají, v současné době však stále více studií demonstruje, že je jejich vstřebatelnost vyšší, než bylo původně usuzováno. Po provedení *in vitro* experimentů byl pozorován přechod přes střevní sliznici, který se ale uskutečňoval s ohledem na velikost molekuly, kdy trimery procházely bez problémů, zatímco u hexamerů již přechod prakticky neprobíhal. Vliv na absorpci a následnou biologickou dostupnost, ale není daný pouze velikostí molekuly, ale hrají zde roli také další faktory, jakými jsou například stav trávicího traktu, vazba na matrici tráveniny, množství podané látky, úroveň exprese trávicích enzymů či podávaná forma látky. (Prior et Wu 2006, Woodward et al. 2009).

Jedna z prvních studií představuje důkazy pro absorpci anthocyaninů u lidí *in vivo* byla publikována Paganga a Rice-Evans. (Paganga et Rice-Evans 1997).

Anthocyanin, rutin a další kvercetinové glykosidy byly detekovány v lidském séru v glykosylované formě HPLC analýzou. Lapidot et al. našel anthocyaniny v lidské moči po požití 300ml červeného vína (obsahujícího přibližně 218mg anthocyaninů). Celkem 1,5-5,1% anthocyaninů bylo nalezeno v moči po 12h po konzumaci vína. Dvě ze sloučenin zůstaly nezměněné, zatímco ostatní látky prošly molekulární modifikací. Anthocyaninové hladiny dosáhly vrcholu okolo 6 hodin po konzumaci (Lapidot et al. 1998).

Miyazawa et al. prezentovali výsledky studie na lidech zahrnující 7 dospělých mužů a 5 dospělých žen. Anthocyaniny byly podány ve formě sprejově vysušených extraktů bezu (*Sambucus nigra*) a černého rybízu (*Ribes nigrum*) koncentrátů šťávy. Dobrovolníci perorálně přijímali 2,7 mg cyanidin-3-glukosidů a 0,25 mg cyanidin-2,5-diglykosidů/kg tělesné váhy. V plazmě byla po 30 min po požití zjištěna hladina cyanidin-3-glukosidů 11 μg/l, po 60 minutách 13 μg/l. U cyanidin-2,5-diglykosidů byly nalezeny v plazmě pouze stopy (Miyazawa et al. 1999, Mazza et al. 2002, Prior et Wu 2006).

V další studii byla sledována absorpce anthocyaninů po konzumaci stravy bohaté na tuky. V rámci studie přijímali dobrovolníci borůvky ve formě mrazem vysušeného prášku obsahujícího 25 různých anthocyaninů včetně 6 acylovaných struktur. 19 z 25 anthocyaninů bylo detekováno v lidském krevním séru. Pozorování všech anthocyaninů v séru přímo korelovalo se zvýšením antioxidační kapacity v séru. Tyto výsledky ukázaly, že anthocyaniny mohou být absorbovány v jejich intaktní glykosylované formě a možné acylované formě a že konzumace borůvek jako zdroje těchto látek je spojena se stravou indukovaným nárůstem antioxidačního stavu v séru *ex vivo* (Woodward et al. 2009).

Biologické aktivity anthocyaninů jsou úzce spojeny s jejich absorpcí a metabolismem. Současné studie opět ukázaly, že anthocyaniny jsou rychle absorbovány v žaludku a střevě potkanů. Intenzivní červená barva byla přítomna v kyselém extraktu všech žaludečních tkání a tkání tenkého střeva, indikující příjem anthocyaninů do gastrointestinálních tkání (Wallace 2011).

Anthocyaniny v tkáních žaludku potkanů byly identifikovány jejich spektrálními změnami při pH 1,0, 4,5 a 10,0 ale nemohly být kvantifikovány HPLC, protože se zdá, že jsou vázány na neidentifikovaný protein. Tohle může být přičítáno nespecifické vazbě na transportérový protein. Vstřebání anthocyaninů z ostružin dosáhlo 7,5% z podané dávky v tkáních tenkého střeva, což je mnohem více než zveřejněná biodostupnost těchto sloučenin založená na koncentraci v plazmě a moči. Z tohoto lze soudit, že intaktní anthocyaniny mohou být vstřebány do tkání GITu efektivně, ale nejsou transportovány do cirkulace. Transport apikální membránou za užití *in vitro* epiteliálního Caco-2 buněčného modelu poukázal mnohem větší rozsah než následná translokace intaktních ostružinových anthocyaninů přes basolaterální membránu. Glykosylace a acylace snížily biodostupnost anthocyaninů. Nicméně glukosidázy přítomné v GI traktu mohou hydrolyzovat anthocyaniny na anthocyanidiny, čímž zvýší

jejich biologický potenciál, ale snižuje jejich stabilitu. Zdá se, že přítomnost glukózové moiety v porovnání s galaktózou a arabinózou na cyanidinové a peonidinové anthocyanidiny přítomné v brusinkové šťávě je tvoří více dostupnými s ohledem na procenta přijaté dávky (Wallace 2011).

Athocyanidiny existují v cirkulaci a moči jako intaktní methylované a glukuronidové deriváty a/nebo sulfokonjugované formy s vrcholem plazmatické koncentrace mezi 1 a 3 hodinou po konzumaci a závisící na individuální sloučenině a složením stravy. Metabolity zůstávají v moči po 24h a mohou přetrvávat v základní anthocyaninové struktuře. Farmakokinetické důkazy implikují parentní glykosidy a glukuronidové deriváty jako prominentní v krevním řečišti mezi 0 a 5h, postupem času (6-24h) se ale stávají více methylovanými, což ukazuje, že bioaktivita anthocyaninů je alterovaná v průběhu času působením metabolické transformace (Wallace 2011).

U potkanů krmených hypercholesterolemickou stravou, redukovala chronická konzumace procyanidinového extraktu z hroznových semen (GSPE) na lačno plazmatické hladiny TG, LDL-cholesterol a VLDL, a zvyšovala plazmatický HDL-cholesterol. Hypolipidemický efekt procyanidinů může být částečně způsoben prostřednictvím inhibice absorpce lipidů ve stravě a snížením chylomikronové sekrece enterocyty. Nicméně molekulární mechanismus, který je podstatou zlepšení plazmatického lipidového profilu procyanidiny je z velké části neznámý (Del Bas et al. 2009).

V předchozích studiích bylo pozorováno, že akutní dávka GSPE redukovala postprandiální triglyceridemii a hladiny plazmatického ApoB u normolipidemických potkanů, zatímco současně zvyšovala hladinu jaterního mRNA SHP (NR0B2, SHP), tzv. „sirotčího receptoru“, který reguluje žlučové kyseliny (ŽK, BA), cholesterol, TG, a glukózovou homeostázu v játrech. Procyanidiny z vína u HepG2 vyžadují aktivitu SHP k redukci sekrece TG, zatímco v kontrastu s tímto redukuje sekreci ApoB v rámci SHP-dependentní cestě. SHP také zprostředkovává hypotriglyceridemický efekt procyanidinů ve víně u Wild type (WT) myši v postprandiálním stavu, což je spojeno se sníženou regulací jaterní exprese transkripčního faktoru SREBP1, hlavního zprostředkovatele insulin/glukózové signalizace pro lipogenezi (Del Bas et al. 2009).

Částečná podobnost mezi aktivátory FXR a GSPE týkající se změn v profilu exprese jaterních genů a v parametrech plazmatických lipidů vedla k hypotéze, že procyanidiny mohou zvýšit transkripční aktivitu FXR a následkem toho, že FXR může zprostředkovat hypotriglyceridemický efekt GSPE. Pro otestování této hypotézy byl

v analýze hodnocen efekt GSPE na hladiny plazmatických triglyceridů u WT a FXR^{-/-} myši a byl hodnocen efekt GSPE v analýze na buňkách závislé FXR-responsivní luciferázové expresi. Výsledky ukázaly, že procyanidiny zvyšovaly aktivitu chenodeoxycholové kyseliny (CDCA)-aktivované FXR a že, stejně jako u žlučových kyselin, signál snižoval triglyceridemií prostřednictvím FXR, doprovázející inhibici jaterní exprese SREBP1 a několika SREBP1 cílových genů zapojených do lipogeneze (Del Bas et al. 2009).

Při zkoumání relevance FXR jako mediátoru GSPE hypotriglyceridemické akce u *in vivo* modelu, jsme srovnávali efekt podávání GSPE u FXR^{-/-} versus WT myši. Perorální podání GSPE vyvolalo 40 % redukci hladin plazmatických TG u WT myši v postprandiálním stavu, zatímco vliv na modifikaci celkového cholesterolu nebyl pozorován. Tato odpověď na podávání GSPE byla identická jako u výsledků předtím zjištěných u potkanů. V kontrastu s tímto GSPE podání nezpůsobovalo signifikantní redukci hladin plazmatických TG u FXR^{-/-} zvířat. FXR byl tedy označen jako klíčový zprostředkovatel hypotriglyceridemické aktivity procyanidinů u myši. (Del Bas et al. 2009).

Zásadní role FXR ve zprostředkování hypotriglyceridemického účinku procyanidinů *in vivo* akce procyanidinů *in vivo* byla potvrzena při podání GSPE k WT myši a FXR-null myši. V souladu s předchozími výsledky u divokého typu potkanů a myši, perorální podání GSPE vyvolalo hypotriglyceridemický účinek v myši divokého typu v postprandiálním stavu, bez ovlivnění hladiny celkového plazmatického cholesterolu. Naproti tomu, GSPE byla neúčinná při snižování plazmatické hladiny triglyceridů v FXR- nulových myši. Protože procyanidiny potřebovaly přítomnost a aktivitu FXR, znamená to, že působí prostřednictvím FXR závislé dráhy (Sinal et al. 2000, Del Bas et al. 2005, Del Bas et al. 2008).

V potravě přijaté procyanidiny, působí jako aktivátory FXR, se jeví jako slibná přírodní činidla pro léčbu metabolických poruch. Další výzkum je nutný k identifikaci jednotlivých procyanidinů, které zvyšují aktivitu FXR a pro určení mechanismů a metabolických následků této aktivace (Del Bas et al. 2009, Prior et Wu 2006).

3.5 VYBRANÉ ANTHOCYANIDINY

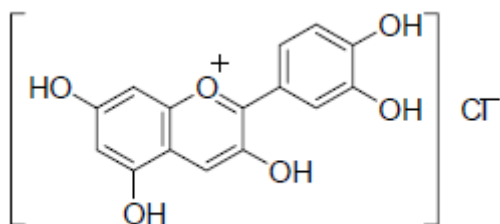
Vzhledem k množství studií o pozitivních účincích anthocyaninů byly za účelem ověření interakce anthocyanidinů s FXR receptorem a za účelem analýzy mechanismů jejich působení v organismu zařazeny do této práce níže uvedené anthocyanidiny.

