

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**MOLEKULÁRNÍ PODSTATA LÉKOVÝCH INTERAKCÍ –
INTERAKCE KONSTITUTIVNÍHO ANDROSTANOVÉHO
RECEPTORU S VYBRANÝMI STILBENOIDY**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2019

Lenka Linhartová

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.

Datum a podpis: _____

Ráda bych na tomto místě poděkovala Prof. PharmDr. Petru Pávkovi Ph.D. za jeho cenné rady a čas, který mi věnoval při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Josefu Škodovi za jeho čas a pomoc při provádění experimentu.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Lenka Linhartová

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

Název diplomové práce: Molekulární podstata lékových interakcí – interakce konstitutivního androstanového receptoru s vybranými stilbenoidy

Konstitutivní androstanový receptor (CAR), člen rodiny nukleárních receptorů, je významným regulátorem exprese enzymů I. a II. fáze eliminace endobiotik a xenobiotik. Ovlivnění jeho aktivity může vést ke vzniku farmakokinetických lékových interakcí, neúčinku terapie nebo zvýšení toxicity léčiv podaných spolu s jeho ligandy. V relativně nedávné době byl objeven i vliv tohoto receptoru na homeostázu žlučových kyselin, lipidů a glukózy a je na něj teď nahlíženo jako na potenciální cíl léčiv u metabolických onemocnění.

Stilbenoidy jsou malou skupinou rostlinných polyfenolů s charakteristickým 1,2-difenylethylenovým jádrem. Nejznámějším zástupcem je bezpochyby resveratrol, kterému je věnována velká pozornost díky jeho antioxidačním, protizánětlivým, antiproliferativním a kardioprotektivním účinkům. Ukazuje se, že i další látky této skupiny jako pterostilben, piceatannol nebo pinosylvin mají obdobně příznivé účinky na lidské zdraví.

Cílem této práce bylo otestovat 12 látek ze skupiny stilbenoidů jako potenciálních ligandů myšího CAR. Za tímto účelem byla použita metoda gene reporter assay na buňkách hepatomové linie HepG2. Výsledky experimentů ukázaly, že látka *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilben by mohla být ligandem myšího CAR receptoru. *Trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilben se proto nabízí pro studium funkcí CAR na myších modelech a může tak přispět k hlubšímu poznání role CAR v organismu.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lenka Linhartová

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

Title of diploma thesis: Molecular mechanisms of interactions – interactions of constitutive androstane receptor with selected stilbene compounds

Constitutive androstane receptor (CAR), member of nuclear receptors family, is a major regulator of gene expression of phase I and II enzymes metabolizing endobiotics and xenobiotics. Changes in its activity can lead to pharmacokinetic drug interactions, ineffective treatment or higher toxicity of drugs simultaneously administered with CAR ligands. Recently another effects of this receptor, especially in homeostasis of bile acids, lipids and glucose have been discovered and CAR is now considered as a potential drug target for the treatment of metabolic diseases.

Stilbenes represent a small group of plant polyphenols with typical 1,2-diphenylethylene nucleus. The most famous member is resveratrol, which has attracted great attention thanks to its antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and cardioprotective effects. Others stilbene compounds such as pterostilben, piceatannol or pinosylvin have shown similar health beneficial effects as well.

The aim of this diploma thesis was examination of twelve stilbenes as potentials ligands of the mouse CAR. I used gene reporter assay and HepG2 human hepatoma cells. Results of my experiments show that *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbene is a ligand of murine CAR and could be used in further studies on CAR functions in mouse models and contribute to deeper understanding of the role of CAR receptor in organism.

Obsah

1. Seznam zkratk.....	7
2. Úvod	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Biotransformace, metabolismus a exkrece léčiv.....	11
3.2 Nukleární receptory.....	13
3.2.1 Struktura nukleárních receptorů	14
3.3 Konstitutivní androstanový receptor.....	16
3.3.1 Regulace transkripce CAR.....	17
3.3.2 Mechanismus aktivace CAR	18
3.3.3 Ligandy konstitutivního androstanového receptoru	20
3.3.4 Funkce konstitutivního androstanového receptoru.....	22
3.3.5 Vliv CAR na nežádoucí účinky léčiv a lékové interakce	31
3.4 STILBENOIDY	36
3.4.1 Výskyt, obsah a distribuce stilbenoidů v rostlinné říši	37
3.4.2 Biosyntéza stilbenoidů	38
3.4.3 Farmakokinetika stilbenoidů	39
3.4.4 Vztahy mezi strukturou a účinkem.....	41
3.4.5 Zástupci stilbenoidů.....	42
4. CÍL.....	44
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	45
5.1 Reagencie a buněčné linie	45
5.2 Pomůcky a přístroje.....	46
5.3 Testované látky a jejich koncentrace	47
5.4 GENE REPORTER ASSAY	49
5.4.1 Princip	49
5.4.2 Postup metody	52
5.5 Statistická analýza dat	53
6. Výsledky	54
6.1 Gene reporter assay.....	54
7. Diskuze	58
8. Závěr	60
9. Literatura.....	61

1. Seznam zkratek

AF1 – aktivačně funkční doména 1

AF2 – aktivačně funkční doména 2

ABC transportéry – ATP binding cassette transportéry

AhR – arylhydrokarbonový receptor

ATP – adenosintrifosfát

CAR – konstitutivní androstanový receptor

CCRP – cytoplasmic CAR retention protein

ChREBP – carbohydrate-responsive element-binding protein

CITCO – 6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim

CYP – cytochrom P450

DBD – DNA vázající doména

DDI – drug-drug interaction, lékové interakce léčiv

DMEM – Duplecco's Modified Eagle's Medium

DMEs – léčiva metabolizující enzymy (drug-metabolizing enzymes)

DMSO – dimethylsulfoxid

eNOS – endoteliální NO syntáza

EGRF – receptor epidermálního růstového faktoru

EPHs – epoxidhydrolázy

ER – estrogenní receptor

FoxO1 – forkhead box protein O1

FXR – farnesoidní X receptor

G6Páza – glukóza-6-fosfatáza

GR – glukokortikoidní receptor

GRE – distální glukokortikoidní responzivní element

GSTs – glutathion-S-transferázy

HNF4 α – hepatický nukleární faktor 4 α

Hsp90 – protein tepelného šoku 90 (heat shock protein 90)

IL-1 – interleukin 1

IL-10 – interleukin 10

Insig-1 – insulin-induced gene 1

IRS – inzulinová responzivní sekvence

LBD – ligand vázající doména

LDL – low density lipoprotein

LXR – liver X receptor

mCAR – myší konstitutivní androstanový receptor

MDR – multidrug resistance protein

MET – receptor pro jaterní růstový faktor Met

mRNA – messenger RNA

MRP – multidrug resistance protein

NAPQI – N-acetyl-*p*-benzochinonimin

NATs – N-acetyltransferázy

NR – nukleární receptor

Nrf2 – nuclear factor-erythroid 2-related factor 2

OCT – transportéry organických kationtů (organic cation transporters)

OATP – polypeptidy transportující organické anionty (organic anion-transporting polypeptides)

PB – fenobarbital

PBREM – phenobarbital-responsive enhancer modul

PCAF – P300/CBP-associated factor

PEPCK – fosfoenolpyruvátkarboxykináza

PP2A – proteinová fosfatáza 2A

PPAR – peroxisome proliferator-activated receptor

PR – progesteronový receptor

PXR – pregnanový X receptor

QRs – chininreduktázy

RAR – receptor retinové kyseliny

RAREs – responzivní elementy kyseliny retinové

RE – responzivní element

ROR α – RAR-related orphan receptor α

RXR – retinoidní X receptor

Sir2 – silent information regulator

SRCs – steroid receptors coactivators

SREBPs – sterol regulatory element-binding proteins

STS – stilben synáza

SULTs – sulfotransferázy

TCPOBOP – 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen

TIF2 – transcriptional intermediary factor 2

TMS – *trans*-3,4,5,4'-tetramethoxy-stilben (DMU-212)

TNF- α – tumor nekrotizující faktor α

TR – thyroidní receptor

TSO – *trans*-stilbene oxid

UGTs – UDP-glukuronosyltransferázy

VDR – vitamin D receptor

VLDL – very low density lipoproteins

2. Úvod

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) je členem rodiny nukleárních receptorů, což jsou ligandem aktivované transkripční faktory ovlivňující expresi jejich cílových genů. Historicky je řazen mezi tzv. sirotčí „orphan“ receptory, z důvodu nenalezení jeho fyziologického ligandu. Byla však nalezena celá řada sloučenin, které ho jsou schopny aktivovat, proto se v současnosti označuje jako „adopted“ receptor.

Spolu s dalším významným nukleárním receptorem z této skupiny – pregnanovým X receptorem (PXR) ovlivňuje expresi enzymů I. a II. fáze metabolismu a některých transportérů. Hraje tak nezastupitelnou roli v regulaci metabolismu a eliminace xeno i endobiotik. Díky tomu je často označován jako xenosenzor. Jeho ovlivnění tedy může vést ke změnám ve farmakokinetice terapeuticky podávaných léčiv, zejména v jejich exkreci, a může také vést k lékovým interakcím nebo k vyšší toxicitě. Látkami, které aktivitu CAR ovlivňují, mohou být jiná současně podávaná léčiva, ale také přírodní látky užívané jako doplňky stravy nebo látky vyskytující se v potravě či environmentální polutanty. Nedávné studie odhalují i vliv tohoto receptoru na metabolismus žlučových kyselin, tuků a cukrů. To jenom potvrzuje důležitost CAR jako významného regulátora endogenních dějů a nastiňuje jeho možné budoucí využití v terapii metabolických onemocnění.

Stilbenoidy představují malou skupinu sekundárních metabolitů některých rostlin s typickým základním skeletem tvořeným 1,2-difenylethylenovým uskupením. Všeobecný zájem o tyto sloučeniny výrazně stoupl poté, co byl formulován tzv. Francouzský paradox, tedy skutečnost, že obyvatelé jižní Francie i přes tučnou dietu trpí kardiovaskulárními chorobami méně, než obyvatelé jiných zemí západní Evropy. Tento zdravotní fenomén je spojován s každodenním pitím menšího množství červeného vína a za látku zodpovědnou za příznivé zdravotní účinky tohoto nápoje byl označen právě zástupce stilbenoidů resveratrol. Extensivní studium této sloučeniny odhalilo jeho velice zajímavou biologickou aktivitu – antioxidační, kardioprotektivní, protizánětlivé, imunomodulační ale i antiproliferativní a chemoprotektivní působení (Berman a kol. 2017, Dubrovina a Kiseley 2017, Sinerol a kol. 2015).

Mezi látkami testovanými v této experimentální práci se nachází *cis*- i *trans*-izomery resveratrolu a piceatannolu, *trans*-pterostilben, *trans*-pinostilben a jejich polosyntetické deriváty. Pokud by některá z látek byla ligandem testovaného myšního CAR, mohlo by to vést k objasnění mechanismů působení daného stilbenoidu tak i konstitutivního receptoru.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Biotransformace, metabolismus a exkrece léčiv

Přítomnost xenobiotik, včetně karcinogenů, environmentálních polutantů a léčiv v těle významně ovlivňuje lidské zdraví. Schopnost vyloučit tyto látky z našeho těla je esenciální k přežití, a proto se vyvinuly mechanismy, jak tyto látky odstranit. Eliminace xenobiotik je zprostředkována řadou léčiva metabolizujících enzymů (drug-metabolizing enzymes, DMEs) a transportérů a skládá se ze čtyř stádií: absorpce/permeace, distribuce, metabolizace a exkrece. A právě DMEs I a II fáze a lékové transportéry hrají nezastupitelnou a klíčovou roli v metabolismu, detoxifikaci a eliminaci xenobiotik (Chen a kol. 2012).

Ve fázi I a II dochází k biotransformaci lipofilních xenobiotik na hydrofilní, ve vodě rozpustné metabolity, které transportéry snadněji vyloučí z buněk, respektive z těla. Za enzymy I. fáze považujeme skupiny rozličných dehydrogenáz, reduktáz a oxidáz, které detoxifikují xenobiotika zaváděním polárních funkčních skupin do jejich molekul. Nejvýznamnější skupinou enzymů I. fáze je nadrodina monooxygenáz cytochromu P450. Zavádí do molekuly reaktivní hydroxylovou skupinu, která zvyšuje hydrofilitu molekuly a zároveň představuje cílovou strukturu enzymů II. fáze. V nejhojnějším počtu se tyto enzymy nachází v játrech, najdeme je ale i v dalších orgánech podílejících se na eliminaci jako jsou plíce, gastrointestinální trakt a ledviny (Chen a kol. 2012).

Enzymy CYP jsou vázány na membrány endoplazmatického retikula (ER), kde katalyzují oxidační reakce a jsou esenciální pro biosyntézu cholesterolu a sterolů. Některé typy CYP cytochromů jsou přítomny i v jiných subcelulárních strukturách jako membrány mitochondrií a v lysozomech. V současné době rozlišujeme 17 rodin cytochromů, z nichž rodiny CYP1–4 a 7, dohromady je tvoří 17 členů, vykazují nízkou substrátovou specifitu a metabolizují široké spektrum xenobiotik. Na základě toho se jim přisuzuje klíčová úloha v hepatální i extrahepatální detoxifikaci a eliminaci. To ilustruje i podíl enzymů CYP2B6 a CYP2C na metabolismu xenobiotik – u prvního zmíněného je to 25%, u druhého 20% ze všech metabolizovaných xenobiotik. Sám CYP3A4 může metabolizovat přibližně 50–60% klinicky užívaných léčiv a je nezbytný pro metabolismus obsáhlé množiny endogenních substrátů včetně žlučových kyselin a steroidních hormonů (Chen a kol. 2012).