3.5.1 Cyanidin



Obr. 21 *Cerasus avium*. Převzato z <http://botany.cz/cs/prunus-avium/>

Cyanidin (Obr. 22) je sloučenina vykazující v kyselém prostředí červenou barvu. Nalezneme jej například v květech růže *Rosa*, plodech třešně *Cerasus avium* (Obr. 21), brusinkách *Rhodococcum vitis-idaea* a dalších. V alkalickém prostředí dochází působením pH k protonacím a deprotonacím a přeskupování elektronů za jejich interakce s fotony viditelného světla. Příkladem tohoto jevu jsou barvy chrpy modráka, *Cyanus segetum* (Čopíková et al. 2005).



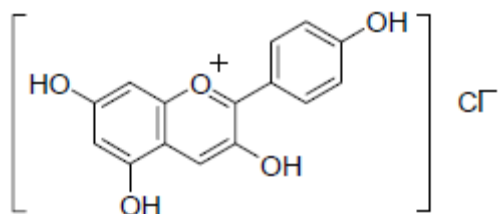
Obr. 22 Struktura cyanidinu. Převzato z Čopíková et al. 2005

3.5.2 Pelargonidin



Obr. 23 *Pelargonium*. Převzato z https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pelargonium_peltatum_hort._a1.jpg

Pelargonidin (Obr. 24) je rovněž zástupcem pyranových barviv. Má červenou barvu a nalezneme jej například u pelargonie *Pelargonium* (Obr. 23) (Čopíková et al. 2005).



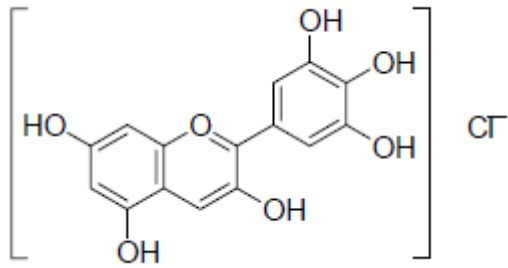
Obr. 24 Struktura pelargonidinu. Převzato z Čopíková et al. 2005

3.5.3 Delphinidin



Obr. 25 *Vitis vinifera*. Převzato z <http://madrelabs.com/blog/2013/10/14/vitis-vinifera-skin/>

Mezi pyranová barviva se řadí i delphinidin (Obr. 26). Ten lze nalézt jako hnědé barvivo v červeném víně (Obr. 25) (Čopíková et al. 2005).



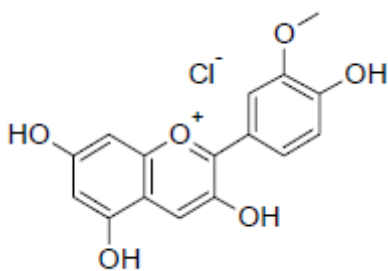
Obr. 26 Struktura delphinidinu. Převzato z Čopíková et al. 2005

3.5.4 Peonidin



Obr. 27 *Paeonia officinalis*. Převzato z : <http://www.paeo.de/h2007/warmerdam/roseaplana.JPG>

Peonidin (Obr. 28) je obsažen v tmavočervených pivoňkách *Paeonia officinalis* (Obr. 27). Tato červenohnědá sloučenina je málo rozpustná ve vodě. Při tvorbě jeho alkoholového roztoku vzniká purpurově červená barva. Peonidin je aglykonem peoninu (Čopíková et al. 2005).



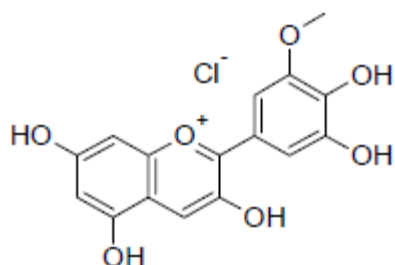
Obr. 28 Struktura peonidinu. Převzato z Čopíková et al. 2005

3.5.5 Petunidin



Obr. 29 *Petunia hybrida*. Převzato z http://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder/Show_1071.aspx

Dalšího zástupce pyranových barviv a anthocyanidinů představuje petunidin (Obr. 30). Ten je obsažen v petúniích *Petunia hybrida* (Obr. 29) a vítodu hořkém krátkokřídle (*Polygala amara* subsp. *brachyptera*). Obdobně jako u ostatních anthocyanidinů je petunidin aglykonem petuninu, jež v pevném stavu zaujímá fialovou barvu s měděným leskem (Čopíková et al. 2005).



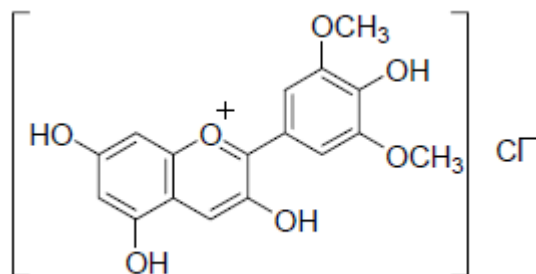
Obr. 30 Struktura peonidinu. Převzato z Čopíková et al. 2005

3.5.6 Malvidin



Obr. 31 *Malva sylvestris*. Převzato z <http://newfs.s3.amazonaws.com/taxon-images-1000s1000/Malvaceae/malva-sylvestris-fl-gcarr1.jpg>

Anthocyanidin malvidin (Obr. 32) nalezneme jako diglukosid malvin v prvosenkách *Primula* sp. a slézu lesním *Malva sylvestris* (Obr. 31), kde má červenohnědou barvu a jako monoglukosid v hroznech vinné révy *Vitis vinifera*, které dodává modrou barvu. Jeho roztoku v methanolu pak má purpurovou barvu, z které jsou postupně uvolňovány červené krystaly, jejichž barva se ale stále v procházejícím jeví jako světle fialová (Čopíková et al. 2005).



Obr. 32 Struktura malvidinu. Převzato z Čopíková et al. 2005

3.6 VYBRANÉ ALKALOIDY *FUMARIA OFFICINALIS*



Obr. 33 *Fumaria officinalis*. Převzato z http://www.apatita.com/herbario/Papaveraceae/large/Fumaria_officinalis_subsp_officinalis_2.jpg

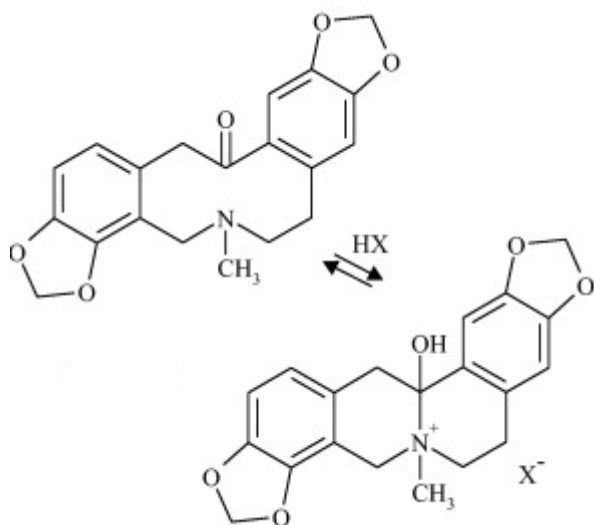
Fumaria officinalis (Obr. 33), česky zemědělným lékařským, je jednoletá plevelná rostlina s fialovými ostrouhatými květy z čeledi Fumariaceae. Rostliny této čeledi byly, a stále jsou využívány v mnoha tradičních lidových medicínách pro své léčebné vlastnosti u kožních a topických nemocí, kardiovaskulárních obtíží, horečky a bolestí hlavy. Také jsou jim přičítány anthelmintické, antidyspeptické, čistící, cholagogní, diaforetické, diuretické, laxativní, sedativní a tonické účinky a jsou používány při řešení abdominálních křečí, průjmu, horečky, žloutenky, lepry, sifilis, krevních poruch a tuberkulózy. Z rostlin čeledě Fumariaceae bylo izolováno množství látek alkaloidů, flavonoidů, glykosidů, taninů, saponinů, antrachinonů, steroidů a triterpenoidů (farmakobotanika). V rámci této práce byly testovány některé alkaloidy izolované z této rostliny (Shakya et al. 2012).

3.6.1 Protopin

Benzylisochinolinový alkaloid protopin (Obr. 34) se nachází mimo jiné v čeledích Papaveraceae a Fumariaceae (Vrba et al. 2011). Po provedení studií byla u něj zaznamenána významná antiparazitická aktivita s nízkou toxicitou v porovnání s jinými isochinolinovými alkaloidy (Satou et al. 2002, Wang et al. 2010).

Protopin také vykazoval cytoprotektivní vlastnost proti oxidativnímu stresu indukujícímu buněčnou smrt *in vitro*. U alkaloidu byly také v rámci studií na zvířecích modelech pozorovány antiarytmické, antitrombotické a protizánětlivé a

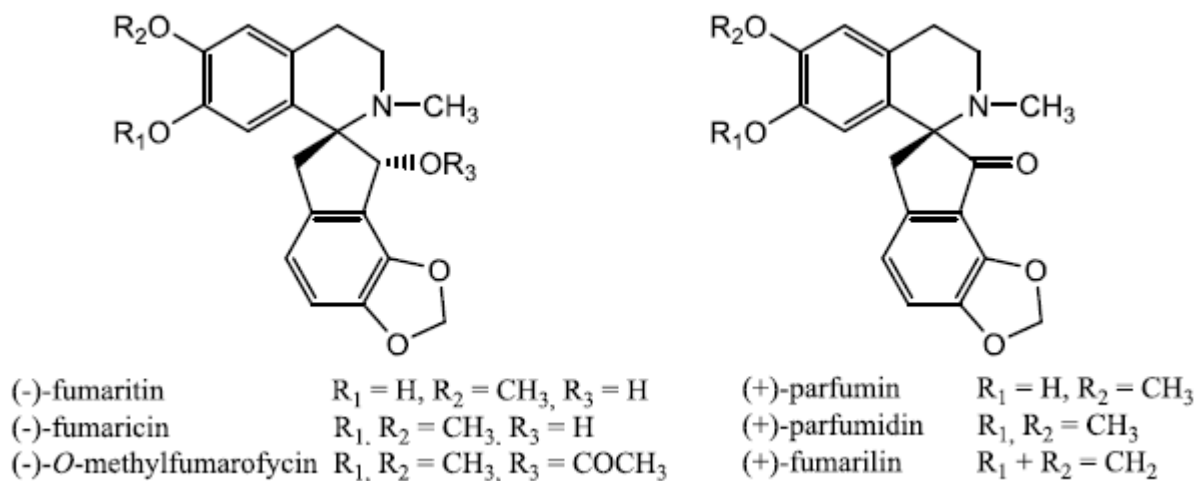
hepatoprotektivní vlastnosti (Xiao et al. 2008, Rathi et al. 2008, Song et al. 2000, Saeed et al. 1997).



Obr. 34 Struktura protopinu. Převzato z Vrba et al. 2011

3.6.2 Fumaricin, fumarilin, fumaritin, O-methyl-fumarofycin, parfumin, parfumidin

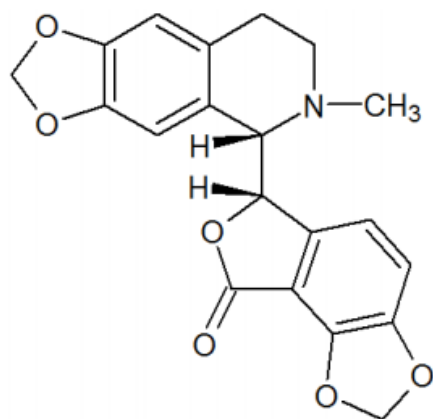
Tyto látky se řadí do skupiny spirobenzylisochinolinových alkaloidů, jež vznikají z protoberberinových alkaloidů (Obr. 35) (Brossi 1990).



Obr. 35 Struktury některých spirobenzylisochinolinových alkaloidů Upraveno dle Novák 2005.

3.6.3 Bikukulin

Bikukulin patří mezi ftalidisochinolinové alkaloidy a dle studií vykazuje antagonistický účinek vůči GABA-A (Obr. 36) (Ding et al. 2015).

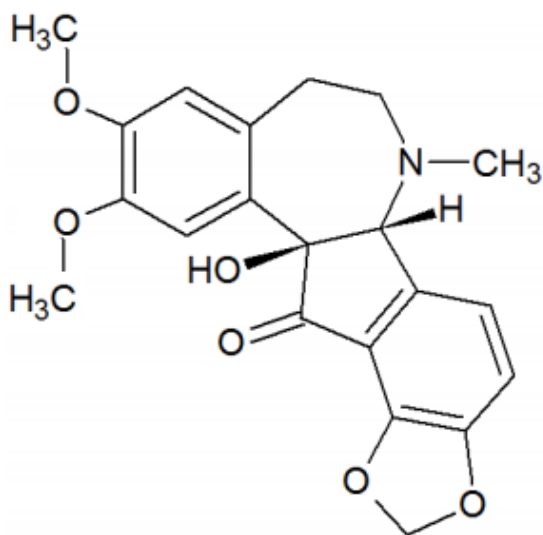


(+)-bikukulin

Obr. 36 Struktura bikukulinu. Převzato z Kostelník 2014.

3.6.4 *O*-Methylfumarofin

O-Methylfumarofin patří mezi indenobenzazepinové alkaloidy (Obr. 37) (Kostelník 2014).



Obr. 37 Struktura *O*-Methylfumarofinu. Upraveno dle Chlebek et al. 2016, Kostelník 2014.

4. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo shromáždit dostupné informace o farnesoidním X receptoru, jeho vlivu na lidský organismus, látkách s ním interagujících a nahlédnout na tuto látku v kontextu hledání nových terapeutických strategií využívajících FXR jako svůj cíl působení.

Pro experiment byly vybrány látky označované jako anthocyanidiny – peonidin, petudin, pelargonidin, cyanidin, delphinidin, malvidin a také alkaloidy z *Fumaria officinalis* - protopin, alkaloid S, fumaricin, parfumidin, fumarilin, *O*-Methylfumarofin, bikukulin, parfumidin, fumaritin, *O*-Methylfumarofycin hydrochlorid a fumarofycin.

. Ty byly testovány in vitro metodou TR-FRET LanthaScreen™ farnesoidní X receptor koaktivátorové analýzy pro zjištění jejich interakcí s farnesoidním X receptorem.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 POMŮCKY, PŘÍSTROJE

96 jamkové destičky

destičkový spektrofotometr-luminometr Genios Plus (Tecan)

laminární box

mikropipety

plastové mikrozkuřavky

třepačka

5.2 REAGENCIE

Anthocyanidiny: látky získány od firmy Cayman

Peonidin

Petunidin

Pelargonidin

Cyanidin

Delphinidin

Malvidin

Alkaloidy z *Fumaria officinalis*: látky získány od pracovníků Katedry farmaceutické botaniky a ekologie FaF UK (Chebek et al. 2016)

Protopin

Alkaloid S

Fumaricin

Parfumidin

Fumarilin

O-Methylfumarofin

Bikukulin

Parfumidin

Fumaritin

O-Methylfumarofycin

Hydrochlorid fumarofycinu

CDCA

GW4046

DMSO

Fluorescein-SRC2-2

Tb anti-GST protilátka

FXR LBD-GST

DTT

TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) LanthaScreen™ farnesoidní X receptorová koaktivátorová esej byla získána od firmy Life Technologies (nyní Thermo Fisher).

Není-li specifikován původ, látky a reagenty byly získány od firmy Sigma-Aldrich.

5.3 METODA

LanthaScreen™ TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) farnesoidní X receptor koaktivátorová esej představuje citlivou metodu screeningu potenciálních ligandů pro FXR. Sada používá na terbiu založené anti-GST protilátky, na fluoresceinu založený koaktivátorový peptid a FXR ligandy vážící doménu, která je označena glutation-S-transferázou v homogenním „mix-and-read“ formátu analýzy. Tento kit obsahuje dostatek reagentů pro 800 analýz na 20μl u každé (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007, Thermo Fisher, Catalog no. PV4833).

5.3.1 Princip FRET a TR-FRET

Časově závislá FRET (TR-FRET) je uznávanou *in vitro* metodou užívanou při screeningu knihoven sloučenin. Překonává intervence (rušení) způsobené autofluorescencí sloučenin nebo rozptylem světla precipitovaných sloučenin. Předpoklad pro TR-FRET analýzu je stejný jako u standardní FRET analýzy: když se vhodný pár flouroforů dostane do těsné blízkosti, excitace prvního z nich (donoru) může vést k přenosu energie na druhého (akceptoru). Tento transfer energie je detekován zvýšením fluorescenční emise akceptoru a snížením fluorescenční emise u donoru. U HTS analýz je FRET často vyjadřována jako poměr intenzit akceptoru a donoru flouroforů. Poměrový charakter takových hodnot koriguje rozdíly u analyzovaných objemů mezi jamkami a zároveň zhasací účinek způsobený zbarvením sloučenin (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

V kontrastu se standardní FRET analýzou, využívá TR-FRET analýza lanthanidové cheláty s dlouhým poločasem jako donorové druhy. Tyto cheláty jsou unikátní v tom, že doba jejich životnosti v excitovaném stavu (průměrná doba, po kterou molekula zůstává v excitovaném stavu po přijetí fotonu) může být v řádu milisekund a více. Toto je zásadní rozdíl oproti životnosti běžných flouroforů užívaných u standardních FRET analýzy, která se typicky pohybuje v oblasti nanosekund. Protože interference z autofluorescence sloučenin nebo rozptýleného světla se také pohybují řádově v nanosekundách, tyto faktory mohou negativně ovlivnit standardní FRET analýzu. Pro překonání těchto interferencí je TR-FRET analýza prováděna měřením FRET s příslušným zpožděním, obvykle 50 - 100 mikrosekund po excitaci vyvolané zdrojem světla mikrotitrační destičkové čtečky. Toto zpoždění překoná interference fluorescenčního pozadí a světelný rozptyl a také zabrání interferencím z přímé excitace (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

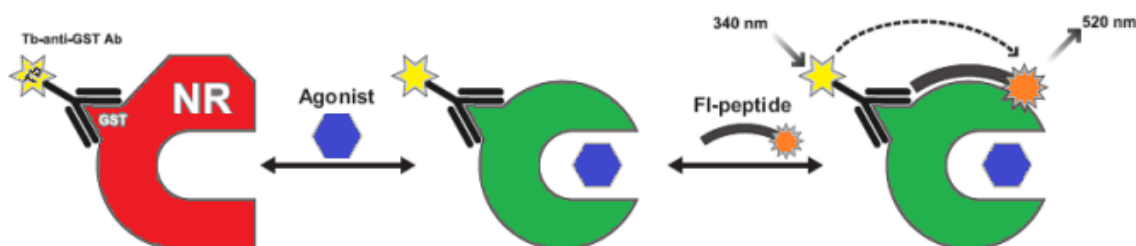
Mezi nejčastěji užívané lanthanoidy u TR-FRET analýzy u HTS je terbium a europium. Oproti europiu nabízí terbium unikátní výhody při jeho využití jako donoru v TR-FRET analýze. V porovnání se systémy založenými na europiu, které zahrnují APC jako akceptor, systémy založené na terbiu mohou jako akceptory využít běžné flourofory, jako například fluorescein. Protože je výhodnější (jednodušší a méně nákladné) označit molekulu, jakou je peptid, fluoresceinem, přímo vázané molekuly bývají užívány v na terbiu založené TR-FRET analýze raději než biotinylované molekuly, které musí být nepřímo navázané přes streptavidin-mediovanou vazbu APC.

Užití molekul přímo vázaných v na terbiu založených TR-FRET analýzách redukuje ceny, zlepšuje kinetiku, zabraňuje problémům souvisejícím se sterickými interakcemi zahrnujícími mnoho APC konjugátů, a také zjednodušuje vývoj analýzy vzhledem k méně nezávislým proměnným vyžadujícím optimalizaci u přímo značených systémů (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

5.3.2 Vazba agonisty

Vazba agonisty na nukleární receptor způsobuje konformační změnu v okolí helixu 12 LBD. To vede k vyšší afinitě koaktivátorového peptidu. Při excitaci terbiové vazby anti-GST protilátky při 340nm je energie předána fluoresceinové vazbě na koaktivátorovém peptidu a detekována jako emise při 520nm (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

V průběhu LanthaScreen™ koaktivátorové analýzy je FXR-LBD jako ligand k testované sloučenině následován přidáním směsi fluorescein-koaktivátorového peptidu a terbium-anti-GST protilátky. Po inkubační periodě při pokojové teplotě, je zajištěn TR-FRET poměr 520:495 a může být užit k determinaci EC_{50} látky z křivky závislé na dávce. V souvislosti s biologií interakcí FXR – koaktivátorového peptidu, je hodnota ligandu EC_{50} složenou hodnotou reprezentující množství ligandu potřebného k navázání receptoru, efektu konformačních změn a na vazbě koaktivátorového peptidu (Obr.38) (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).