Ve fázi II dochází ke konjugaci endogenních ligandů s elektrofilními xenobiotiky nebo jejich metabolity z fáze I, primárně skrze metylaci, esterifikaci, acetylaci, glukuronidaci,

sulfataci a konjugaci s glutathionem a jinými aminokyselinami. Produkty II. fáze metabolismu jsou zpravidla více hydrofilní než původní sloučeniny, a tak i snáze vyloučitelné. Mezi DMEs II. fáze patří methyltransferázy, epoxidhydrolázy (EPHs), N-acetyltransferázy (NATs), glutathion-S-transferázy (GSTs), UDP-glukuronosyltransferázy (UGTs) a sulfotransferázy (SULTs). Nejčastějšími reakcemi jsou glukuronidace katalyzované několika isoformami UGT, v současné době je známo 19 izoform rozdělených do tří podrodin UGT1A, UGT2A a UGT2B. Nachází se výhradně na membráně ER, kde katalyzují glukuronidaci velké škály endogenních a exogenních látek, mají hlavní roli při eliminaci bilirubinu, což je konečný oxidativní produkt katabolizace hemu a je to jeden z nejtoxičtějších přirozených metabolitů (Chai a kol. 2019). Enzymy II. fáze se nachází především v játrech, střevě, a ledvinách, tedy stejných tkáních jako enzymy I. fáze, což umožňuje návaznost chemických reakcí zajišťujících metabolismus léčiv (Chen a kol. 2012).

Lékové transportéry, někdy označované jako enzymy III. fáze metabolismu, ovlivňují absorpci a exkreci širokého spektra strukturálně nepříbuzných xenobiotik skrz buněčnou membránu. Podle zdrojů energie můžeme efluxní transportéry rozdělit do dvou tříd: ATP binding cassette (ABC) transportéry, které využívají energii vzniklou hydrolýzou ATP a transportéry organických kationtů (organic cation transporters, OCT) a polypeptidy transportující organické anionty (organic anion-transporting polypeptides, OATP), které využívají energii vzniklou jako důsledek gradientu protonů (Chen a kol. 2012).

Z výše uvedeného vyplývá, že enzymy I. a II. fáze spolu s transportéry léčiv vytváří komplexní defenzivní systém, který eliminuje xenobiotika a toxické metabolity z lidského těla, brání jejich kumulaci a podílí se na udržení homeostázy, jsou tedy zásadní pro ochranu organismu (Pávek a kol. 2005, Chen a kol. 2012). Proto jsou tak významné změny v expresi biotransformačních enzymů a transportních proteinů zapříčiněné ovlivněním nukleárních receptorů, které právě transkripci těchto genů řídí. Hlavní podíl na regulaci transkripce DMEs mají nukleární receptory pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR). Pokud je xenobiotikem léčivo způsobující aktivaci receptorů PXR nebo CAR, může docházet ke změnám v expresi biotransformačních enzymů, což vede k ovlivnění farmakokinetických, případně farmakodynamických vlastností spolu podaného léčiva. Samo léčivo může ovlivnit i svou vlastní eliminaci (Pávek a kol. 2005). Důsledkem jsou časté lékové interakce mezi léčivy ale i mezi léčivy a přírodními látkami vyskytujícími se v potravě nebo v doplňcích stravy. Tyto interakce vedou k synergistickému nebo antagonistickému působení u jednoho nebo obou léčiv, ovlivní odpověď organismu na léčivo, jeho toxicitu a eliminaci nebo

způsobí nový účinek, který není pozorován, pokud jsou léčiva podána odděleně (Chen a kol. 2012).

3.2 Nukleární receptory

Nadrodina nukleárních receptorů (NR) tvoří jednu z nejpočetnějších tříd transkripčních regulátorů, sdružuje více než 50 členů a podílí se na kontrole a regulaci funkcí tak odlišných jako je reprodukce, diferenciaci, vývoj, metabolismus a homeostáze. Jsou to ve většině případů ligandem aktivované transkripční faktory, které regulují fyziologické procesy indukci transkripce cílových genů. Mezi endogenní ligandy NR patří steroidní hormony jako estrogeny, glukokortikoidy, progesteron, mineralokortikoidy, androgeny, vitamin D, oxysteroly, žlučové kyseliny, dále retinové kyseliny (všechny *trans* a *9-cis* isoformy), thyroïdní hormony, mastné kyseliny, leukotrieny a prostaglandiny (Duarte a kol. 2002, Garcia a kol. 2018).

Členové nadrodiny NR hrají také klíčovou roli v detekci a reakci organismu na xenobiotika jako jsou léčiva a environmentální látky, jejichž expozice má významný vliv na lidské zdraví. Xenobiotika ovlivňují transkripci řady genů exprimovaných v mnoha tkáních a orgánech jako jsou játra, ledviny, tenké střevo, plíce, mozek, placenta a slinivka, a tak ovlivňují i svůj vlastní metabolismus a exkreci. Toto působení na úrovni genové transkripce je zprostředkováno ovlivněním právě NR (Tolson a Wang 2010). Xenobiotická odpověď představuje komplexní skupinu chemických reakcí zaměřených na inaktivaci a eliminaci cizorodých látek, potlačení jejich toxického působení a regeneraci jimi poškozených tkání. Tato odpověď se rovněž týká toxických produktů metabolismu endogenních látek (Chai a kol. 2019).

NR jsou farmakologicky zajímavými cílovými strukturami při vývoji nových léčiv, a to jednak díky svým ligandům – malým molekulám, jejichž chemická struktura se dá snadno modifikovat, a jejich kontrolní funkci v řadě fyziologických procesů, které jsou vlivem patologických jevů často narušeny (Duarte a kol. 2002, Garcia a kol. 2018).

Jako první lidský NR byl za použití klasického endokrinologického přístupu izolován glukokortikoidní receptor (GR). Brzy poté byly identifikovány další endokrinní receptory jako estrogenní receptor (ER) a receptor hormonů štítné žlázy (TR). Pro tuto subrodinu NR je typická relativně kompaktní ligand vázající doména (LBD) a schopnost vázat s vysokou afinitou specifické endogenní ligandy v nanomolárních koncentracích (Tolson a Wang 2010).

Díky strukturální podobě na cystein bohaté DNA-vázající domény, kterou sdílí téměř všechny NR, došlo prohledáváním genomových knihoven k objevu nových NR. Takto byla objevena i skupina proteinů s podobnou základní strukturou, ale bez známých endogenních ligandů, jenž byla označena jako sirotčí „orphan“ receptory a tvoří druhou subrodinu NR. Množství NR „bez ligandu“ (tvoří asi 60 % známých NR), způsobilo posun od klasické endokrinologie k tzv. reverzní endokrinologii, kde místo hledání receptorů k purifikovaným hormonům, jsou rozpoznávány nové ligandy již známých receptorů. Ty NR, ke kterým byl takto ligand přiřazen jsou označovány jako „adopted“ – adoptované. Na rozdíl od klasických endokrinních receptorů se sirotčí NR vyznačují velkým množstvím lipofilních ligandů vázaných s nízkou afinitou v mikromolekulárních koncentracích (Tolson a Wang 2010).

Pozoruhodné také je, že většina ligandů sirotčích nebo adoptovaných receptorů jsou xenobiotika zahrnující léčivé látky, karcinogeny, potravinářská aditiva, pesticidy a environmentální polutanty. Některé NR fungují právě jako senzory takových xenobiotik a toxických metabolitů endogenních i exogenních látek. Mezi tyto xenosenzory, jak jsou často označovány, patří farnesoidní X receptor α (FXR α nebo NR1H4), liver X receptor (LXR), peroxisome proliferator activation receptors (PPARs), pregnanový X receptor (PXR, také znám jako steroid X receptor SXR nebo NR1I2), konstitutivní androstanový receptor (CAR nebo NR1I3), nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) a arylhydrokarbonový receptor (AhR). Je třeba zmínit, že AhR do rodiny NR nepatří, svou strukturou se řadí k proteinům s helix-loop-helix uspořádáním (Pávek a kol. 2005, Tolson a Wang 2010).

3.2.1 Struktura nukleárních receptorů

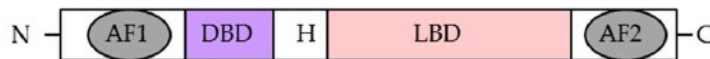
Nukleární receptory si jsou strukturně velmi blízké a sdílí charakteristické uspořádání jejich molekuly. Ta se skládá z ligand-vázající domény (LBD) na C-konci, DNA-vázající domény (DBD) na N-konci, dvou transaktivačních domén – aktivační funkce 1 (AF-1) a 2 (AF-2) a spojovací struktury viz Obr. 1 (Chen a kol. 2012). LBD vytváří jakousi kapsu, ve které dochází k nekovalentní interakci ligandů (hormonů, xenobiotik) na základě jejich chemické struktury s aminokyselinovými skupinami LBD. U CAR i PXR je tato doména větší a flexibilnější, což způsobuje nižší substrátovou specifitu těchto receptorů a umožňuje vazbu širokého spektra strukturálně odlišných sloučenin, v některých případech mohou být ligandy obou receptorů shodné nebo strukturně velmi podobné. DBD umožňuje vazbu nukleárního receptoru na specifickou sekvenci nukleotidů označovanou jako responzivní element (RE)

v promotorové oblasti cílových genů. DBD tedy určuje, u kterých genů dojde k indukci transkripce působením daného nukleárního receptoru (Pávek a kol. 2005, Garcia a kol. 2018).

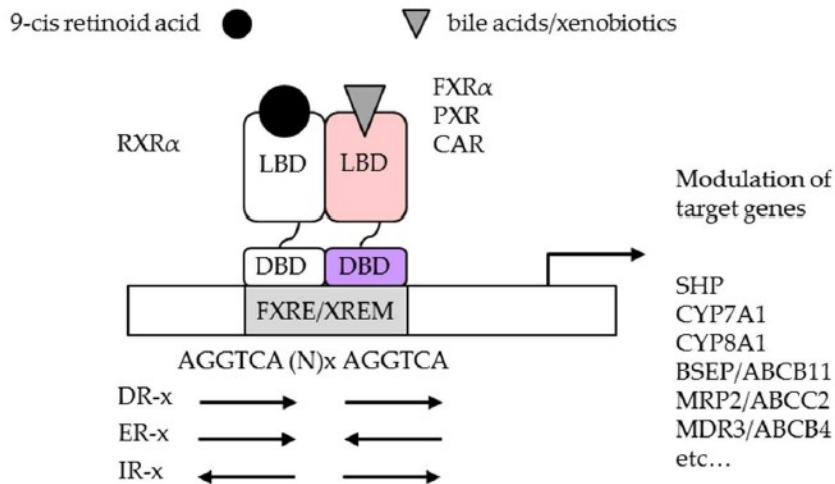
Transaktivační domény navádí transkripční koregulátory k promotorům cílových genů. Domény AF-1 jsou na ligandu nezávislé a nachází se poblíž N-konce molekuly, zatímco AF-2 domény jsou na ligandech závislé a nachází se blíž C-konci. Mezi koaktivátory a regulační transkripční faktory se řadí transcriptional intermediary factor 2 (TIF2), koaktivátory steroidních receptorů (steroid receptor co-activators, SRCs) a P300/CBP-associated factor (PCAF) (Chen a kol. 2012).

FXR, CAR i PXR vytváří při aktivaci ligandem heterodimery s retinoidními X receptory (RXR $\alpha/\beta/\gamma$) viz Obr.1. Takto vzniklý heterodimer vykazuje vyšší afinitu, s jakou se NR váží na DNA. Nejčastější je podtyp RXR α , který je dominantní ve většině tkání, heterodimery však vytváří všechny tři, tj. i RXR β a RXR γ (Garcia a kol. 2018, Pávek a kol. 2005).

(A) NR-Schematic domain structure.



(B) Bile acid-mediated NRs gene regulation.



Obr. 1

(A) **Primární proteinová struktura nukleárních receptorů:** AF-1 – aktivační funkce 1; DBD – DNA binding domain; H – spojovací struktura; LBD – ligand binding domain; AF-2 – transaktivační funkce 2

(B) **Model regulace genové exprese žlučových kyselin zprostředkované nukleárními receptory.** Nukleární receptory aktivované žlučovými kyselinami nebo xenobiotiky působí převážně jako heterodimery s retinoidním X receptorem α (RXR α) a regulují genovou transkripci.

FXRE, FXR α responsivní element; XREM, xenobiotický responsivní element; DR, direct repeat; ER, everted repeat; IR, inverted repeat

Převzato z: Garcia a spol. 2018

3.3 Konstitutivní androstanový receptor

Původně izolovaný jako sirotčí receptor v roce 1994 a pojmenován MB67, CAR je primárně exprimován v játrech a tenkém střevě, v jiných tkáních se vyskytuje jen omezeně (Chen a kol. 2012). Na základě struktury byl CAR zařazen do podskupiny 1 podrodiny 1 nukleárních receptorů spolu s PXR a VDR (Hernandez a kol. 2009). V posledních 15 letech si upevnil své postavení jako klíčový regulátor metabolismu xenobiotik řídící transkripci

enzymů a transportérů důležitých pro metabolismus a eliminaci léčiv a lékové interakce. Vliv má i na metabolismus endogenních látek jako jsou steroidy, žlučové kyseliny, vitamin D, hormony štítné žlázy a bilirubin (Molnár a kol. 2013).

CAR je jedinečný v rámci rodiny NR díky své schopnosti být konstitutivně aktivní za nepřítomnosti přímo se vážících ligandů, ale zároveň si zachovává možnost být aktivován nebo inhibován různými přímými i nepřímými chemickými modulátory (Cherian a kol. 2015).

Pro svou aktivaci nevyžaduje CAR navázání ligandu, snadno tvoří heterodimery s RXR, které cílí na responzivní elementy retinové kyseliny (retinoic acid response elements, RAREs) v promotorových oblastech cílových genů (Chen a kol. 2012). V roce 1998 byla identifikována první třída ligandů CAR, která zahrnuje androstanol a androstenol. Tyto sloučeniny byly charakterizovány jako inverzní agonisté, potlačují konstitutivní aktivitu CAR in vitro. Velký pokrok v pochopení fyziologické role CAR přišlo při poznání, že aktivace CAR fenobarbitalem (PB) a jemu podobnými induktory (*angl.* PB-like inducers) je spojená s indukcí genů z rodiny CYP2B. Tento objev následovalo velké množství studií zjišťujících roli CAR v detoxifikaci a exkreci xenobiotik. Indukční působení CAR na CYP2B bylo definitivně potvrzeno použitím CAR „knockoutovaného“ (tj. geneticky upraveného modelu bez exprese CAR) myšího modelu (Chai a kol. 2019).