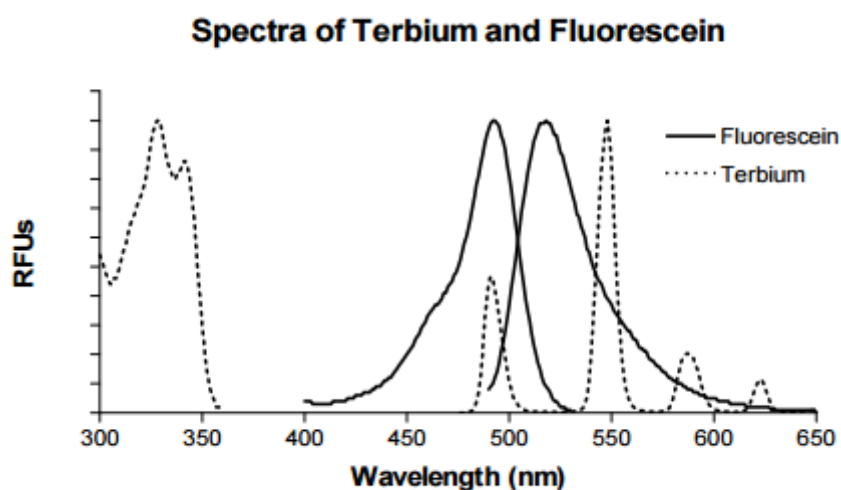
Obr. 38 Princip analýzy koaktivátorové peptidové vazby: Tb-anti-GST protilátky nepřímo váží nukleární receptor vazbou na GST značku. Vazba agonisty na NR způsobí konformační změny, které vedou ke zvýšení afinity NR pro koaktivátorový peptid. Těsná blízkost The close proximity of the fluorescenčně vázaného koaktivátorového peptidu na terbium s navázanou protilátkou vede ke zvýšení TR-FRET signálu. Upraveno dle LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007

5.3.3 Vlastnosti přístroje

Tab. 2 Vlastnosti přístroje. Upraveno dle (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007)

Excitace	340 nm filter (30 nm šířka vlnového pásma)
Emise	520 nm filter (25 nm šířka vlnového pásma)
Emise	490 nm nebo 495 nm filtr (10 nm šířka vlnového pásma)
Zpoždění	100 μ s
Intergrační čas	200 μ s

Excitační a emisní spektra terbia a fluoresceinu jsou zobrazena v Obr. 39. V TR-FRET analýze je terbiový donor excitovaný za použití 340 nm filtru s 30 nm šíří pásma. Přesné specifikace excitačního filtru nejsou kritické a filtry s podobnými specifikacemi budou také dobře fungovat. Všobecně lze říci, že excitační filtry, které fungují u systémů TR-FRET založených na europiu, budou pracovat dobře u LanthaScreen™ terbiových chalátů (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).



Obr.39 Excitační a emisní spektra fluoresceinu a terbia. Převzato z LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007

Jak je patrné na obrázku, emisní spektrum terbia je charakterizováno čtyřmi ostrými emisními vrcholy s nulovými oblastmi mezi každým z nich. První emisní vrchol terbia (umístěný mezi 485 a 505 nm) se překrývá s maximem excitačního vrcholu u fluoresceinu. Přenos energie fluoresceinu je potom měřen v tiché oblasti mezi prvními dvěma terbiovémi emisními vrcholy. Protože je důležité měřit přenos energie na fluorescein bez interferencí z terbia, je filtr nastaven na 520 nm s 25 nm šíří pásma. Specifikace tohoto filtru jsou více kritické než u excitačního filtru. Standardní „fluoresceinové“ filtry nelze užít, protože tyto filtry předávají světlo spojené s terbiovým spektrem. Emise fluoresceinu vzhledem k FRET je srovnávána s emisí terbiového vrcholu užitím filtru, který izoluje tento vrchol. Toto je obvykle prováděno za použití filtru vycentrovaného na 490 nebo 495 nm s 10nm šíří pásma. 490nm filtr redukuje hodnotu fluoresceinové emise, která při tomto měření „prosakuje“, ačkoliv instrumentální dichroický zrcadlový výběr (jako u Tecan Ultra přístroje) může vyžadovat užití 495nm filtru. Vliv na kvalitu výsledných měření je v každém případě minimální. Filtry vhodné pro LanthaScreen™ analýzu jsou dostupné z Chroma jako sada filtrů PV001 nebo u dalších dodavatelů. LanthaScreen™ filtrový modul BMG PheraStar je dostupný přímo od BMG Instruments (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

Kromě volby filtrů je nastavení přístroje podobné nastavení u technologií založených na europiu. Všeobecně lze říci, že pokyny poskytnuté výrobcem mohou být použity jako startovní bod pro optimalizaci. Pro LanthaScreen™ je typické časové zpoždění 100 μ s následované 200 μ s integračním časem. Počet záblesků nebo měření na jamku vysoce závisí na přístroji a vše by mělo být nastaveno dle rady výrobce přístroje. LanthaScreen™ analýzy mohou probíhat na jakémkoliv na filtru založeném přístroji schopném TR-FRET jako je Tecan Ultra, BMGLabTech PHERAStar, Molecular Devices Analyst nebo PerkinElmer Envision. Analýzy LanthaScreen™ byly také úspěšně představeny u Tecan Safire a Molecular Devices M5 na monochromátoru založeném přístroji (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

5.4 POSTUP

5.4.1 Analýza agonistů

Procedura popisuje metodu determinace EC_{50} agonisty za užití agonistou indukované vazby fluorescein-SRC2-2 koaktivátorového peptidu na FXR-LBD. Jedinou variabilní hodnotou je koncentrace agonisty. Všechny ostatní složky (FXR-LBD, peptid, Tb anti GST protilátka) jsou fixovány v koncentracích optimalizovaných pro provedení analýzy s nejnižším EC_{50} s kontrolním agonistou. Doporučená finální koncentrace pro optimální provedení analýzy je zaznamenáno v Tab. 3. Pokud by se koncentrace těchto složek měnily, analýza musí být znovu optimalizována (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

Tab. 3 Finální koncentrace složek při analýze. Převzato z LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007

Sloučenina	Finální koncentrace v analýze
Fluorescein-SRC2-2	500 nM
Tb anti-GST protilátka	5 nM
FXR LBD-GST	5 nM

5.4.2 Příprava sloučenin na experiment

Před vlastním provedením experimentu je potřeba připravit kompletní koregulátorový pufr G přidáním 1 M DTT do koregulátorového pufru G pro získání finální koncentrace 10 mM DTT. Tento kompletní pufr G je nutné připravit vždy čerstvý (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

Kompletní koregulátorový pufr G je dále uchováván při pokojové teplotě pro přípravu dalších složek experimentu s výjimkou 4X roztoku FXR-LBD, která by měla být připravována s ledovým pufrem. Z tohoto důvodu je vhodné daný objem tohoto pufru pro přípravu 4X roztok FXR-LBD dát na led (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

Dále je připraven agonista při 100X z finální požadované maximální počáteční koncentrace za užití DMSO (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

5.4.3 Příprava 2X zásobních roztoků agonisty a potenciálních agonistů FXR

Následuje příprava 100X zředěných zásobních roztoků agonistů, čehož lze dosáhnout postupným ředěním agonisty za užití DMSO. Každý 100X koncentrovaný roztok agonisty je zředěn na 2X roztok užitím kompletního koregulátorového pufru G. Při experimentu je pak využíváno 10 μ l roztoku agonisty v dané koncentraci na jednu jamku titrační destičky (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

5.4.4 Příprava 4X zásobního roztoku FXR-LBD

4X koncentrovaného roztoku FXR-LBD je připravena užitím ledového kompletního koregulátorového pufru G. Doporučenou molární koncentraci FXR pro danou sadu lze nalézt na přiloženém certifikátu. Při skladování a při ředění se nesmí dojít k víření FXR-LBD. Lze míchat pipetováním či jemnou inverzí. Je nutné tento roztok uchovat na ledu dokud není použit v experimentu. Při vlastní analýze je pak využito 5 μ l tohoto roztoku na jednu jamku titrační destičky (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

5.4.5 Příprava 4X roztoku Fluorescein-SRC2-2/4X Tb anti-GST protilátky

Dále je připraven roztok obsahující 2,0 μ M fluorescein-SRC2-2 (4X koncentrovaný roztok) a 20 nM Tb anti-GST protilátku (4X koncentrovaný roztok) za užití kompletního koregulátorového pufru při pokojové teplotě. Daná koncentrace fluorescein – SRC2-2 je 100 μ M a koncentrace Tb anti-GST protilátky jsou obě indikovány na označení vialek a na certifikátu analýzy. Při analýze se pak využívá 5 μ l roztoku 4X peptidu/4X protilátky na jednu jamku titrační destičky (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

5.4.6 Inkubace a odečtení výsledků

Titrační destička se všemi reagenty je na konci experimentu promíchána a inkubována při pokojové teplotě a chráněna před světlem. Pro minimalizaci rizika evaporace je možné destičku přikrýt potahem (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

Samotné ozařování probíhá při vlnových délkách 520nm a 495nm nastavení přístroje. Před provedením tohoto je nutné obal na destičce odstranit. Měření se pak provádí mezi 1 až 24hod (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

5.4.7 Objemy reagentů a kontrol užitých při analýze potenciálních agonistů

Tab. 4 sumarizuje objemy reagentů, postup přidání složek a potenciální kontroly na vyvinutí analýzy. (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007)

Analýza	Přidání reagentů	Důvod
Testovaná sloučenina	1. 10 μ l 2X testované sloučeniny 2. 5 μ l 4X FXR-LBD 3. 5 μ l Fl-SCR2-2/Tb anti-GST Ab	Zhodnocení koaktivátorové vazby po navázání testované sloučeniny.
Pozitivní kontrola	1. 10 μ l 2X agonisty 2. 5 μ l 4X FXR-LBD 3. 5 μ l Fl-SCR2-2/Tb anti-GST Ab	Zhodnocení koaktivátorové vazby po navázání známého agonisty FXR.
Negativní kontrola	1. 10 μ l 2X solventu sloučenin 2. 5 μ l 4X FXR-LBD 3. 5 μ l Fl-SCR2-2/Tb anti-GST Ab	Poskytuje indikaci bazálního signálu nebo možné na ligandu nezávislé koaktivátorové vazby a složek zodpovědných za potenciální interferenci způsobenou pomocným rozpouštědlem
Bez FXR-LBD kontrola	1. 10 μ l 2X solventu sloučenin 2. 5 μ l kompletního koregulátorového pufru G 3. 5 μ l Fl-SCR2-2/Tb anti-GST Ab	Poskytuje absolutní spodní hranici analýzy nezapočítané u na ligandu nezávislých koaktivátorových vazeb.