Podobně jako PXR funguje i CAR jako chemický senzor a reguluje široké spektrum hepatálních a intestinálních biotransformačních enzymů fáze I (CYP3A4, CYPB6, CYP2Cs a CYP2A6), fáze II (UGTs, GSTs, SULTS) a detoxifikační lékové transportéry (multidrug resistance protein MDR1, znám také jako P-glykoprotein nebo ABCB1, multidrug resistance-associated proteins, MRPs a OATP2) (Wang a kol. 2012). CAR navíc také spolupracuje s PXR při reakci na xenobiotika. Oba receptory rozpoznávají podobné responzivní elementy a sdílí významné množství cílových genů. Nicméně díky skutečnosti, že CAR dokáže indukovat expresi cílových genů nezávisle na navázání ligandu, reguluje metabolismus xenobiotik odlišným způsobem než PXR (Chai a kol. 2019, Chen a kol. 2012).

3.3.1 Regulace transkripce CAR

Zatímco rychlá odpověď na xenobiotika je zprostředkována aktivací a translokací CARu do jádra, dlouhodobá ochrana zprostředkovaná CAR může být zvýšena transkripční up-regulací samotného genu *CAR*. Mnoho léčiv, látek využívaných v přírodní medicíně nebo environmentální polutanty způsobují zvýšení exprese CARu. Za těchto okolností se zdá být

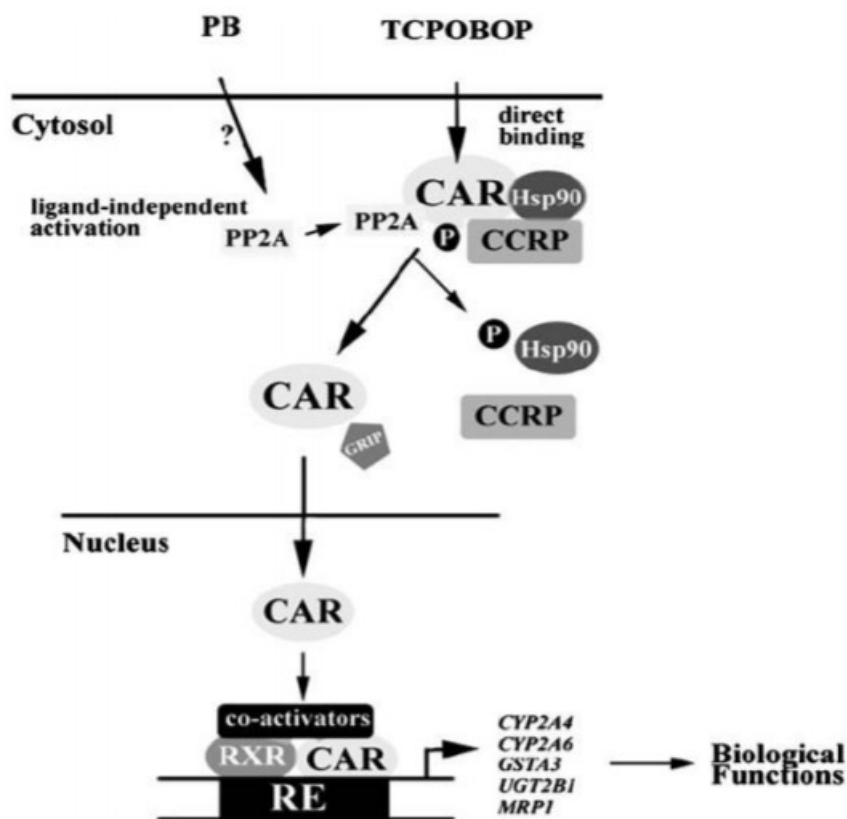
AhR nadřazeným transkripčním faktorem, který pozitivně reguluje *CAR*. Také glukokortikoidy (např. dexamethason) efektivně indukují expresi *CAR* v lidských hepatocytech v nanomolárních koncentracích. Distální glukokortikoidní responzivní element (distal glucocorticoid response element, GRE) byl nalezen v promotoru genu *CAR*, což naznačuje, že je *CAR* cílovým genem pro glukokortikoidní receptor (GR). Hormony štítné žlázy jsou schopny pomocí aktivace thyroideálního receptoru (TR) indukovat expresi *CARu* za fyziologických koncentrací. *Trans* retinová kyselina, metabolit vitamínu A, také stimuluje expresi mediátorové RNA kodující *CAR* přes receptor retinové kyseliny (retinoic acid receptor, RAR). Endogenní hormony a metabolity se zdají být velmi důležitými pro udržení bazální exprese *CARu* (Cherian a kol. 2015, Molnár a kol. 2013).

Několik studií také ukazuje vysokou indukovatelnost *CARu* v závislosti na hladovění nebo přísunu potravy u experimentálních hlodavců. Hladověním navozená indukce *CARu* je zprostředkována primárně skrze hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) a PPAR α . Zatímco hladovějící u tzv. „divokých“ (angl. wild type) myši způsobí zvýšení exprese mRNA *CARu* v porovnání s myši s přístupem k potravě, u hladovějících HNF4 α nebo PPAR α knockoutovaných myši (tj. geneticky manipulovaných myších kmenů bez těchto NR) k takové odpovědi téměř nedocházelo. Byly nalezeny responzivní elementy pro HNF4 α a PPAR α v promotorové oblasti genu pro *CAR* naznačující, že se HNF4 α a PPAR α přímo váží na promotor genu kódující *CAR* a indukují jeho expresi. Je možné že na expresi *CAR*, a tak i jeho cílových genů, má vliv diurnální i cirkadiální rytmus. Dalším mechanismem řídícím expresi *CAR* by mohl být i gene tzv. silencing zprostředkovaný microRNA (Yan a kol. 2014).

3.3.2 Mechanismus aktivace *CAR*

Aktivace *CARu*, na rozdíl od většiny ostatních NR, může probíhat dvěma způsoby, přímo a nepřímo. **Přímá cesta aktivace** vyžaduje navázání ligandu LBD a vzniklý komplex translokuje do jádra. Naproti tomu mechanismus nepřímé aktivace zahrnuje ne příliš prostudovanou kaskádu, kdy neaktivovaný *CAR*, který tvoří v cytoplasmě komplex s cytoplasmatickým *CAR* vázajícím proteinem CCRP a heat shock proteinem HSP90, podstupuje bez vazby ligandu defosforylaci fosfatázou 2A (PP-2A) a následně translokuje do jádra. Zde se *CAR* váže na responzivní sekvenci (*CAR-RE*) v promotorové oblasti regulovaných genů, to způsobí aktivaci RNA polymerázy a spuštění transkripce (Pávek a kol. 2005, Chen a kol. 2012, Wang a kol. 2012). V obou případech dochází k heterodimerizaci s RXR. Aktivace *CAR* je tedy komplexním procesem zahrnujícím vazbu agonisty a koaktivátorů, disociaci korepresorů, translokaci do jádra, heterodimerizaci s RXR a navázání

na promotorovou oblast DNA, teprve pak dojde k indukci genové exprese (Chen a kol. 2012) (viz Obr. 2).



Obr. 2

Schematické zobrazení aktivace CAR. Neaktivní CAR se nachází v cytosolu v multi-proteinovém komplexu složeném z CAR cytoplasmic retention protein (CCRP) a heat shock protein 90 (Hsp90). Po navázání ligandu TCPOBOP se do komplexu váže i fosfatáza PP2A, která katalyzuje defosforylaci Ser202 v molekule CAR, což vede k translokaci CAR do jádra. Fenobarbital, aktivátor, ale nikoli ligand CAR aktivuje PP2A přes zatím neobjasněný mechanismus, a tak zvyšuje translokaci CAR do jádra na ligandu nezávislou cestou. V jádře dochází k heterodimerizaci CAR s RXR α , navázáním CAR-DBD na responzivní element přítomný v promotoru cílového genu a vazbě koaktivátorů.

Zkratky: CAR, konstitutivní androstanový receptor; CCRP, cytoplasmic retention protein; CYP, cytochrom P450; GST, glutathion-S-transferáza; Hsp90 heat shock protein 90; MRP1 multidrug resistance-associated protein; PB, fenobarbital; PPA2, fosfatáza 2A; RE, responzivní element; TCPOBOP, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen; UGT, UDP-glukuronosyltransferáza; RXR, retinoid X receptor.

Převzato z: diMassi a kol. 2009

3.3.3 Ligandy konstitutivního androstanového receptoru

Na rozdíl od jiných nukleárních receptorů, jako FXR α a PXR, se dlouho myslelo, že CAR nemá žádný endogenní ligand. Ve skutečnosti je regulován množstvím endobiotik včetně steroidů (androstany, estrogeny a progestiny) a metabolitů žlučových kyselin. Afinita těchto endogenních ligandů ke CAR receptoru je však velmi nízká. Také klinicky používaná léčiva, pesticidy, flavonoidy obsažené v potravě a polyfenoly vzniklé metabolizací alkoholu (viz Tab.1) jsou modulátory CARu, což z něj dělá klíčového hráče při metabolismu xenobiotik a zvládnutí buněčné toxicity (Molnár a kol. 2013).

Tab. 1 Vybrané ligandy nebo aktivátory CAR

Látky	Efekt na lidský CAR	Reference
Steroidy		
Androstan-3 α -ol a androsten-3 α -ol	IA (h>m)	Dau a kol. 2013
3,17 β -Estradiol a 17 α -ethinylestradiol	IA (h), A (m)	Dau a kol. 2013
5 β -Pregnanedione	A (h), IA (m)	Maglich a kol. 2003
Pesticidy		
Pyrethroidy (permetrin, cypermetrin)	A	Küblbeck a kol. 2011
Karbamáty (benfuracarb)	A	Abass a kol. 2012
Organochloriny (methoxychlor, PCB153, <i>o,p'</i> -DDT)	A	Küblbeck a kol. 2011
Léčiva		
Klotrimazol	IA nebo A	Jyrkkärinne a kol. 2008 Lynch a kol. 2012
Meklizin	IA nebo neaktivní	Huang a kol. 2004
Artemisinin a některé deriváty	A	Burk a kol. 2012
Karbamazepin	A	Faucette a kol. 2007
Nevirapin	A	Faucette a kol. 2007
Fenytoin	Aktivátor nebo A	Küblbeck a kol. 2011
Přírodní polyfenoly		
Flavonoidy nacházející se v jídle (chrysin)	A	Yao a kol. 2011
Flavonoidy vznikající z alkoholu (kys. ellagová)	A	Yao a kol. 2011
Plastizátory		
Triarylfosfáty	A	Jyrkkärinne a kol. 2008
Di(2-ethylhexyl)ftaláty	A pro hCAR2	DeKeyser a kol. 2009
Syntetické látky		
TCPOBOP	A	Tzamelis a kol. 2000
CITCO	A	Maglich a kol. 2003
Flexibilní diarylové sloučeniny (FL81)	A	Küblbeck a kol. 2011
Thiazolidin-4-ony	A	Küblbeck a kol. 2011
Sulfonamidy	A	Küblbeck a kol. 2011
PK11195	IA	Küblbeck a kol. 2011 Lynch a kol. 2012
S07662	IA	Küblbeck a kol. 2011

A, agonista; IA, inverzní agonista; h, lidský CAR; m, myšší CAR; *PK11195*, *ischinolinkarboxamid*; *S07662*, *1-[(2-methylbenzofuran-3-yl)methyl]3-(thiofen-2-ylmethyl)urea*,

Převzato z Molnár a kol. 2013

TCPOBOP, 1,4-bis[2(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene a CITCO 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehydeO-(3,4-dichlorobenzyl)oxime jsou ligandy CAR, který aktivují přímo vazbou na LBD myšního nebo lidského CARu. Aktivita CAR může být také modulována tzv. nepřímými aktivátory (paracetamol, bilirubin, PB, fenytoin a 6,7-dimethylsculetin), kteří stimulují nukleární translokaci CAR a expresi jeho cílových genů bez přímé vazby na LBD (Molnár a kol. 2013).

Na rozdíl od jiných NR, kteří obsahují 5 proteinových domén, se CAR skládá pouze ze 3 domén – DBD, spojovací část a LBD s dimerizační a transaktivační funkcí. To by mohlo z části vysvětlovat některé jedinečné vlastnosti CAR, včetně jeho konstitutivní aktivity. Kapsa LBD je menší a méně flexibilní, než je tomu u PXR a zřejmě z tohoto důvodu je CAR méně promiskuitní (Hernandez a kol. 2009).

I přes několik společných charakteristik mezi lidským a hlodavčím CAR, jako je nukleární translokace po administraci fenobarbitalu (PB) a vazbě na PBREM (phenobarbital response element), mezi nimi existují rozdíly. Například CITCO je silným lidským, ale nikoliv myším agonistou CAR. Phenobarbital-like inducer TCPOBOP je nejsilnějším známým myším ligandem, ale u lidí ani u potkanů k aktivaci nedochází. Stejně tak myší inhibitory jako jsou androstenol a progesteron snižují aktivitu lidského CAR (Chen a kol. 2012). Byly také objeveny různé izoformy lidského CAR (hCAR) na bázi transkripčních variant, některé konstitutivně aktivní, zatímco jiné jsou aktivovány výhradně navázáním ligandu. U hlodavců nebyly tyto varianty CAR objeveny, a proto nemusí data získaná studiem standardních hlodavčích modelů dostatečně přesně reflektovat vlastnosti lidského CAR (Chen a kol. 2012, Cherian a kol. 2015).

3.3.4 Funkce konstitutivního androstanového receptoru v organismu

CAR v regulaci léčiva metabolizujících enzymů a efluxních transportérů

V průběhu evoluce si organismy vyvinuly obranné mechanismy, aby zabránily akumulaci toxických xenobiotik a endogenních metabolitů. Zvláště eliminace lipofilních látek vyžaduje biotransformaci na hydrofilnější sloučeniny pro usnadnění jejich exkrece. Tuto funkci zajišťují DMEs I. a II. fáze a transportní proteiny a exprese většiny z nich je indukovatelná. Mechanismus této indukce byl objasněn až po objevu PXR a CAR, které jsou považovány za hlavní biotransformační regulátory a spolupracují při formování odpovědi organismu na xenobiotika (Qatanani a Moore 2005, Gao a Xie 2010).

Za primární cílový gen CARu je považován CYP2B6. Responzivní elementy toho genu, které váží aktivovaný CAR, jsou také schopny vázat PXR, a tak může být tento enzym regulován oběma receptory. CYP2B6 je důležitým enzymem I. fáze metabolismu, nicméně v porovnání s CYP3A4 a jeho schopnostmi metabolizovat široké spektrum léčiv a xenobiotik je méně významný. I přesto, že CYP3A4 je hlavně regulován PXR, může jeho expresi zvýšit i aktivovaný CAR. Mnoho dalších biotransformačních enzymů, zejména rodina cytochromů CYP jmenovitě CYP3A, CYP2B, CYP2C a CYP2H jsou také regulovány CAR i PXR viz Tab. 2 (Cherian a kol. 2015).

Vliv aktivovaného CAR lze demonstrovat například podáním PB a TCPOBOP $CAR^{-/-}$ myším (CAR „knockoutovaným“ myším), které ale nevedlo k indukci *Cyp2b10* ani mnoha dalších enzymů fáze I a II a lékovým transportérům. Další studie identifikovali cis-element ER8 motiv nacházející se v blízkosti CAR-responzivního elementu v promotoru *CYP1A1*. Tento ER8 motiv je ve vysoké míře zakonzervován napříč živočišnými druhy a zajišťuje vazebné místo pro CAR/RXR α heterodimer, spouštějící transkripci genů *CYP1A1* a *CYP1A2* v lidských hepatocytech (Chen a kol. 2012).

UGT1A1 byl první UDP-glukuronyltransferázou identifikovanou jako cílový gen CARu, který se váže na distální phenobarbital response enhancer module (gtPBREM) v promoterové oblasti *UGT1A1*. Významně se podílí i na regulaci sulfatačních enzymů – PB a TCPOBOP zvyšují expresi *SULT1C1*, *SULT1E1* a *SULT2A1* u normálních (tj. wild-type) myši ale ne u $CAR^{-/-}$ myši. Dále byla pozorována u transgenních myši s konstitutivně aktivovaným CAR zvýšená exprese *SULT1A4* a *SULT2A*, jenž jsou esenciální pro detoxifikaci žlučových kyselin. Brzy poté následovalo zjištění, že i některé další klíčové enzymy II. fáze metabolismu včetně UGTs (*UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A6*, *UGT1A9*, *UGT1A10* a *UGT2B36*) a GST (*GSTA1* a *GSTA2*) jsou také regulovány CAR. Všechny tyto poznatky vedou k potvrzení funkce CAR jako globálního regulátora biotransformačních enzymů II. fáze metabolismu jak v lidském organismu, tak i u mnoha dalších obratlovců (Chen a kol. 2012).

CAR je hlavním regulátorem metabolismu paracetamolu (acetaminofenu), velmi rozšířeného analgetika a antipyretika. Paracetamol je hepatotoxický ve vysokých dávkách a CAR reguluje expresi mnoha DMEs a lékových transportérů, kteří přispívají ke zmírnění paracetamolem indukované hepatotoxicity, včetně basolaterálních lékových transportérů *MRP2*, *MRP3* a *MRP4*, které vylučují metabolity paracetamolu z buněk. Zajímavé je, že $CAR^{-/-}$ myši jsou více odolné vůči hepatotoxicitě navozené paracetamolem než normální

(wild type) myši. Paracetamol sám o sobě není hepatotoxický, ale jeho metabolit z první fáze N-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) již vykazuje toxické působení. K jaternímu poškození však dochází pouze po depleci intracelulárních zásob glutathionu a metabolity z I. fáze nemohou být převedeny na inaktivní metabolity II. fáze právě vazbou na glutathion. U $CAR^{-/-}$ myši, které postrádají xenosenzor CAR, který iniciuje metabolizaci paracetamolu, ke vzniku a kumulaci toxických meziproductů nedochází (Chen a kol. 2012, Hernandez a kol. 2009).

Tab. 2 Regulace léčiva metabolizujících enzymů a lékových transportérů nukleárními receptory PXR a CAR, které jsou spojeny s metabolismem a transportem xenobiotik a analýza jejich koexprese při nádorovém onemocnění prostaty u lidí.

Třída	Gen	Receptor	Koexprese při tumoru prostaty u lidí
Léčiva metabolizující enzymy I. fáze metabolismu	CYP1A1	CAR	Ano ($r=0.18$, $p=0.00084$)
	CYP1A2	CAR	Ano ($r=0.12$, $p=0.028$)
	CYP2A4	CAR	NA
	CYP2A6	PXR	Ano ($r=0.16$, $p=0.0029$)
	CYP2B1/2	CAR/PXR	NA
	CYP2B6	CAR/PXR	Ne pro PXR ani CAR
	CYP2B10	PXR/CAR	NA
	CYP2C8	PXR/CAR	Ano pro CAR ($r=0.14$, $p=0.011$) a PXR ($r=0.13$, $p=0.016$)
	CYP2C9	PXR/CAR	Ano pro PXR ($r=0.12$, $p=0.023$), ale ne pro CAR ($r=0.09$, $p=0.095$)
	CYP2C19	PXR/CAR	Ano pro CAR ($r=0.31$, $p=3.2e-08$) a PXR ($r=0.47$, $p=0$)
	CYP2C29	CAR	NA
	CYP2C37	CAR	NA
	CYP3A2	PXR	NA
	CYP3A4	PXR/CAR	Ano pro PXR ($r=0.24$, $p=8.7e-06$) a CAR ($r=0.18$, $p=0.00084$)
	CYP3A7	PXR	Ano ($r=0.21$, $p=1e-04$)
	CYP3A11	PXR/CAR	NA
	CYP3A23	PXR	NA
	CYP4F12	PXR	Ano ($r=0.34$, $p=7e-11$)
	CYP7A1	PXR	Ano ($r=0.16$, $p=0.0024$)
	AKR1C1/2	PXR	Ne
ALDH1	PXR/CAR	NA	
AKR1B7	PXR/CAR	NA	
Léčiva metabolizující enzymy II. fáze metabolismu	UGT1A1	CAR/PXR	NA
	UGT1A3	PXR	NA
	UGT1A6	PXR/CAR	NA
	UGT1A9	PXR/CAR	NA
	UGT2B1	CAR	NA
	UGT2B5	PXR	NA
	GSTA1	PXR	Ne
	SULT2A1	PXR/CAR	Ano pro PXR ($r=0.13$, $p=0.017$), ale ne pro CAR ($p>0.05$)
	SULT1E1	PXR/CAR	Ne pro PXR ani CAR
	SULT2A2	PXR/CAR	NA
	SULT1A1	PXR	Ne pro PXR ani CAR
SULT1B1	PXR	Ano ($r=0.33$, $p=1.6e-10$)	
Lékové transportéry	MDR1	PXR/CAR	Ano pro PXR ($r=0.14$, $p=0.0082$) ale ne pro CAR ($p>0.05$)
	MRP1	CAR	NA
	MRP2	PXR/CAR	NA
	MRP3	PXR/CAR	NA
	MRP4	CAR	NA
	SLCO1A4	PXR	NA

(r , korelační koeficient, NA není dostupné ze setu zkoušených dat).

Modifikováno dle: Chen a kol. 2012

CAR a homeostáza hormonů štítné žlázy a steroidních hormonů

Látky patřící mezi androstany byly prvními identifikovanými inverzními agonisty CARu. Avšak pro potlačení aktivity CAR je potřeba mikromolárních koncentrací androstanů, což je koncentrace, které za fyziologických podmínek není v krevním oběhu dosaženo. Hlavní prekurzor androgenů a estrogenů, dehydroepiandrosteron (DHEA), je přímým aktivátorem CAR u myši a výsledkem jeho vazby je hromadění CARu v jádře a zvýšená transkripční aktivace jeho cílových genů. Estrogeny se na CAR váží s nízkou afinitou a zvyšují translokaci CAR do jádra obdobně jako jiné CAR aktivátory. Nicméně panuje shoda, že endogenní hladina estrogenu v těle žen může být příliš nízká, aby ovlivnila CAR. Vysoké koncentrace estrogenů, ke kterým dochází během těhotenství, už ale jsou dostatečné pro aktivaci CAR a indukci exprese CYP2B6. Zvýšená koncentrace estradiolu a progesteronu během těhotenství může hrát roli v glukózové toleranci a inzulinové rezistenci zprostředkované CAR receptorem (Cherian a kol. 2015).

Androgeny, estradiol a jejich metabolity podléhají v rámci jejich metabolického rozkladu a exkrece sulfataci zprostředkované SULTs a glukuronidaci skrze UGT enzymy. Mnoho z těchto metabolických enzymů fáze II jsou cílovými geny CAR. Také hladiny hormonů štítné žlázy mohou být ovlivněny xenobiotiky skrz aktivaci CAR, a to díky přímému vlivu CAR na jejich syntézu. Metabolismus a clearance steroidních hormonů je úzce spjata s expresí a aktivací CAR více než s jinými receptory. Tyto souvislosti byly z větší části pozorovány u hlodavčích modelů, je tedy na místě obezřetnost při rekapitulaci těchto poznatků u člověka. Nicméně ovlivnění CAR může být důvodem pro klinicky pozorované změny fyziologických procesů a narušení endokrinních funkcí způsobených xenobiotiky (Cherian a kol. 2015).

CAR a homeostáza žlučových kyselin

Produkce žluči je jednou z nejdůležitějších funkcí jater a narušení této funkce může vést k cholestáze a hepatálnímu poškození. Sekrece žluči je také důležitou cestou pro eliminaci velkých hydrofobních metabolitů endobiotik a xenobiotik včetně mnoha konjugátů s vysokou molekulární hmotností. CAR hraje důležitou roli při detoxifikaci hydrofobní lithocholové kyseliny (LCA), která zahrnuje hydroxylaci skrze CYP3A, sulfataci prostřednictvím SULT2A1, glukuronidaci pomocí UGT1A1 a interakci s MRP2 a MRP3 při exkreci do žluče. Všechny tyto enzymy jsou indukovatelné aktivovaným CAR. Na řízení homeostázy žlučových kyselin se podílí zejména tři další NR – FXR, PXR a VDR, což dokazuje komplexnost a provázanost celého systému cirkulace žlučových kyselin. Potvrzení funkce CAR dokazuje vyšší náchylnost myši bez CAR k hepatotoxicitě navozené LCA než u normálních (wild type)

myši a desítky let trvající terapeutické užívání PB k mírnění pruritu, což je vedlejší efekt zvýšených sérových hladin žlučových kyselin spojovaných s hepatální cholestázou (Qatanani a Moore 2005, Cherian a kol. 2015).

CAR a regulace eliminace bilirubinu

Clearance bilirubinu, jedné z nejtoxičtějších endogenních sloučenin, je důležitým krokem v katabolismu a reabsorpci hemu a její misregulace může vést k chronické kumulaci bilirubinu asociované se žloutenkou. Bilirubin je lipofilní, prochází HEB a jeho kumulace v CNS může vést až k fatální encefalopatii. CAR může regulovat eliminaci bilirubinu indukci UGTs a membránových transportérů, které zvyšují exkreci bilirubinu (Cherian a kol. 2015).

Prvním vodítkem k objevení funkce CARu při exkreci bilirubinu bylo účinné podávání PB při hyperbilirubinémii. Později se ukázalo, že enzymy zodpovědné za vylučování bilirubinu jsou řízeny CAR a sám bilirubin je nepřímým aktivátorem CAR, takže při zvýšených hladinách tohoto barviva dochází k adaptivní odpovědi s cílem ochránit organismus před škodlivými vlivy tohoto metabolitu. Zajímavé je, že hladiny CAR v játrech novorozenců jsou relativně nízké, což může hrát roli při rozvoji novorozenecké žloutenky (Qatanani a Moore 2005).

CAR a metabolismus lipidů a glukózy

Až v několika posledních letech se objevily studie zkoumající, jak aktivace CAR ovlivňuje metabolismus glukózy a lipidů. Aktivace CARu syntetickým agonistou TCPOBOP zvyšuje inzulínovou senzitivitu a zmírňuje steatózu jater u obézních myši, kterým byla podávána strava s vysokým obsahem tuků (high fat diet, HFD) i u těch s obezitou způsobenou deficiencí leptinu. Několik studií ukázalo, že farmakologická aktivace CARu vede ke snížení hladiny triglyceridů v játrech, zatímco ztráta CARu zde způsobuje jejich akumulaci. LXR-SREBP cesta hraje centrální úlohu v jaterní lipogenezi transdukci genů podílejících se na biosyntéze mastných kyselin a uptake lipidů. Interakce mezi CAR a LXR způsobuje vzájemnou represi zprostředkovanou kompeticí o vazbu koaktivátorů. Výsledkem je potlačení exprese LXR cílových genů, zahrnující lipogenní geny jako *Srebp1*, *Accl*, *Fas* a *Scd1* (viz Obr. 3) (Yan a kol. 2014).