Tab. 4 Přehled látek a objemů užitých v analýze. Převzato z (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007)

5.4.8 Vlastní postup

1. Připravila jsem si roztok kompletního koregulatorového pufru přidáním 1 M DTT do koregulatorového pufru G pro získání finální koncentrace 10 mM DTT a potřebné množství jsem dala do mrazáku pro zachování podmínek při další práci s 4X roztokem FXR-LBD.

2. Poté jsem si připravila zásobní roztoky vlastních agonistů nejprve postupným ředěním za užití DMSO pro získání 100X koncentrovaných roztoků z finální požadované koncentrace. Užitými testovanými potenciálními agonisty byly anthocyanidiny – peonidin, petunidin, pelargonidin, cyanidin, delphinidin, malvidin, a alkaloidy z *Fumaria officinalis* - protopinu, alkaloid S, fumaricinu, parfumidinu, fumarilinu, O-methyl-fumarofinu, bikukulinu, parfumidinu, fumaritinu, O-Methylfumarofycinu a hydrochloridu fumarofycinu. Jako pozitivní kontrola byl využit známý agonista FXR látka s označením GW 4064.

3. Následně byl každý agonista opět zředěn na 2X roztok užitím kompletního koregulatorového pufru.

4. Připravila jsem 4X roztok FXR-LBD užitím ledového kompletního koregulatorového pufru G. Kdy doporučenou molární koncentraci jsme našli na certifikátu. Se vším bylo dle návodu zacházeno opatrně a stále skladováno na ledu.

4. Posledním krokem před provedením vlastní analýzy byla příprava roztoku složeného z 2,0 μ M fluorescein-SRC2-2 (4X) a 20 nM Tb anti-GST protilátky (4X) rovněž za užití kompletního koregulatorového pufru při pokojové teplotě. Koncentrace složek byly uvedeny na signatuře vialek a na certifikátu.

3. Do předem označené mikrotitrační 96- jamkové destičky jsem natitrovala 10 μ l agonisty dané koncentrace (v případě negativní kontroly 10 μ l solventu), poté 5 μ l připraveného 4X roztoku FXR-LBD. Nechala jsem 5 min působit, aby došlo k navázání agonisty a poté natitrovala 5 μ l 4X roztoku Fluorescein-SRC2-2/4X Tb anti-GST protilátky.

4. Mikrotitrační destička byla překryta průhlednou folií, umístěna do míchačky na 5 min a poté inkubována při pokojové teplotě za nepřístupu světla.

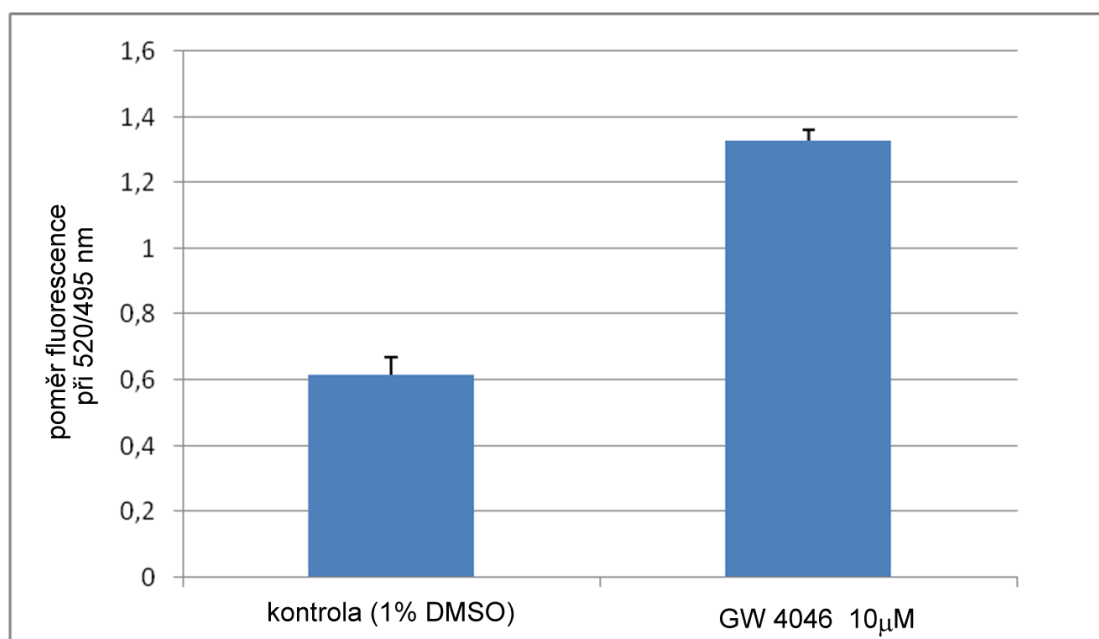
5. Po 1 hodině jsem odstranila folii a destičku vložila do přístroje. Ozařování probíhalo při vlnových délkách 520 nm a 495 nm nastavení přístroje.

6. Poté byly výpočty z poměrů hodnot získaných při ozáření dvěma vlnovými délkami získány výsledky a na základě výpočtů vytvořen graf.

6. VÝSLEDKY

6.1 Experiment č. 1 - ověření funkčnosti analýzy

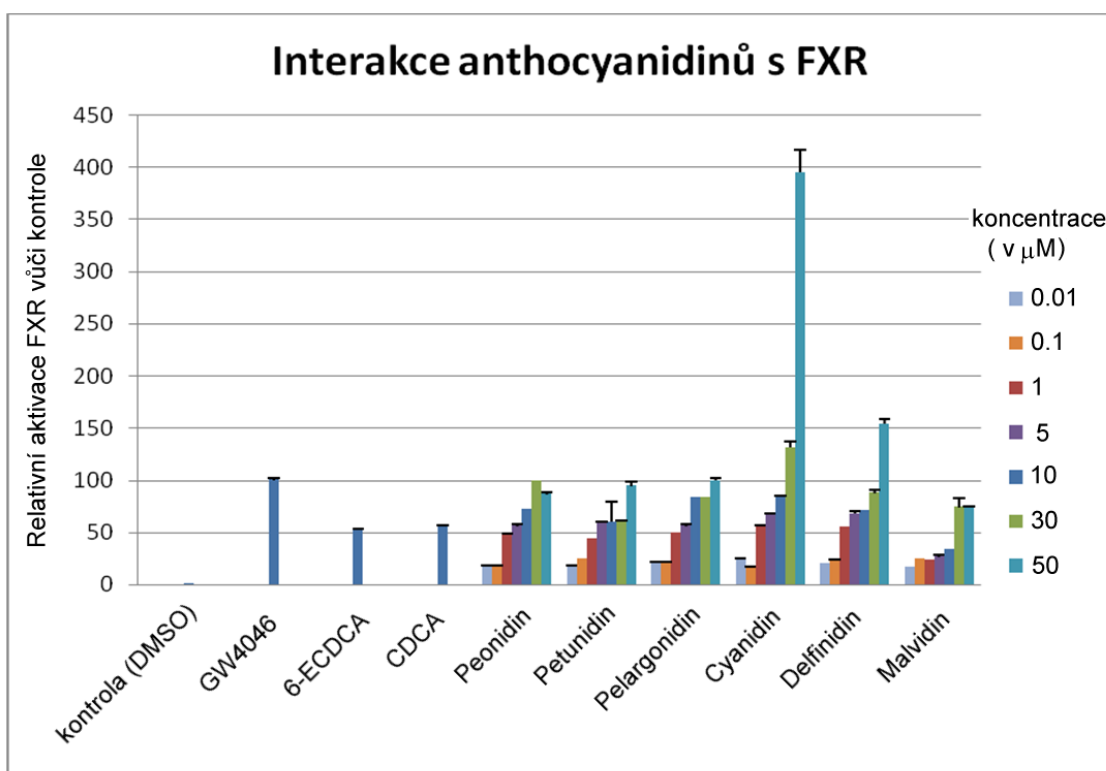
V rámci tohoto experimentu jsem postupovala dle výše uvedeného postupu. V tomto případě byl pro ověření funkčnosti analýzy testován známý agonista FXR GW4046 jako pozitivní kontrola v porovnání negativní kontrolou obsahující DMSO. Jak je patrné z grafu, byla ověřena funkčnost analýzy potvrzením interakce GW4046 s FXR v porovnání s negativní kontrolou.



Obr 40. Validace LanthaScreenTM TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) farnesoidní X receptor koaktivátorová eseje za použití známého ligandu FXR GW4046 (10 μ M).

6.2 Experiment č. 2 – testování vlastních anthocyanidinů

Dále jsem jako potenciální agonisty testovala anthocyanidiny – peonidin, petunidin, pelargonidin, cyanidin, delphinidin a malvidin a to v koncentracích 50 μM , 30 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 0,1 μM a 0,01 μM . Jako známý agonista byl použit GW4046, obeticholová kyselina a CDCA v koncentraci 30 μM . Funkčnost analýzy je zde patrná při pohledu na sloupce GW4046, (6-ECDC) a chenodeoxycholová kyselina (CDCA), jež jsou ověřenými známi agonisty FXR. Z grafu je patrné, že všechny testované anthocyanidiny reagují s FXR. Patrně nejsilnější interakci s FXR receptorem pak vykazuje cyanidin v koncentracích 50 μM a 30 μM a dále delphinidin a pelargonidin v 50 μM koncentraci. Experiment byl opakován dvakrát se stejnými výsledky. Statistická významnost nebyla analyzována.