CAR může také ovlivnit biosyntézu lipidů přes své cílové geny. Insulin-induced gene-1 (Insig-1) je na endoplazmatické retikulum vázaný cholesterolový senzor, který při nadbytku sterolů potlačuje aktivaci sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs). CAR se váže na responzivní element v promotorové oblasti Insig-1 a přímo indukuje jeho expresi a tím zabraňuje SREBP1 vstupu do jádra a indukci lipogenních genů. Sulfotransferáza 2B1b

(Sult2B1b) je dalším z CAR cílových genů a inhibuje expresi genu *Srebp1* a hepatální lipogenezi enzymatickou deaktivací LXR ligandů. Sult2B1b patří do podrodiny cytosolických sulfotransferáz, způsobujících sulfonaci oxysterolů, např. 22-hydroxycholesterol, 24S-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol a 24,25-epoxycholesterol. Tyto endogenní oxysteroly jsou potentními ligandy LXR. Díky sulfonaci se snižuje jejich schopnost aktivovat LXR a tím dochází i k potlačení LXR-SREBP cesty. K TCPOBOP-indukované redukci lipogenních genů nedochází u Sult2B1b knockoutovaných myší, což potvrzuje úlohu tohoto enzymu. Specifická experimentální stimulace exprese (tzv. overexprese) enzymu Sult2B1b v játrech způsobená buď přenosem adenoviry nebo transgenně zmírňuje dyslipidémii u myších modelů s diabetem. Deaktivujícím LXR ligandům, tedy produktům sulfonace jako 25-hydroxycholesterol-3-sulfát, je navíc připisován i pokles v lipidové akumulaci a zánětu. Sulfáty cholesterolu, které vznikají působením Sult2B1b, jsou považovány za potentní agonisty RAR-related orphan receptor α , ROR α nukleárního receptoru viz. Obr 3. Inhibiční působení ROR α na LXR by mohl být dalším důvodem potlačení exprese (tzv. down-regulace) lipidové akumulace při zvýšené expresi Sult2B1b (Yan a kol. 2014).

CAR reguluje nejen lipidový metabolismus, ale má i dopad na jaterní metabolismus glukózy. Po podání TCPOBOP vykazovaly diabetické myši lepší glukózovou toleranci. Zlepšení glukózové tolerance se děje primárně díky potlačení hepatální glukoneogeneze, než kvůli zvýšené utilizaci glukózy v tukové tkáni nebo v kosterním svalstvu, jak ukazuje studie na hyperinsulinemických-euglykemických *ob/ob* (leptin deficientních) myších. Dva důležité enzymy glukoneogeneze, fosfoenolpyruvátkarboxykináza (PEPCK) a Glukóza -6-fosfatáza (G6Páza), jsou down-regulovány (jejich exprese je potlačena) aktivací CAR. Pro vysvětlení inhibičního působení CAR na glukoneogenezi bylo navrženo několik modelů. V prvním modelu CAR kompetuje s faktorem forkhead box protein O1 (FoxO1) o vazbu na inzulinové responzivní sekvenci (IRS) a s HNF α na promotorech genů *Pepck* a *G6Pázy*. V druhém CAR kompetitivně váže koaktivátory HNF4 α , a tak snižuje expresi jeho cílových glukoneogenních genů (viz Obr. 3). Transaktivace těchto genů zprostředkovaná HNF4 α závisí zejména na jeho translokaci do jádra, ke které dochází po acetylaci HNF4 α . Sulfáty cholesterolu a Sult2B1b dle nedávných studií inhibují glukoneogenezi právě deacetylací HNF4 α , takže stimulace exprese Sult2B1b CAREm může také hrát roli i při potlačení glukoneogeneze (Yan a kol. 2014).

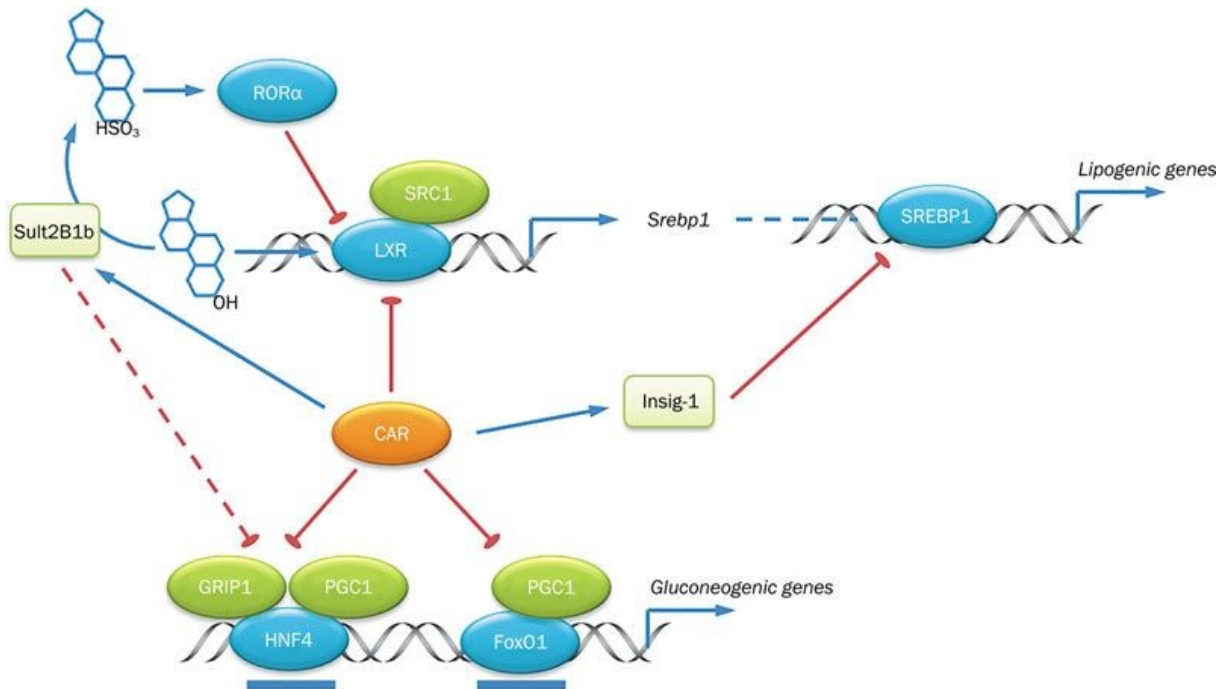
Insulinová rezistence je spojována se zvýšenými plazmatickými hladinami lipoproteinů, produkcí very low density lipoprotein (VLDL) a plazmatickým low density lipoprotein (LDL). Následné aterosklerotické změny jsou závažnou příčinou kardiovaskulárních komplikací, které

postihují pacienty s diabetem 2. typu. Ukázalo se, že aktivace CAR snižuje sekreci VLDL a plazmatickou koncentraci cholesterolu u apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenních myši částečně skrz supresi exprese apoA-I a Low density lipoprotein receptor u tzv. Ldlr „knockoutovaných“ (*Ldlr*^{-/-}) myši. Nadbytečný jaterní cholesterol může být eliminován ve formě solí žlučových kyselin. Konverzi cholesterolu na soli žlučových kyselin, hydrataci žlučových kyselin, jejich konjugaci a export řídí geny, které jsou v játrech indukovány v odpovědi na podání TCPOBOP. Ve střevě je exkrece žlučových kyselin zprostředkována inhibicí reabsorpčního mechanismu enterohepatálního oběhu žlučových kyselin, pravděpodobně inhibicí LXR. HNF4 α navíc ovlivňuje i sekreci VLDL-C a homeostázi lipidů. Inhibiční efekt CARu na HNF4 α by mohl vysvětlovat jeho příznivý vliv na metabolismus cholesterolu. Celkově aktivace CAR zmírňuje rozvoj aterosklerotických lézí a má terapeutický potenciál v prevenci kardiovaskulárních komplikací diabetu (Yan a kol. 2014).

Přestože aktivace CARu snižuje plazmatické koncentrace cholesterolu, dochází u genů zapojených do *de novo* biosyntézy cholesterolu vlivem aktivace CARu ke stimulaci. Pokud vezmeme v úvahu, že jaterní cholesterol je náchylnější k tvorbě žlučových solí, tak stimulace jeho biosyntézy by mohla být kompenzačním mechanismem pro udržení jaterní homeostázy cholesterolu. Zajímavé je, že se při *de novo* syntéze cholesterolu i triglyceridů uplatňují stejné transkripční faktory, jako je SREBP, ale pouze syntéza cholesterolu se zdá být selektivně zvýšena. Vysvětlením může být skutečnost, že lipogenní geny jsou také přímo regulovány dalšími nukleárním transkripčními faktory jako LXR a carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP), ovšem je třeba ještě prozkoumat, jestli interakce (tzv. crosstalk) mezi CAR a těmito transkripčními faktory je příčinou inhibičního působení na akumulaci triglyceridů. Preferenční biosyntéza cholesterolu může být také výsledkem selektivní aktivace SREBP2. Avšak je třeba ještě stanovit, zda CAR a SREBP2 při aktivaci cholesterolové biosyntézy spolupracují (Yan a kol. 2014).

Díky vzájemnému působení CAR a transkripčních faktorů ovlivňujících regulaci glukoneogeneze a lipogeneze, aktivace CAR zmírňuje hyperglykémii a dyslipidémii spojenou s metabolickými poruchami a zvyšuje systémovou inzulinovou sensitivitu. Mechanismus, jakým CAR těchto výsledků dosahuje může být: (1) kompetitivní vazba na *cis*-acting elementy nacházejících se v promotorových oblastech cílových genů; (2) „quenching“ koaktivátorů neboli soutěžení o ně (pozn. CAR kompetitivně váže koaktivátory jiného transkripčního faktoru); (3) indukce supresorových genů, vedoucí k přímé inhibici daných transkripčních faktorů, deaktivaci prodiabeticky působících agonistů nebo produkci anti-diabetických

substancí a ke změnám v metabolickém profilu. Dalším přínosem je přenositelnost těchto ovlivnění metabolismu na potomky díky permanentním epigenetickým změnám. CAR je tedy potenciální terapeutický cíl pro prevenci a léčbu metabolických onemocnění. Nicméně potenciál stimulovat karcinogenezi jater (pozorovanou u hlodavců, nikoli však u lidí) a možnost lékových interakcí by mohlo představovat překážku pro klinické využití. Hlubší pochopení mechanismu působení CAR a interakce s dalšími transkripčními faktory by mohlo pomoci tyto překážky překonat (Yan a kol. 2014).



Obr. 3

Inhibiční efekt CARu na glukózový a lipidový metabolismus.

CAR reguluje glukoneogenní a lipogenní geny kompetitivní vazbou na *cis*-acting elementy, quenching koaktivátorů a/nebo indukci supresorových genů (Sult2B1b a Insig-1).

Zkratky: CAR, konstitutivní androstanový receptor; FoxO1, forkhead box protein O1; GRIP1, glukokortikoid receptor-interacting protein 1 (také steroid receptor coactivator-2, SRC-2 nebo nuclear receptor coactivator 2, NCoA-2); HNF4, hepatocyte nuclear factor 4; Insig-1, insulin-induced gene-1; LXR, liver X receptor; PGC1, PPAR γ coactivator 1; ROR α , RAR-related orphan receptors; SREBP1, sterol regulatory element-binding protein 1; SRC1, steroid receptor coactivator 1; Sult2B1b, sulfotransferáza 2B1b.

Převzato z Yan a kol. 2014

3.3.5 Vliv CAR na nežádoucí účinky léčiv a lékové interakce

Zatímco aktivace CAR a PXR je všeobecně vnímána jako protektivní, může díky indukci detoxifikačních enzymů xenobiotiky dojít i k nepříznivému ovlivnění organismu a nežádoucí účinky léčiv (NÚ) jsou jedním z možných důsledků. Odhaduje se, že mezi 635 000 – 770 000 pacientů v USA každý rok má závažné NÚ a přibližně 106 000 na následky zemře. To řadí NÚ na 4. a 6. místo v řebříčku nejčastějších příčin úmrtí v USA (Hernandez a kol. 2009).

Současné studie odhadují, že polymorfismus cytochromu P450 je příčinou 10-20 % NÚ, nicméně skoro 50 % NÚ může být důsledkem jiných fyziologických a environmentálních faktorů. Zahrnuta je i indukce P450, protože přibližně 50-60 % léčiv, nutraceutik a léčiv rostlinného původu je metabolizováno CYP3A4 a 25-30 % je metabolizováno CYP2B6. Primárním mechanismem indukce těchto genů je aktivace CAR a PXR. Z toho vyplývá, že pokud identifikujeme látky (doplňky stravy, environmentální polutanty, látky vyskytující se na pracovišti, klinicky užívaná léčiva), které aktivují tyto promiskuitní nukleární receptory, budeme schopni předvídat NÚ způsobené indukcí cytochromu P450. Dle Wang a kolektivem (2012), PXR a CAR indukují expresi CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9 a CYP2C19, které jsou zodpovědné za metabolismus více než 80 % léčiv na předpis, z čehož vyplývá, že aktivace těchto NR může vést k lékovým interakcím (drug-drug interactions, DDI), způsobit nežádoucí účinky léčiv a přispět k zvýšení mortality a morbidit (Hernandez a kol. 2009).

Lékové interakce zprostředkované PXR a CAR se mohou projevit zvýšením toxicity a snížením terapeutické účinnosti léčiva. Např. duální aktivátor PXR i CAR, antiepileptikum fenobarbital může u myšího modelu způsobit paracetamolem vyvolanou hepatotoxicitu. Další studie ukázala, že preadministrace myšího PXR aktivátoru pregnenonkarbonitrilu (PCN) myším, u nich významně zvýšila paracetamolem indukovanou hepatotoxicitu. PXR a CAR zprostředkovaná hepatotoxicita byla spojena s indukcí CYP3A a tak i se zvýšenou konverzí paracetamolu na jeho toxický metabolit NAPQI. Aktivace PXR a CAR může také vést ke snížení terapeutického účinku léčiva. Velmi dobře popsanými aktivátory lidského CAR jsou i fenytoin a karbamazepin, dvě běžně užívaná antiepileptika. Současná aplikace obou antikonvulziv s jinými léčivy, která jsou metabolizována CAR indukovanými CYP enzymy, může zvýšit jejich eliminaci, a tak snížit účinnost (Wang a kol. 2012).

Dalším příkladem vlivu aktivace CARu a následné indukce CYP3A4 je zvýšený metabolismus vitamínu D. Mohlo by se jednat o vysvětlení spojení mezi antiepileptiky jako

je PB a fenytoin a úbytkem kostní denzity. Další teorie, jak PB snižuje hladinu kalcia a způsobuje osteomalacii, označuje jako příčinu inhibici CYP2D25 a CYP27A1, tedy enzymů, které jsou primárně zodpovědné za 25-hydroxylaci vitamínu D na vitamín D₃. Aktivace PXR způsobená karbamazepinem nebo rifampicinem je také spojována s poklesem kostní minerálové denzity vlivem indukce CYP3A4 a přeměně vitamínu D₃ na neaktivní metabolity. Dlouhodobá aktivace CAR a PXR receptorů tedy může mít nepříznivý vliv na homeostázu vitamínu D a kostní minerálovou denzitu. I koncentrace thyroïdních hormonů jsou sníženy dlouhodobou léčbou aktivátory CARu u normálních (wild type), ale nikoli u CAR-null myši. Hydroxylace methoxychloru, polychlorovaných bifenyly a možná i polybromovaných difenyletherů pomocí cytochromů P450 je nezbytná k tvorbě jejich metabolitů, jež jsou endokrinními disruptory. Indukce P450 způsobená aktivací CAR a PXR tedy může zvýšit toxicitu těchto polutantů životního prostředí (Hernandez a kol. 2009).

Expozice environmentálním kontaminantům a látkám vyskytující se v potravě (viz Tab. 3) může způsobit indukci DMEs fáze I-III a vést ke změnám v toxicitě a clearance endogenních odpadních látek, farmaceutik, pesticidů a dalších xenobiotik díky aktivaci PXR a CAR, což může vést k idiosynkratickým reakcím nebo snížené terapeutické účinnosti léčiv (Hernandez a kol. 2009).

Tabulka 3 Environmentální kontaminanty, průmyslové kontaminanty a přírodní látky, které aktivují nebo inaktivují PXR nebo CAR.

Chemikálie/Rostliny	PXR	CAR	Zdroj
Alachlor	r, h(+)	m(+)	Pesticid
Amitrol	h(+)		Pesticid
Androstanol	h(+)	m, h(-)	Metabolit testosteronu
Androstenol		m(-)	Metabolit testosteronu
Arsenit		m(+)	Chemikálie
Artemisinin	h(+)	h(+)	Přírodní léčiva
Artemisia capillaris		h(+)	Přírodní léčiva
Atractylodes lancea, A. macrocephala	h(+)		Přírodní léčiva
Azobarviva (ortho-aminoazotoluen; methyl-4-dimethylaminobenzen)		m(+)	Nátěrová barva
Benzofenon	r(+)		Obaly
Benzylbutylftalát	h(+)		Plastifikátor
Betakaroten	h(+)		Potrava
Bisfenol-A	h(+)	m(+)	Kontumní produkty
Butylát		m(+)	Pesticid
Cafestrol obsažen v kávě	m(+)		Káva
Chlordan	h, m(+)		Pesticid
Chlordecon	h(+)		Pesticid
Chlorprofam		m(+)	Pesticid
Chlorpyrifos	h(+)	m(+)	Pesticid
Commiphora mukul	h, m(+)	m(+)	Přírodní léčiva
Kortikosteron	h,m,r(+)	m(+)	Steroidní hormon
Kumestrol	h(-), h(+)		Fytoestrogen
Cypermethrin	h(+)	m(+)	Pesticid
Cyprokonazol		m(+)	Pesticid
Daidzein	h(+)		Fytoestrogen
Danshen (tanshinon I, tanshinon IIA, kryptotanshinon)	h(+)	h(+)	Přírodní léčiva
DBP(Di-n-butylftalát)	r(+)	r(+)	Plastifikátor, rozpouštědlo
DDE(Dichlorodiphenyldichloroethylen)	h, r(+)	r(+)	Vedlejší produkt pesticidu
o,p - DDT(1,1,1-Trichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)ethan)	h, m(+)	m,r(+)	Pesticid
DEHP (kys. ftalová)	h, m(+)	m, h(+)	Plastifikátor
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	h(+)	m(+)	Prekurzor hormonu
DHT(5 α -dihydrotestosteron)	h,m,r(+)		Metabolit testosteronu
Dexamethason	m, h(+)		Léčivá látka
Dicyklohexylftalát	h(+)		Plastifikátor
Dieldrin	h(+)	m(+)	Pesticid
Di-n-hexylftalát	h(+)		Plastifikátor
Dihydroandrosteron		m(-)	Metabolit testosteronu
n-Dipentylftalát	h(+)		Plastifikátor
n-Dipropylftalát	h(+)		Plastifikátor
Dokosahexanová kys. (esenciální mastná kys. - inhibuje aktivitu CAR)		r(-)	Esenciální mastná kys.
Endosulfan	h(+)	m(+)	Pesticid
Endrin	h(+)		Pesticid
Ergovalin (ergotaminový alkaloid)	r(+)		Látka produkovaná houbou
17 β -Estradiol	h(+)	h, m, r(+)	Ženský hormon
Estron		h, m,r(+)	Ženský hormon
17 α -Ethinylestradiol	h(+)		Perorální kontraceptiva
Fenitrothion		m(+)	Pesticid
Fenvalerat	h(+)		Pesticid
Olejový extrakt česneku		r(+)	Rostlina
Genistein	h(+)		Isoflavony

Extrakt Gingko biloba	r, h(+)	r,h (+)	Přírodní léčiva
Glycyrrhiza uralensis Fisch	h(+)		Přírodní léčiva
Extrakt Hypericum perforatum	h(+)		Přírodní léčiva
Imazalil		m(+)	Pesticid
Isopimpinellin (kumariny)	m(+)	m(+)	Potrava
Kava Kava (Piper methysticum)	r, h(+)		Přírodní léčiva
Kepon		m(+)	Pesticid
Ketoconazol	h(-)		Antimykotikum
Lindan	h, r(+)		Pesticid
Linolová kyselina		m(+)	Nenasycená mastná kys.
MEHP	h, m(+)	m(+)	Plastifikátor
Metolachlor		m(+)	Pesticid
Methoxychlor	r, h(+)	r, m(+)	Pesticid
mono-OH-methoxychlor		r(+)	Metabolit pesticidu
bis-OH-methoxychlor		r(+)	Metabolit pesticidu
Monosodium methan arsenát		m(+)	Průmyslový vedlejší produkt pesticidu
4-nitrotoluen	h(+)		Průmyslový vedlejší produkt
trans-nonachlor	h, m(+)	m(-)	Pesticid
Nonylphenol	h, r, m(+)	h(+)	Plastifikátor
Norbolethon		m(+)	Anabolický steroid
Octachlorostyren	h(+)		Vedlejší rafinační produkt
Octylphenol	h(+)		Plastifikátor
Parathion		m(+)	Pesticid
PBDEs (polybromované difenyletery)	h(+)		Látka zpomalující hoření
PCBs (vysoce chlorované) (Polychlorované bifenyly)	h,m,r(+)	m(+)	Průmyslové využití
Pentachlorophenol		m(+)	Pesticid
Perfluorocarboxylová kys.		m(+)	Surfaktant
Perfluorooctanová kys. (PFOA)		m(+)	Surfaktant
Poria cocos	h(+)		Houba
PCN (pregnenolon 16 α -carbonitril)	m(+)		Steroid
Pregnenolon	h, m, r(+)		Steroidní hormon
Progesteron	h, m, r(+)	m(+)	Steroidní hormon
Propachlor		m(+)	Pesticid
Rhizoma curcumae	h(+)		Přírodní léčiva
Rifampicin	h, m(+)		Antibiotikum
Extrakt z Schisandra chinensis Baill	h(+)		Přírodní léčiva
Spirolacton	h, m(+)		K ⁺ šetřící diuretikum
SSS-Tributylphosphorotrithioat		m(+)	Pesticid
Stigmasterol	m(-)		Fytosterol
Tanzanian Herbal Plant Extracts	h(+)		Přírodní léčiva
TCPOBOP(1,4-bis[2-(3,5-dichlorpyridyloxy)] benzene)		mš(+)	Xenobiotikum
Tetrahydrogestrinon		m(-)	Anabolický steroid
Tian Xian	h(+)		Přírodní léčiva
Toxaphen	h(+)		Pesticid
Triclosan	h(+)	m(+)	Antifungální látka
Triclopyr		m(+)	Pesticid
Vinclozolin	r(+)		Pesticid
OH-Vitamin D ₃	h(+)		Metabolit Vitaminu D
Vitamin E (alfa tokoferol)	h(+)		Vitamin
Vitamin K ₂	h(+)		Vitamin
Zearalenon	h (+)		Mykoestrogen

(h=*Homo sapiens*; m=*Mus*; r=*Rattus norvegicus*), (+) aktivace; (-) inhibice

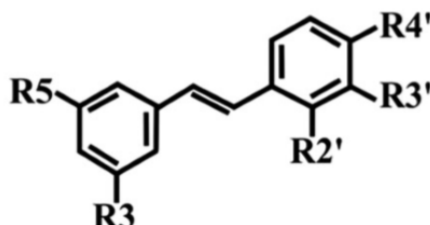
Modifikováno dle Hernandez a kol. 2009

Je vyvíjeno velké úsilí zacílit PXR a CAR zprostředkované DDI nejen při terapii, ale již při vývoji léčiv. Jeden z přístupů se snaží odhalit látky, které aktivují PXR a CAR během brzkého vývoje a chemicky modifikovat jejich strukturu, tak aby se snížila jejich schopnost aktivovat PXR a CAR bez snížení zamýšleného účinku. Jiný přístup vyhledává antagonisty PXR nebo CAR a využívá je jako ko-terapeutika s cílem minimalizovat léky navozenou aktivaci PXR nebo CAR. Studie ukazují, že účinnost léčiv může být podpořena antagonizací léky navozené aktivace PXR. Takovými antagonisty jsou např. etceinascidin-743, ketokonazol, FLB-12, sulforafan, A-792611 a kumestrol. Několik antagonistů nebo inverzní agonistů bylo objeveno i pro lidský nebo hlodavčí CAR, např. meklizin, clotrimazol a PK11195. Nicméně nedávné studie naznačují, že meklizin, antiemetikum a antihistaminikum, je agonista lidského PXR nikoliv antagonistu či inverzní agonista lidského CAR (hCAR) v lidských hepatocytech (Wang a kol. 2012). Další látkou, která by mohla být inverzním agonistou CAR je kumestrol, fytoestrogen vyskytující se v luštěninách a sojových bobech. Alkaloid nigramid J, obsahová látka kořene *Piper nigrum* je také inverzním agonistou hCAR, nižší efekt vykazuje u potkaního CAR (rCAR) a u myšího CAR (mCAR) nebyla pozorována žádná inhibice. Předpokládá se, že nigramid J se váže s LBD vzhledem k tomu, že jím navozenou inhibici lze zvrátit pomocí agonisty CAR CITCO, který aktivuje receptor přímo (Cherain a kol. 2015). Objev látky s duálním antagonistickým efektem u obou receptorů nebyl zatím ohlášen (Wang a kol. 2012).

3.4 STILBENOIDY

Stilbenoidy jsou malou skupinou rostlinných polyfenolů charakterizovanou přítomností 1,2-difenylethylenového jádra. Bylo identifikováno více než 400 přírodních stilbenoidů, nicméně lze je nalézt pouze v omezeném množství rostlinných rodin, jelikož se klíčový enzym pro biosyntézu, stilben syntháza, vyskytuje pouze omezeně. Mezi nejznámější látky této skupiny patří resveratrol a jeho deriváty jako pterostilben, oxyresveratrol nebo viniferiny. Tyto sloučeniny vzbuzují velký zájem již od začátku jejich zkoumání pro své antioxidační, imunomodulační, protizánětlivé a antiangiogenní účinky a pozitivní vliv na lidské zdraví díky jejich chemoprotektivnímu a kardioprotektivnímu působení. Ukázalo se, že stilbenoidy disponují schopností interferovat se všemi stupni kancerogeneze, tedy iniciační, promoční i progresivní fází (Berman a kol. 2017). Množství dalších stilbenoidů (viz Obr. 4) jako je piceatannol, pinosylvin, kombrestatiny, polydatiny (piceidy), mulberrosid nebo zástupci oligostilbenů jsou také známy pro svou biologickou aktivitu. Stilbenoidy se podílí na konstitutivní a indukované ochranné funkci v rostlinách proti houbovým patogenům, hlísticím a býložravcům (Dubrovina a Kiseley 2017, Sirerol a kol. 2015).

Stilbene	R3	R5	R2'	R3'	R4'
<i>t</i> -resveratrol	OH	OH	H	H	OH
<i>t</i> -pterostilbene	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH
<i>t</i> -oxyresveratrol	OH	OH	OH	H	OH
<i>t</i> -piceatannol	OH	OH	H	OH	OH
<i>t</i> -pinosylvin	OH	OH	H	H	H
<i>t</i> -pinosylvin monomethyl ether	OCH ₃	OH	H	H	OH
<i>t</i> -isorhapontigenin	OH	OH	H	OCH ₃	OH
<i>t</i> -isorhapontin	OGlu	OH	H	OCH ₃	OH
<i>t</i> -astringin	OGlu	OH	H	OH	OH
<i>t</i> -polydatin (<i>t</i> -piceid)	OH	OGlu	H	H	OH
mulberrosid A	OGlu	OH	OH	H	OGlu



Obr. 4

Chemická struktura běžně se vyskytujících přírodních stilbenoidů.

(OGlu, *O*-β-*D*-glukopyranosid). Převzato z Dubrovina a Kiseley 2017

3.4.1 Výskyt, obsah a distribuce stilbenoidů v rostlinné říši

Stilbenoidy je schopna produkovat pouze omezená heterogenní skupina rostlinných druhů z asi 50 rostlinných rodin včetně dvouděložných, jednoděložných, jehličnanů, jatrovek a kapradňorostů. Výskyt *trans*-resveratrolu, resveratrolaldehydu a některých dalších stilbenoidů byl také pozorován v endofytických houbách rostlin (*Alternaria sp.* z *Vitis vinifera* nebo z mangrovu *Myoporum bontioides*), bakteriích parazitujících na hmyzu (*Photorhabdus luminescens*, *Bacillus sp.*), některých jedlých houbách, mořských houbách (*Kirkpatrickia variolosa*) a larvách nočních motýlů (sušená larva bource morušového, *Bombyx mori*) (Dubrovina a Kiseley 2017).