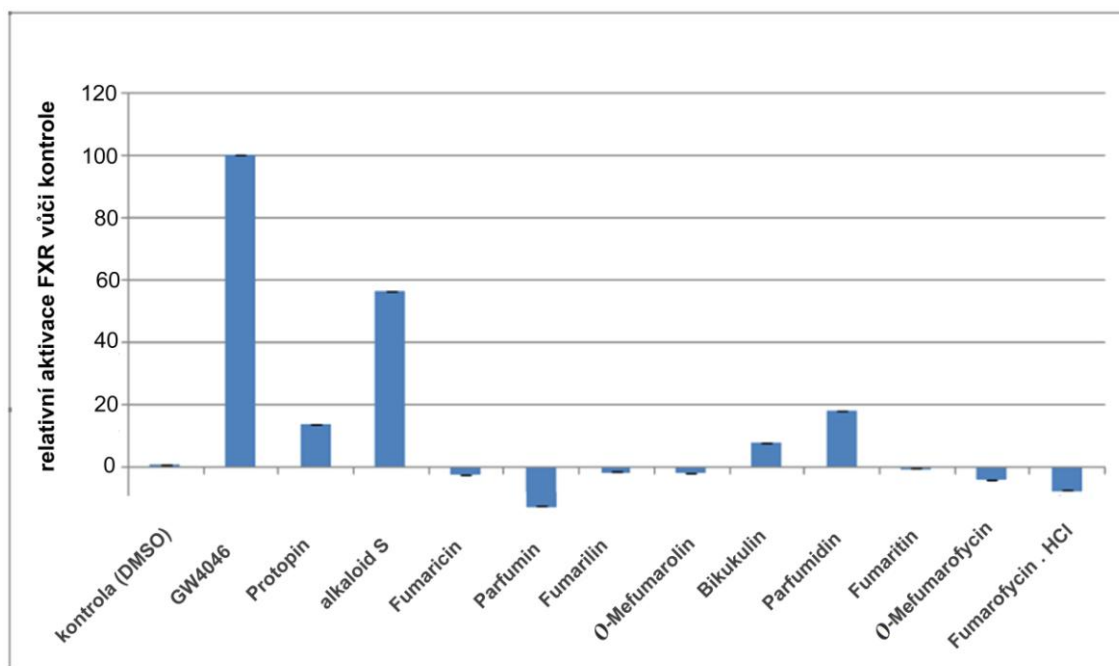


Obr 41. Interakce anthocyanidinů s lidským FXR receptorem. LanthaScreenTM TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) farnesoidní X receptor koaktivátorová eseje byla využita podle protokolu uvedeného v kapitole 5.4 Postup pro otestování interakcí peonidinu, petunidinu, pelargonidinu, cyanidinu, delphinidinu a malvidinu s FXR receptorem. Současně byly použity známé ligandy FXR receptoru: GW4046, kyselina obeticholová (6-ECDC), kyselina chenodeoxycholová (CDCA) v uvedených koncentracích. Výsledky jsou prezentovány jako relativní aktivace FXR receptoru vztážená ke kontrolnímu vzorku obsahující DMSO, které bylo použito jako rozpouštědlo.

6.3 Experiment č. 3 – testování látek obsažených ve *Fumaria officinalis*

Cílem experimentu bylo ověření potenciální interakce látek izolovaných z *Fumaria officinalis* - protopinu, alkaloidu S, fumaricinu, parfumidinu, fumarilinu, *O*-methylfumarofinu, bikukulinu, parfumidinu, fumaritinu, *O*-methylfumarofycinu a hydrochloridu fumarofycinu. Postup byl stejný jako v předchozích případech. Tyto látky jsem testovala při 10 μ M koncentraci. Z grafu je patrné, že zvláště v případě alkaloidu S by se mohlo jednat o silného agonistu FXR, menší interakce pak je patrná u protopinu, bikukulinu a parfumidinu. Pro další potvrzení těchto předpokladů je ale nutný další výzkum. Některé alkaloidy, např. parfumin, *O*-Me-fumarofycin a fumarofycin hydrochlorin pravděpodobně intereferovaly s fluorescencí fluoresceinu. Nemůžeme vyloučit ani vliv (např. inhibiční nebo denaturační) na rekombinantní FXR receptor v této eseji.

Experimenty byly opakovány ve dvou nezávislých experimentech, statistická analýza proto nebyla provedena.



Obr 42. Interakce alkaloidů *Fumaria officinalis* s lidským FXR receptorem. LanthaScreen™ TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) farnesoidní X receptor koaktivátorová eseje byla využita podle protokolu uvedeného v kapitole 5.4 Postup pro otestování interakcí protopinu, alkaloidu S, fumaricinu, parfuminu, fumarilinu, *O*-methylfumarolinu, bikukulinu, parfumidinu, fumaritinu, *O*-methylfumarofycinu a fumarofycinu hydrochloridu s FXR receptorem. Současně byl použit známý ligand FXR receptoru látka s označením GW4046. Všechny látky byly testovány v koncentraci 10 μ M. Výsledky jsou

prezentovány jako relativní aktivace FXR receptoru vztažená ke kontrolnímu vzorku obsahující DMSO, které bylo použito jako rozpouštědlo.

7. DISKUZE

Ve své rigorózní práci jsem se zabývala FXR receptorem a jeho interakcí s anthocyanidiny – peonidinem, petunidinem, pelargonidinem, cyanidinem, delphinidinem a malvidinem a také alkaloidy z *Fumaria officinalis* - protopinem, alkaloidem S, fumaricinem, parfumidinem, fumarilinem, *O*-methylfumarofinem, bikukulinem, parfumidinem, fumaritinem, *O*-methylfumarofycinem a hydrochloridem fumarofycinu.

Pro zjištění možné interakce s farnesoidním X receptorem jsem využila metodu TR-FRET Lanthascreen FXR koaktivátorovou esej. Výhodou této metody bylo překonání intervencí vyvolaných autofluorescencí sloučenin nebo rozptylem světla precipitovaných sloučenin.

Pro ověření funkčnosti analýzy a také pro porovnání schopnosti interakce s FXR jsem jako pozitivní kontrolu použila známé agonisty FXR – GW4046, kyselinu obeticholovou a chenodeoxycholovou kyselinu (CDCA). Dle výsledků lze předpokládat, že anthocyanidiny skutečně s FXR v různé míře reagují, a to již od nejnižších testovaných koncentrací. Porovnáním hodnot získaných při ozáření mikrotitrační destičky s anthocyanidiny s těmito známými ligandy pak lze říci, že významnou potenciální interakci vykazovaly cyanidin v koncentracích 50 μM a 30 μM a dále delphinidin a pelargonidin v 50 μM koncentraci.

Při pohledu na testované struktury anthocyanidinů je zřejmé, že jde o látky polyfenolického charakteru. Základní struktura všech těchto látek je stejná – jde o flavan, čím se ale odlišují je počet a poloha hydroxyskupin a to především v polohách C-3' a C-5'. Cyanidin obsahuje pět fenolických skupin s tím, že navíc má hydroxyskupinu navázanou buď v poloze C-3' či C-5', tato skupina navíc, stejně jako její poloha a stejně jako další neobsazené polohy umožňující vazbu mohou být příčinnou vyšší afinity k LBD FXR a důvodem proč cyanidin v experimentu vykazoval nejsilnější agonistické účinky v porovnání s ostatními anthocyanidiny. Naproti tomu malvidin obsahuje v obou polohách C-3' a C-5' *O*-metylované skupiny, v důsledku jejichž přítomnosti mohla být možnost interakce s LBD FXR snížena, a v experimentu mohla být příčinnou nejnižší vyazované agonistické aktivity.

Limitující je v případě tohoto experimentu fakt, že je vše prováděno mimo prostředí skutečného organismu či buňky a tudíž mohou být výsledky zavádějící a esej s rekombinantním FXR může interakce nadhodnocovat. Pro další ověření těchto výsledků

jsou tedy nutné další studie na buňkách a organismech. Předběžné výsledky za použití buněčné luciferázové genové reportérové eseje potvrzují, že např. cyanidin a delphinidin aktivují FXR i na buněčném modelu (Dubecká 2016).

Pokud by však byla interakce anthocyanidinů s FXR prokázána, jednalo by se o zajímavou novou možnost ovlivnění mnoha zásadních metabolických a signálních drah přírodními látkami. Jak již bylo uvedeno v teoretické části, farnesoidní X receptor zasahuje na genové úrovni do mnoha fyziologických procesů, jakými jsou metabolismus žlučových kyselin, triglyceridů a cholesterolů, lipoproteinů, glukózy, inzulinové signální dráhy a všeobecně jaterních funkcí. Z hlediska patologického, pak možnost ovlivnění FXR v případě např. dyslipidémie, metabolického syndromu, aterosklerózy, diabetu mellitu II. typu, jaterní steatózy a různých forem rakoviny představuje slibnou strategii v řešení těchto obtíží. Na druhou stranu při prokázání interakce testovaných látek s FXR je potřeba zvážit i možné ovlivnění probíhající terapie ať už v pozitivním či negativním smyslu. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.4, proanthocyanidiny se vyskytují v množství barevných rostlin, ovoci a zelenině. V současné době, kdy se při hledání optimalizace léčby nemocí a řešení patologických stavů postupuje stále více z širšího pohledu, tzn., že léčba nezahrnuje pouze podávání různých chemoterapeutik, pravidelné monitorování léčby a fyzikální způsoby řešení problémů, ale často i změnu stravy a špatných návyků. Právě díky tomu stoupá výzkum těchto látek na důležitosti. Stále více studií poukazuje na antioxidační vliv antokyanů a jejich možného využití v potravinářském průmyslu, zejména s ohledem na snížené riziko toxicity těchto látek jako barviv a antioxidantů v porovnání s některými dnes využívanými. Také je zkoumán potenciál těchto látek v léčbě a prevenci rakoviny. Jak navíc naše výsledky naznačují, mohly by testované anthocyanidiny pozitivně ovlivňovat metabolismus žlučových kyselin, triglyceridů, cholesterolu, glukózy prostřednictvím své interakce s FXR.

Další skupinou testovaných látek byly již zmíněné alkaloidy získané z rostliny *Fumaria officinalis*. Jak bylo naznačeno v kapitole 3.6, studované alkaloidy vykazují široké spektrum účinků. Mechanismus některých těchto účinků může být vysvětlen právě na základě možné interakce s FXR. Výsledky prováděného experimentu naznačují, že z testovaných alkaloidů by se právě v případě alkaloidu S mohlo jednat o agonistu FXR.

Cholagogní účinky rostliny *Fumaria officinalis* byly pozorovány u fenolových kyselin – kyseliny skořicové, kávové, ferulové a p-kumarové, nicméně provedený

experiment by mohl vzhledem k interakci s FXR a jeho roli v metabolismu žlučových kyselin naznačovat i ovlivnění stimulační sekrece žluče působením protopinu jako majoritního alkaloidu a v závislosti na koncentraci i vliv alkaloidu S. Navíc pokud by se skutečně v případě alkaloidu S jednalo o agonistu FXR, bylo by jeho využití obdobně jako u testovaných anthocyanidinů zajímavou možností pro ovlivnění metabolických a signálních drah. (Shakya et al. 2012)

Obdobně jako u experimentu s anthocyanidiny je ovšem nutné provést další testy a to v prostředí skutečného organismu či buňky, aby se ukázalo, jak se alkaloidy budou chovat.