Největšího zájmu se dostává stilbenoidům rostlin z čeledi *Vitaceae* (réva vinná), *Pinaceae* (borovice, smrk), *Poaceae* (čirok, cukrová třtina, ječmen a kostřava), *Ericaceae* (borůvka), *Fabaceae* (podzemnice olejná a trnovník akát), *Moraceae* (moruše) a *Polygonaceae* (křídlatka japonská a reveň). Přítomnost stilbenoidů byla hlášena i u dalších rostlin jako je liánovec (*Gnetaceae*), myrta (*Myrtaceae*) a rajče (*Solanaceae*). Stilbenoidy se v rostlinách kumulují v různých orgánech a tkáních včetně listů, kořenů, plodů, semen, stonků, dřeva, kůry nebo jehlicí. V rostlinách jako borovice, smrk, křídlatka, liánovec, moruše a myrta jsou stilbenoidy přítomny ve velkém množství, i když nejsou vystaveny stresu, což naznačuje, že by mohly být součástí konstitutivních obranných reakcí v těchto rostlinných druzích a podílí na rezistenci k rostlinným mikrobiálním patogenům a škůdcům. Další studie uvádí přítomnost resveratrolu a piceidu (gylkosid resveratrolu) v běžně dostupném a konzumovaném ovoci a zelenině, jako jsou jahody, maliny, třešně, pepř, rajče, okurka, mrkev, lilek, hlávkový salát, švestka, jablko, hruška, broskev nebo hroznové víno, přičemž největší obsah stilbenoidů se nachází ve víně. Ve většině výše vyjmenovaných potravinách se ve vyšší koncentraci nachází *trans*-piceid než *trans*-resveratrol. Vypadá to tedy, že nejen víno a arašídý ale také mnoho dalších zástupců ovoce a zeleniny může být zdrojem bioaktivních stilbenoidů (Dubrovina a Kiseley 2017).

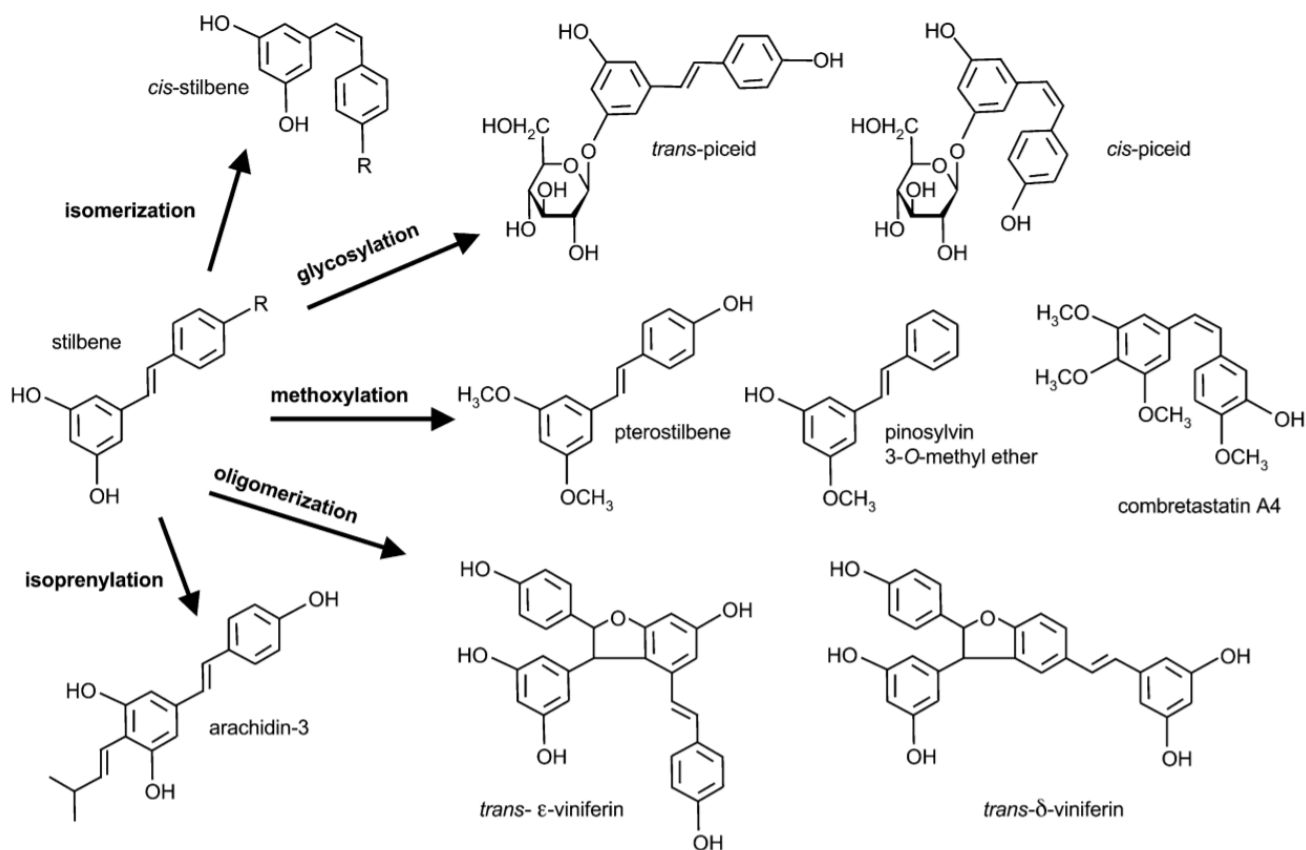
Rostliny se mezi sebou liší spektrem produkovaných stilbenoidů, pinosylvin a jeho deriváty jsou nejčastěji k nalezení v borovicích, resveratrol, piceatannol a jejich deriváty byly objeveny v bylinách, keřích, liánách a stromech z čeledí *Polygonaceae*, *Fabaceae*, *Ericaceae*, *Vitaceae*, *Pinaceae*, *Gnetaceae* a dalších. *Trans*-resveratrol, méně pak *trans*-piceatannol a *trans*-pterostilben jsou nejvíce uznávanými stilbenoidy co se týče biologické aktivity a pozitivního vlivu na lidské zdraví. Mezi prozkoumanými rostlinnými druhy produkuje největší množství *trans*-resveratrolu křídlatka japonská (kořeny) zatímco liánovec (kořeny),

myrta (plody nazývané sim) a reveň (kořeny) produkují nejvyšší množství *trans*-piceatannolu (Dubrovina a Kiseley 2017). Velká pozornost je věnována distribuci stilbenoidů ve vinné révě a hroznových bobulích. Množství studií ukazuje, že rozložení a hladina stilbenoidů silně závisí na vývojovém stádiu bobule. K růstu koncentrace resveratrolu dochází během jejich zabarvování a nejvyšší koncentraci ve formě piceidů najdeme ve zralé bobuli, konkrétně ve slupce (Dubrovina a Kiseley 2017).

3.4.2 Biosyntéza stilbenoidů

Rostlinné stilbenoidy jsou odvozeny z fenylypropanoidové cesty, stejně jako flavonoidy, isoflavonoidy a lignany. Všechny vyšší rostliny jsou schopny syntetizovat malonyl-CoA a CoA-estery derivátů kyseliny skořicové potřebné k syntéze, ale jen několik rostlinných druhů je schopno produkovat stilbenoidy, a to právě díky enzymu stilben syntáza, který má hlavní úlohu při biosyntéze těchto sekundárních metabolitů. Stilben syntáza (STS) katalyzuje biosyntézu základního skeletu stilbenoidů v jediné reakci ze tří molekul malonyl-CoA a jedné molekuly CoA-esteru derivátu kyseliny skořicové, nejčastěji cinnamoyl-CoA nebo *p*-kumaroyl-CoA. Stilbenoidy mohou podstoupit různé typy modifikací, jako glykosylace, methoxylace, oligomerizace, izomerizace nebo isoprenylace viz Obr.5 (Chong a kol. 2009).

Glykosylace je běžnou modifikací sekundárních metabolitů rostlin a přidání karbohydrátového seskupení může ovlivnit hydrofilitu, stabilitu a biologickou aktivitu přírodních látek. I velké množství stilbenoidů se vyskytuje ve formě glykosidů například resveratrol ve formě 3-*O*- β -glukosidu neboli *cis*- a *trans*-piceidu, který se vyskytuje v bobulích révy vinné. Methoxylace je další častou úpravou, se kterou se můžeme setkat například u pterostilbenu a kombretastatinu A4. Velké množství přírodních stilbenoidů jsou oligomery – dimery, trimery a tetramery vznikající oxidativním couplingem resveratrolu nebo jeho derivátů. Příkladem jsou viniferiny, oligomery resveratrolu přítomné v např. v listech révy vinné (Chong a kol. 2009, Shen a kol. 2009).



Obr. 5

Nejčastější modifikace rostlinných stilbenoidů.

Převzato z Chong a kol. 2009

3.4.3 Farmakokinetika stilbenoidů

Stejně jako většina polyfenolických sloučenin mají i stilbenoidy nízkou biodostupnost. Záleží na způsobu podání ale také na absorpci a metabolismu jednotlivých sloučenin. Tyto faktory jsou z větší části určeny jejich chemickou strukturou – stupněm glykosylace/acylace, jejich základním skeletem, konjugací s jinými fenolickými sloučeninami, molekulární hmotností, stupněm polymerizace, rozpustností a dalšími vlastnostmi, a jsou příčinou velkých rozdílů v biodostupnosti i mezi strukturně podobnými fenolickými látkami (Sirerol a kol. 2015).

Biodostupnost resveratrolu je velmi omezena i přes jeho dobrou absorpci zejména rychlým a rozsáhlým first-pass efektem. Mezi hlavní metabolity resveratrolu patří glukuronidy a sulfáty na 3 a 4' fenolických skupinách a hydrogenací dvojně vazby vzniká dihydroresveratrol, nejvíce zastoupen je pak resveratrol-3-sulfát. Exkrece probíhá močí a stolicí, nicméně

konjugované metabolity mohou být znovu reabsorbovány v rámci enterohepatálního oběhu (Sirerol a kol. 2015, Pannu a Bhatnagar 2019).

Účinnost metabolitů stále není potvrzena, ale nedávná data naznačují, že i konjugáty resveratrolu mají protinádorovou aktivitu, jejich cytotoxická aktivita však potvrzena nebyla. Existuje teorie, která byla popsána i u jiných látek, tedy že v organismu může docházet i k dekonjugaci metabolitů na parentní účinné látky. Bylo by tedy možné, že metabolity tvoří tzv. pool, z kterého se může aktivní metabolit uvolnit. Je však nepravděpodobné, že by se uvolňoval v dostatečných koncentracích v *in vivo* podmínkách (Baur a Sinclair 2006, Sirerol a kol. 2015).

Pterostilben je přirozeně se vyskytující dimethoxy analog resveratrolu s lepším farmakokinetickým profilem. V molekule má pouze jednu hydroxylovou skupinu namísto tří jak je tomu u resveratrolu a tedy podstupuje glukuronidaci v menší míře. Díky těmto strukturním odlišnostem je mu přisuzován 6-7x delší plazmatický poločas než resveratrolu. Dimethoxy- skupina zvyšuje lipofilitu, což usnadňuje permeaci membránami a zlepšuje biodostupnost a absorpci pterostilbenu, která je také lepší než u resveratrolu. Hlavními metabolity jsou opět glukuronidy a sulfáty, nejsou však důkazy o přítomnosti hydrogenované formy. V současné době nejsou žádné studie zabývající se biologickou aktivitou pterostilbenových metabolitů (Sirerol a kol. 2015).

Hlavní eliminační cestou pro piceatannol a pinosylvin je glukuronidace a sulfatace a na rozdíl od výše zmiňovaných i methylace. Jejich metabolity jsou vylučovány převážně extraurinálně. Jedním z metabolitů piceatannolu je i další látka ze skupiny stilbenoidů a to isorhapontigenin, což naznačuje možné další účinky piceatannolu *in vivo*. V porovnání s resveratrolem má piceatannol vyšší biologickou stabilitu a stejnou protinádorovou aktivitu. Existuje možnost, že protinádorová aktivita resveratrolu vzniká v důsledku jeho metabolismu CYP1A1 na piceatannol (Sirerol a kol. 2015, Kershaw a Kim 2017).

Pinosylvin se také metabolizuje na celou řadu sloučenin a mezi jeho oxidovanými metabolity najdeme i resveratrol. Oproti resveratrolu nemá 4'-hydroxylovou skupinu, ale OH- v poloze 3, která je považovaná za hlavní cílovou strukturu konjugáčnických reakcí fáze II, byla zachována. V důsledku jeho extenzivního metabolismu je jeho biodostupnost po orální aplikaci v porovnání s resveratrolem nižší (Sirerol a kol. 2015).

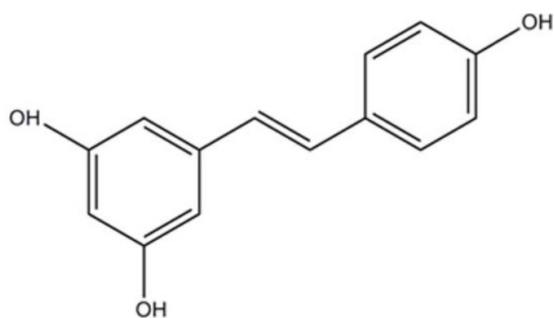
3.4.4 Vztahy mezi strukturou a účinkem

Obečně je hlavním problémem využití polyfenolů neúplná znalost jejich mechanismu účinku a nízká biodostupnost, která je z velké části určována jejich strukturou. Nejvíce pozornosti je zaměřeno na počet a pozice hydroxylových a methylovaných skupin, což má kromě aktivity vliv i na jejich metabolismus. Například hydroxylace na C4 u analogů resveratrolu je kritická pro jeho funkci v *in vitro* studiích. S rostoucím počtem OH skupin v ortho pozicích fenolového kruhu stilbenoidů by mohla vzrústat i jejich schopnost vychytávat volné radikály, cytotoxická aktivita a protizánětlivé účinky. Polyhydroxylované analogy resveratrolu jako hexahydroxystilben jsou účinnější a vykazují specifickou inhibiční aktivitu na COX-2 než resveratrol v *in vitro* i *in vivo* podmínkách. Tento analog navíc vykazuje i vyšší protiradikálovou aktivitu a indukuje apoptózu v nižších koncentracích než resveratrol (Sirerol a kol. 2015).