8. ZÁVĚR

Interakce přírodních látek nejen s FXR a jinými receptory představuje zajímavou a dosud málo prozkoumanou oblast, které je třeba věnovat větší zájem. Vliv FXR receptoru, ale i další členů superrodiny nukleárních receptorů na metabolismus člověka a zvířat je zásadní a to jak ve fyziologickém, tak v patologickém stavu. Využitím těchto znalostí by pak bylo možné správně zvolit strategii cílené terapie a předcházet či případně řešit lékové interakce, které vedou často ke snížení efektivity léčby a způsobují rostoucí nedůvěru pacientů v léčbu a směřují k noncompliance. Studium struktury nukleárních receptorů, jejich ligandů a mechanismů jejich působení by tak mohlo do budoucna představovat nový směr při volbě bezpečné a efektivní léčby.

9. LITERATURA

- Aboonabi A, Singh I. *Biomed Pharmacother.* Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2 -ARE as an indicator and modulator of redox. 2015;72:30-6.
- Amorini AM, Lazzarino G, Galvano F, et al. *Free Radic Res.* Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside protects myocardium and erythrocytes from oxygen radical-mediated damages. 2003;37(4):453–460.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, et al. *J Biol Chem.* Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. 2001;276(31):28857-65.
- Beg M, Singhal KC, Afzaal S. *Indian J Physiol Pharmacol.* A study of effect of guggulsterone on hyperlipidemia of secondary glomerulopathy. 1996;40(3):237-40
- Bell DR, Gochenaur K. *J Appl Physiol.* Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin rich extracts. 2006; 100: 1164–1170
- Boulias K, Katrakili N, Bamberg K, et al. *Embo J.* Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. 2005;24(14):2624–33.
- Cao Y, Bei W, Hu Y, et al. *Phytomedicine.* Hypocholesterolemia of *Rhizoma Coptidis* alkaloids is related to the bile acid by up-regulated CYP7A1 in hyperlipidemic rats. 2012;19(8-9):686-92.
- Cariou B, Staels B. *Trends Pharmacol Sci.* FXR: a promising target for the metabolic syndrome? 2007;28(5):236–43.
- Castaneda-Ovando A, Pacheco-Hernandez L, Paez-Hernandez E, et al. *Food Chem.* Chemical studies of anthocyanins: A review. 2009;113(4):859–71.
- Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MAA. *FoodResearch International.* Non-thermal stabilization mechanism of anthocyanins in model and food system-An overview. 2011;44(2):499–509.
- Claudel T, Staels B, Kuipers F. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. 2005;25(10):2020-30.
- Cui J, Huang L, Zhao A, et al. *J Biol Chem.* Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. 2003;278(12):10214-20.

- Čopíková J, Uher M, Lapčík O, et al. Chem. Listy 99. Přírodní barevné látky. 2005;802-16.
- Del Bas JM, Fernandez-Larrea J, Blay M, et al. FASEB J. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. 2005;19(3):479–81.
- Del Bas JM, Ricketts M-L, Baiges I, et al. Mol Nutr Food Res. Dietary procyanidins lower triglyceride levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. 2008;52(10):1172-81
- Del Bas JM, Ricketts ML, Vaqué M, et al. Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR *in vitro* and reduce triglyceridemia *in vivo* in a FXR-dependent manner. 2009;53(7):805-14.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. Crit Rev Food Sci Nutr. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains—characteristics, biosynthesis, processing and stability. 2000;40(3):173–289.
- Deng R, Yang D, Radke A, et al. J Pharmacol Exp Ther. The hypolipidemic agent guggulsterone regulates the expression of human bile salt export pump: dominance of transactivation over farnesoid X receptor-mediated antagonism. 2007;320(3):1153–62.
- Dev S. Environ Health Perspect. Ancient-modern concordance in Ayurvedic plants: some examples. 1999;107(10):783-9.
- Ding Y, Xie L, Chang CQ, et al. Chin Med J (Engl). Activation of γ -aminobutyric Acid (A) Receptor Protects Hippocampus from Intense Exercise-induced Synapses Damage and Apoptosis in Rats. 2015;128(17):2330-39.
- Dubecká M. Studium interakcí přírodních látek polyfenolické povahy s vybranými nukleárními receptory [Study of interactions of polyphenolic compounds on nuclear receptors][rigorous thesis] Hradec Králové (Česká republika): Karlova univ., Farmaceutická fakulta [Charles Univ., Faculty of Pharmacy]; 2015. 77p. Czech.
- Fiorucci S, Zampella A, Distrutti E. Curr Top Med Chem. Development of FXR, PXR and CAR agonists and antagonists for treatment of liver disorder. 2012;12(6):605-24.

- Flesch D, Gabler M, Lill A, et al. Fragmentation of GW4064 led to a highly potent partial farnesoid X receptor agonist with improved drug-like properties. 2015;23(13):3490-8.
- Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, et al. Eur J Nutr. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. 2006;45(1):7–18.
- Fimognari C, Berti F, Nusse M, et al. Chemotherapy. *In vitro* antitumor activity of cyanidin-3-*O*-beta-glucopyranoside. 2005; 51: 332–335
- Grienke U, Mihály-Bison J, Schuster D, et al. Bioorg Med Chem. Pharmacophore-based discovery of FXR-agonists. Part II: identification of bioactive triterpenes from *Ganoderma lucidum*. 2011;19(22):6779-91.
- Guerra MC, Galvano F, Bonsi L, et al. Br J Nutr. Cyanidin-3-*O*-beta-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B1- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCO-2). 2005; 94(2): 211–20
- Hou DX, Yanagita T, Uto T, et al. Biochem Pharmacol. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. 2005a; 70: 417–25
- Hou DX, Tong X, Terahara N, et al. Arch Biochem Biophys. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. 2005b; 440: 101–9
- Chang HF, Lin YH, Chu CC, et al. Am J Chin Med. Protective effects of Ginkgo biloba, Panax ginseng, and Schizandra chinensis extract on liver injury in rats. 2007;35(6):995–1009.
- Chen PN, Chu SC, Chiou HL, et al. Cancer Lett. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. 2006; 235(2):248-50
- Chlebek J, Novák Z, Kassemová D, et al. Chem. Biodivers. Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and Their Biological Activities Related to *Alzheimer's* Disease. 2016;13(1):91-9

- Klimaviciute R, Navikaite V, Jakstas V, et. al. Carbohydr Polym. Complexes of dextran sulfate and anthocyanins from *Vaccinium myrtillus*: Formation and stability. 2015;129:70-8.
- Kostelník J. Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *Fumaria officinalis* L. (*Fumariaceae*) I. [Study of biological activity of alkaloids isolated from *Fumaria officinalis* L. (*Fumariaceae*) I.][master's thesis]. Hradec Králové (Česká republika): Karlova univ., Farmaceutická fakulta [Charles Univ., Faculty of Pharmacy]; 2014. 76p. Czech.
- Koutsounas I, Giaginis C, Theocharis S. Histol Histopathol. Farnesoid X receptor (FXR) from normal to malignant state. 2012;27(7):835-53.
- Kuipers F, Stroeve JH, Caron S, et al. Curr Opin Lipidol. Bile acids, farnesoid X receptor, atherosclerosis and metabolic control. 2007;18(3):289–97.
- Lazze MC, Pizzala R, Perucca P, Cazzalini O, Savio M, Forti L, Vannini V, Bianchi L. Mol Nutr Food Res. Anthocyanidins decrease endothelin-1 production and increase endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. 2006; 50: 44–51
- Lapidot T, Harel S, Granit R, et al. J Agric Food Chem. Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. 1998;46(10):4297-4302.
- Li WH, Fu J, Zheng MY, et al. Yao Xue Xue Bao. Progress in the ligands and their complex structures of farnesoid X receptor. 2012;47(6):704-15.
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L. Brevný atlas farmakologie. 4th ed. Praha (CZ): Grada Publishing a.s.; 2012. xiv, 366 p. český.
- Ma K, Saha PK, Chan L, et al. J Clin Invest. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. 2006;116(4):1102-9.
- Mazza G, Kay CD, Cottrell T, et al. J Agric Food Chem. Absorption of anthocyanins FRF blueberries and serum antioxidant status in human subjects. 2002;50(26):7731-7.
- Mencarelli A, Renga B, D'Amore C, et al. Diabetes. Dissociation of intestinal and hepatic activities of FXR and LXR α supports metabolic effects of terminal ileum interposition in rodents. 2013;62(10):3384-93.
- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, et al. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rat and humans. J. Agric. Food Chem. 1999;47(3):1083-91.

- Murray RK, Bender DA, Botham KM, et al. Harperova ilustrovaná biochemie. 5th ed. Praha (CZ): Galén; 2012. xii, 730 p. český.
- Nityanand S, Srivastava JS, Asthana OP. J Assoc Physicians India. Clinical trials with gugulipid. A new hypolipidaemic agent. 1989;37(5):323-8.
- Novák Z. Analýza struktury alkaloidů metodami multidimensionální NMR spektroskopie [Analysis of the structure of alkaloids using multidimensional NMR spectroscopy][Disertation thesis]. Hradec Králové (Česká republika): Karlova univ., Farmaceutická fakulta [Charles Univ., Faculty of Pharmacy]; 2015. 125p. Czech.
- Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. Anti-inflammatory effects of *Aronia* extract on rat endotoxin-induced uveitis. 2005; 46: 275–281
- Paganga G, Rice-Evans CA. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. FEBS Lett. 1997;401(1):78-82.
- Prior RL, Wu X. Free Radic Res. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. 2006;40(10):1014–28.
- Ramassamy C. Eur J Pharmacol. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. 2006;545(1):51–64.
- Rathi A, Srivastava AK, Shirwaikar A, et al. Phytomedicine. Hepatoprotective potential of *Fumaria indica* Pugsley whole plant extracts, fractions and an isolated alkaloid protopine. 2008;15(6-7):470-7.
- Ricketts ML, Boekschoten MV, Kreeft AJ, et al. Mol Endocrinol. The Cholesterol-Raising Factor from Coffee Beans, Cafestol, as an Agonist Ligand for the Farnesoid and Pregnane X Receptors. 2007;21(7):1603–16.
- Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, et al. Food Chem. Organ specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blue berry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). 2008;110(1):156-60.
- Russo A, La Fauci L, Acquaviva R, Campisi A, Raciti G, Scifo C, Renis M, Galvano G, Vanella A, Galvano F. J Nutr Biochem. Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: Protective effect of cyanidin 3-*O*-beta-D-glucoside. 2005; 16(1): 31–7

- Sadilova E, Stintzing FC, Carle R. *J Food Sci*. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. 2006;71(8):504–12.
- Sadilova E, Florian RC, Stintzing C. *Mol Nutr Food Res*. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. 2007;51(12):1461–71.
- Sadruddin S, Arora R. *J Cardiometab Syndr*. Resveratrol: biologic and therapeutic implications. 2009;4(2):102-6.
- Saeed SA, Gilani AH, Majoo RU, et al. *Pharmacol Res*. Anti-thrombotic and anti-inflammatory activities of protopine. 1997;36(1):1-7.
- Sachar M, Ma X. *Drug Metab Rev*. Nuclear receptors in herb-drug interactions. 2013; 45(1):73-8.
- Satou T, Akao N, Matsushashi R, et al. *Biol Pharm Bull*. Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of *Toxocara canis*. 2002;25(12):1651-4
- Satyavati GV. *Indian J Med Res*. Gum guggul (*Commiphora mukul*)- the success story of an ancient insight leading to a modern discovery. 1988;87:327–35.
- Scarabelli TM, Marotto S, Abdel-Azeim S, et al. *FEBS Lett*. Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion induced injury. 2009;583(3):531–41.
- Seeram NP, Bourquin LD, Nair MG. *J Agric Food Chem*. Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. 2001;49(10), 4924–29.
- Shakya A, Chatterjee SS, Kumar V. *Chinese Medicine*. Holistic Psychopharmacology of *Fumaria intica* (*Fumitory*). 2012;3(4):182-199.
- Shih PH, Yeh CT, Yen GC. *Food Chem Toxicol*. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. 2005; 43(10): 1557–66
- Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, et al. *J Agric Food Chem*. Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and highperformance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 2006;54(3):884–92.

- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, et al. *J Biol Chem*. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. 2004;279(27):27941–7.
- Schuster D, Markt P, Grienke U, et al. *Bioorg Med Chem*. Pharmacophore-based discovery of FXR agonists. Part I: Model development and experimental validation. 2011;19(23):7168-80.
- Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, et al. *Cell*. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. 2000;102(6):731–44.
- Singh RB, Niaz MA, Ghosh S. *Cardiovasc Drugs Ther*. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Commiphora mukul* as an adjunct to dietary therapy in patients with hypercholesterolemia. 1994;8(4):659-64.
- Skemiene K, Rakauskaite G, Trumbeckaite S, et al. *Int J Biochem Cell Biol*. Anthocyanins block ischemia-induced apoptosis in the perfused heart and support mitochondrial respiration potentially by reducing cytosolic cytochrome c. 2013;45(1):23–9.
- Skemiene K, Liobikas J, Borutaite V. *FEBS J*. Anthocyanins as substrates for mitochondrial complex I - protective effect against heart ischemic injury. 2015;282(5):963-71.
- Sliva D, Loganathan J, Jiang J, et al. *PLoS One*. Mushroom *Ganoderma lucidum* prevents colitis-associated carcinogenesis in mice. 2012;7(10):e47873.
- Song LS, Ren GJ, Chen ZL, et al. *Br J Pharmacol*. Electrophysiological effects of protopine in cardiac myocytes: inhibition of multiple cation channel currents. 2000;129(5):893-900.
- Song X, Chen Y, Valanejad L, et al. *J Lipid Res*. Mechanistic insights into isoform-dependent and species-specific regulation of bile salt export pump by farnesoid X receptor. 2013;54(11):3030-44.
- Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, et al. *Chem. Listy* 93. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. 1999;(4):229-37
- Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, et al. *Am J Cardiol*. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. 2005;96(6):810–4.

- Tarozzi A, Marchesi A, Hrelia S, Angeloni C, Andrisano V, Fiori J, Cantelli-Forti G, Hrelia P. *Photochem Photobiol.* Protective effects of cyanidin-3-*O*-beta-glucopyranoside against UVA-induced oxidative stress in human keratinocytes. 2005; 81(3): 623-9
- Tavani A, Spertini L, Bosetti C, et al. *Public Health Nutr.* Intake of specific flavonoids and risk of acute myocardial infarction in Italy. 2006;9(3):369–74.
- Tebib K, Besancon P, Rouanet JM. *J Nutr.* Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. 1994; 124(12):2451–7.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, et al. *Nat Rev Drug Discov.* Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. 2008;7(8):678-93.
- Tomas M, Toydemir G, Boyacioglu D, et al. The effects of juice processing on black mulberry antioxidants. 2015;186:277-84.
- Toufektsian MC, de Lorgeril M, Nagy N, et al. *J Nutr.* Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protect the rat heart against ischemia-reperfusion injury. 2008;138(4):747–52.
- Tsang C, Auger C, Mullen W, et al. *Br J Nutr.* The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. 2005; 94(2):170–81.
- Unno A, Takada I, Takezawa S, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. 2005; 327(3):933–8.
- Urizar NL, Moore DD. *Annu Rev Nutr.* GUGULIPID: A natural cholesterol-lowering agent. 2003;23:303–13.
- Urizar NL, Liverman AB, Dodds DT, et al. *Science.* A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. 2002;296(5573):1703-6.
- Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, et al. *J Nutr.* Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. 2007; 137(9):2043–8.
- Vrba J, Vrablova E, Modriansky M, et al. *Toxicol Lett.* Protopine and allocryptopine increase mRNA levels of cytochromes P450 1A in human hepatocytes and HepG2 cells independently of AhR. 2011;203(2):135-41.
- Wang S, Lai K, Moy FJ, et al. *Endocrinology.* The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. 2006;147(9):4025-33.

- Wang YD, Chen WD, Huang W. *Histol Histopathol.* FXR, a target for different diseases. 2008; 23(5):621–7.
- Watanabe M, Houten SM, Wang L, et al. *J Clin Invest.* Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. 2004;113(10):1408–8.
- Woodward G, Kroon P, Cassidy A, et al. *J Agric Food Chem.* Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. 2009;57(12):5271-8.
- Wang GX, Zhou Z, Jiang DX, et al. *Vet. Parasitol.* *In vivo* anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. 2010;171(3-4):305-13.
- Wu J, Xia C, Meier J, et al. *Mol Endocrinol.* The hypolipidemic natural product guggulsterone acts as an antagonist of the bile acid receptor. 2002;16(7):1590–7.
- Xiao X, Liu J, Hu J, et al. *Eur J Pharmacol.* Protective effects of protopine on hydrogen peroxide-induced oxidative injury of PC12 cells via Ca(2+) antagonism and antioxidant mechanisms. 2008;591(1-3):21-7.
- Xie X, Zhao R, Shen GX. *J Agric Food Chem.* Influence of delphinidin-3-glucoside on oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress and apoptosis in cultured endothelial cells. 2012;60(7):1850–6.
- Yan D, Jin Ch, Xiao XH, et al. *J Biochem Biophys Methods.* Antimicrobial properties of berberine alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry. 2008;70(6):845-9.
- Yeh CT, Yen GC. *J Agric Food Chem.* Induction of apoptosis by the anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-terminal kinase cascade in hepatoma cells. 2005; 53: 1740–1749
- Yi W, Fischer J, Krewer G, et al. *J Agric Food Chem.* Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. 2005; 53(18): 7320–9
- Zaffino C, Russo B², Bruni S². *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of anthocyanidins. 2015;149:41-7.
- Zanolini P, Zavatti M. *J Ethnopharmacol.* Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. 2008;116(3):383-96.

- Zhang Y, Edwards PA. FEBS Lett. FXR signaling in metabolic disease. 2008; 582(1):10–8.
- Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. Life Sci. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. 2005; 76(13): 1465–72
- Zhang X, Huang H, Zhang Q, et al. Int J Mol Sci. Phytochemical Characterization of Chinese Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) of 17 Cultivars and Their Antioxidant Properties. 2015;16(6):12467-81.

Elektronické citace

- Brossi A [editor]. The alkaloids V38: Chemistry and pharmacology [book]. London: Academic Press;1990, 336p. Available from: <https://books.google.cz/books?id=BkDyhc-RrKkC&pg=PA27&lpg=PA27&dq=The+alkaloids+V38:+Chemistry+and+pharmacology+edition&source=bl&ots=791afV2yOx&sig=-br2rb0KySRpsfig2LLfyBGShY8&hl=cs&sa=X&ved=0CCQQ6AEwAWoVChMIvvdosCjyAIVQn8aCh15BQKj#v=onepage&q=The%20alkaloids%20V38%3A%20Chemistry%20and%20pharmacology%20edition&f=false>
- *Cerasus avium* [image on the Internet]. 2008. Available from: <http://botany.cz/cs/prunus-avium/32>
- *Commiphora Mukul* [image on the Internet]. 2006. Available from: <http://toddcaldcott.com/herbs/guggulu/>
- *Fumaria officinalis* [image on the Internet]. 2007. http://www.apatita.com/herbario/Papaveraceae/large/Fumaria_officinalis_subsp_officinalis_2.jpg
- *Ganoderma Lucidum* [image on the Internet]. 2011. Available from: <http://www.biolib.cz/cz/image/id179019/>
- LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay. Carlsbad (CA): Invitrogen Corporation, 2007. Dostupné z: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/lanthascreen_FXR_man.pdf
- *Malva sylvestris* [image on the Internet]. Available from: <http://newfs.s3.amazonaws.com/taxon-images-1000s1000/Malvaceae/malva-sylvestris-fl-gcarr1.jpg>
- *Paeonia officinalis* [image on the Internet]. 2006. Available from: <http://www.paeo.de/h2007/warmerdam/roseaplana.JPG>

- *Petunia hybrida* [image on the Internet]. 2011. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c1/Petunia_hybrida_01.JPG
- *Pelargonium peltatum* [image on the Internet]. 2005. Available from: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/31/Pelargonium_peltatum_hort._a1.jpg
- *Rhizoma Coptidis* [image on the Internet]. 2010. Available from: <http://evidencebasednaturalhealth.weebly.com/coptidis-rhizoma-huanglian.html>
- *Vaccinium vitis-idaea*, *Ericaceae* [image on the Internet]. 2003. Available from: http://www.nasevyziva.cz/img_data_arch/1/1323520822cla_ML505_IMG0092.jpg
- *Vitis Vinifera* [image on the Internet]. 2011. http://www.zelen.cz/images/galerie/galerie/1054/images/galerie/vitis_vinifera_rutaj_02.jpg