Výsledky studie s 3,4,5,4'-tetramethoxystilbenem (DMU-212), který má hydroxylovou skupinu na C4 blokovanou methylací, ukazují silnou antiproliferativní aktivitu v nádorech tlustého střeva, pravděpodobně díky zpomalení exkrece způsobené právě methylovanými skupinami lze získat analogy dosahující lepších plazmatických koncentrací. Dalším příkladem je pinosylvín, který se od resveratrolu liší pouze nepřítomností OH skupiny v poloze C4'. To vede ke zvýšení lipofility, ale i ke ztrátě antioxidační aktivity, nicméně v *in vivo* podmínkách ji opět získává. Methoxylované analogy mají vyšší lipofilitu, což jim usnadňuje přechod buněčnými membránami a pomalejší degradaci. Pterostilben s dvěma methoxy skupinami a *trans*-3,4'-dihydroxy-2',3',5-trimethoxystilben mají vyšší protinádorovou aktivitu než resveratrol *in vitro* i *in vivo*. OH skupiny zajišťují vyšší rozpustnost, což umožňuje lepší interakci s proteiny, ale nadbytek methoxylových skupin může tyto interakce narušit (Sirerol a kol. 2015).

Polyfenoly vykazují nadějně účinky na zdraví a terapeutický potenciál pro léčbu řady onemocnění, široké spektrum cílových struktur a velmi nízkou toxicitu. Úpravami polyfenolické struktury můžeme zlepšit jejich biodostupnost a biologickou aktivitu. DMU-212 je zástupcem více lipofilních strukturních analogů resveratrolu, který je schopný procházet hematoencefalickou bariérou. Tyto úspěchy ukazují, že modifikací polyfenolických struktur jsme schopni zvýraznit jejich vlastnosti a zvýšit tak jejich aktivitu a účinky (Sirerol a kol. 2015).

3.4.5 Zástupci stilbenoidů



Obr. 6

Chemická struktura *trans*-resveratrolu (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbenu).

Převzato z Koskela a kol. 2014

Resveratrol, 3,4',5-trihydroxystilben (Obr. 6), byl objeven v 40. letech minulého století v kořenech Kýchavice velkolisté (*Veratrum grandiflorum*) a jako polyfenolický fytoalexin ho poprvé popsali vědci Langcake a Pryce (1976). Nicméně v tradiční ajurvédské medicíně je resveratrol využíván jako kardiotonikum v přípravku „Darakchasava“ (obsahující hroznový extrakt) již více než 4500 let (Carizzo a kol. 2013). Vyskytuje se ve dvou izoformách, *cis* a *trans*, obě nalezneme i ve formě glukosidů (piceidy). Vyšší aktivita byla pozorována u *trans* izomeru (Anisimova a kol. 2011). Tento stilbenoid byl nalezen v nejméně 185 rostlinných druzích, např. v moruši, arašídech, pistáciích a zejména v révě vinné a produktech rostlinného původu jako je červené a bílé víno viz Tab. 4 (Tsai a kol. 2017). Resveratrol patří mezi fytoestrogeny díky schopnosti interagovat s estrogenovým receptorem (ER) a nápadná je také podobnost se syntetickým estrogenem – diethylstilbestrolem (Szkudelska a Szkudelski 2010).

Známý fenomén, tzv. Francouzský paradox, který spojuje pití červeného vína s nižším kardiovaskulárním rizikem, odstartoval v posledních letech řadu studií zabývajících se účinky a vlastnostmi resveratrolu (Sirerol a kol. 2015). Výsledkem těchto studií bylo zjištění velice příznivého efektu resveratrolu při prevenci nebo zpomalení progresu kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, dyslipidemie i nádorových onemocnění (Baur a Sinclair 2006). Jeho možné využití jako antikancerogenní látky vzbuzuje velký zájem vědecké veřejnosti, což dokazuje velké množství *in vitro* a *in vivo* testů zaměřujících se na různé typy nádorů jako karcinom prsu, plic, tlustého střeva, kůže, prostaty, vaječníků, jater, štítné žlázy a leukémie (Sirerol a kol. 2015).

Tabulka 4. Obsah resveratrolu ve vybraných potravinách.

Potravina	Koncentrace
Hroznové víno	0,16-3,54 µg/g
Suchá hroznová slupka	~24.06 µg/g
Džus z červených hroznů	~0,5 mg/l
Džus z bílých hroznů	~0,05 mg/l
Červené víno	0,1-14.5 mg/l
Bílé víno	0,1-2,1 mg/l
Arašídý	0,02-1,92 µg/g
Pistácie	0,09-1,67 µg/g

Upraveno podle Prasad K. 2012

Mechanismus působení resveratrolu na molekulární úrovni však není zcela jasný, přestože *in vitro* testy vedly k identifikaci velkého množství cílových struktur této látky. Zdá se, že má také vliv na expresi a aktivitu několika metabolizujících enzymů fáze I, *in vitro* inhibuje enzymatickou aktivitu několika enzymů cytochromu P450 a blokuje jejich transkripci antagonistou aryl hydrokarbonového receptoru (AHR) a naopak indukuje expresi enzymů II. fáze. To by mohlo vést k ovlivnění aktivace a detoxifikace kancerogenů nebo léčiv metabolizovaných těmito enzymy a k potenciálním lékovým interakcím (Baur a Sinclair 2006, Smoliga a kol. 2011).

Dalšími přírodními zástupci stilbenoidů s potenciálním terapeutickým využitím jsou pterostilben a piceatannol. Studie *in vitro* i *in vivo* prokázaly silnou antioxidační a antiproliferativní aktivitu pterostilbenu naznačující možné využití při terapii nádorových, prevenci a terapii neurologických a zmírnění vaskulárních onemocnění a diabetu (McCormack a McFadden 2013). Oproti resveratrolu je více lipofilní, vykazuje lepší biodostupnost po *per os* podání a vyšší biologickou aktivitu (Sirerol a kol. 2015). Obdobné účinky byly pozorovány i u piceatannolu (Piotrowska a kol. 2012, Kershaw a Kim 2017).

Mezi polosyntetické deriváty stilbenoidů s potenciálním terapeutickým využitím patří *trans*-3,4,5,4'-tetramethoxy-stilben (TMS, DMU-212) jako možné protinádorové léčivo s antioxidační a antiproliferativní aktivitou pozorovanou u nádorových buněčných linií vaječníků, prostaty, děložního čípku, prsu, jater a tlustého střeva (Piotrowska a kol. 2014). Antiproliferativní aktivitu u ovariálních nádorových buněk vykazuje i jeho metabolit *trans*-3'-hydroxy-3,4,5,4'-tetramethoxy-stilben (Piotrowska a kol. 2016). Další farmakologicky zajímavou látkou je *trans*-stilbene oxid (TSO), syntetický proestrogen, který indukuje transkripci enzymů I. a II. fáze metabolismu. Slitt a kol. v roce 2006 zjistili, že k této indukci u myších a potkaních modelů dochází pomocí aktivace CAR. Identifikovali tedy TSO jako fenobarbitalu podobný aktivátor myšího a potkaního CAR.

4. CÍL

Cílem této experimentální diplomové práce je otestovat 12 látek ze skupiny stilbenoidů jako potenciální ligandy myšního konstitutivního androstanového receptoru (mCAR).

Zvolená metoda gene reporter assay spočívá v transfekci specifických plazmidů do lidské hepatomové buněčné linie HepG2 lipofekcí dle protokolu LipofectamineTM 3000 reagentu (Invitrogen). Pro větší validitu výsledků použijeme duální reportérový systém Dual-Luciferase[®] Reporter Assay (Promega).

Výsledky této experimentální práce by mohly vést k dalšímu studiu uvedených látek, např. na *in vivo* modelech, a jejich potenciálnímu využití pro studium myšního CAR, jeho nových ligandů, popřípadě i jejich využití při výzkumu léčiv s lidským CAR jako cílovou strukturou.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Reagencie a buněčné linie

Reagencie

CITCO (Sigma Aldrich)

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich)

DMSO dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)

- Luciferase Assay Buffer II
- Luciferase Assay Substrat (Lyophilized Product)
- Stop&Glo Buffer
- Stop&Glo Buffer Substrate
- Passive Lysis Buffer

Lipofectamine™ 3000 Reagent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific)

Opti-MEM™ Medium (Minimum Essential Medium)

P3000™ Reagent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific)

PBS fosfátový pufr

Plasmid RL-TK(Promega)

Plasmid PBREM(CYP2B6)luc

Plasmid mCAR

Plasmid RXR α

TCPOBOP

Buněčná linie HepG2

Tato buněčná linie je odvozená z buněk hepatálního karcinomu jaterní tkáně 15-ti letého chlapce europoidní rasy s dobře diferenciovaným karcinomem jater. Jsou to adherentní epiteliální buňky s 55 páry chromozomů rostoucí v monovrstvě v malých agregátech. Jejich růst může být stimulován lidským růstovým faktorem a jsou schopny sekretovat řadu plazmatických proteinů jako transferin, fibrinogen, plasminogen nebo albumin (web HepG2 cells).

HepG2 linie se kultivuje v DMEM médiu obsahujícím 2mM glutaminu a 10% fetálního bovinního séra. Inkubace probíhá za teploty 37°C a v atmosféře 5% CO₂. Pasážování buněk se provádí při konfluenci 70-80% za pomoci trypsinu, který buňky uvolní od podkladu.

5.2 Pomůcky a přístroje

48 a 96 jamkové destičky

Destičkový spektrofotometr-luminometr Synergy 2 (BioTek)

Inkubátor Sanyo

Laminární box

Mikropipety

Odsávačka

Pasteurovy pipety

Plastové zkumavky a mikrozukavky

Třepačka

5.3 Testované látky a jejich koncentrace

Látky použité k experimentům této diplomové práce jsou ze skupiny přírodních stilbenoidů nebo sloučeniny odvozené od jejich struktury viz Obr. 7, celkem jsme testovali 12 látek viz tab. 5).

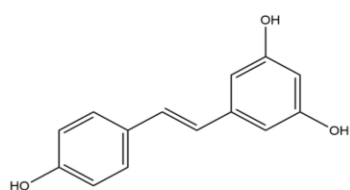
Látky byly použity a testovány v koncentracích 10 μ M/l a 25 μ M/l (látky D a E, vyšší koncentrace jsme zvolili z důvodu jejich rozpustnosti), na tyto koncentrace jsme látky nejprve museli naředit. Jejich zásobní roztoky, ze kterých jsme vycházeli, měly koncentrace 10mM/l a 25mM/l (látky D,E) v DMSO. Jako pozitivní kontrola byl použit TCPOBOP v koncentraci 10 μ M/l, známý ligand mCAR. Roli negativní kontroly měl roztok DMSO v DMEM mediu o koncentraci 1% v/v a také CITCO, ligand lidského, ale nikoliv myšího CARu.

V druhém experimentu jsme se zaměřili na látky, které vykazaly aktivitu při prvním testu. Testovali jsme látky D a G v koncentracích 1, 5, 10 a 25 μ M/l, ve stejných koncentracích jsme testovali i TCPOBOP. Jako negativní kontrola opět sloužil DMSO 1% v/v. Zjišťovali jsme také, zda se neprokáže parciální aktivita těchto látek, a to otestováním kombinace TCPOBOP (10 μ M/l) s látkou D (25 μ M/l) a TCPOBOP (10 μ M/l) s látkou G (25 μ M/l). Jelikož jsme použili zásobní roztoky v DMSO, výsledná koncentrace této látky v roztoku byla 2% v/v, proto jsme přidali jako kontrolu i roztok TCPOBOP (10 μ M/l) obsahující 2% v/v DMSO, aby byla zachována validita naměřených dat a eliminoval se případný účinek DMSO na aktivaci mCAR.

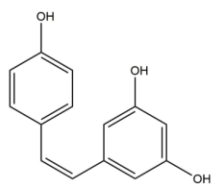
Tabulka 5. Látky testované jako potenciální ligandy mCAR.

A	<i>trans</i> -resveratrol	H	<i>cis</i> -piceatannol
B	<i>cis</i> -resveratrol	I	oxyresveratrol
C	a,b-dihydroresveratrol	J	<i>trans</i> -trismethoxyresveratrol*
D	<i>trans</i> -3,4,5,4'-tetramethoxystilbene	K	<i>cis</i> -trismethoxyresveratrol
E	<i>trans</i> -2,4,3',5'-tetramethoxystilbene	L	pterostilbene
F	<i>trans</i> -methoxystilbene	M	pinostilbene
G	<i>trans</i> -piceatannol		

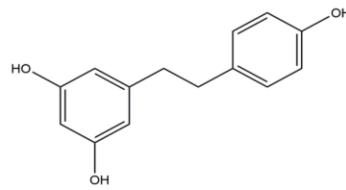
*v experimentu nebyl použit, neměli jsme dostatečné množství zásobního roztoku



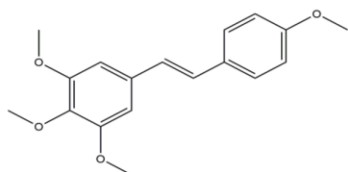
trans-resveratrol



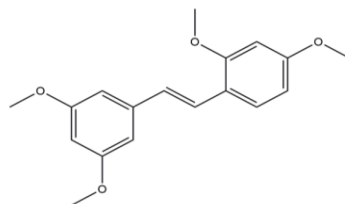
cis-resveratrol



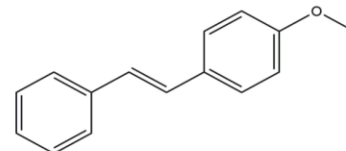
a,b-dihydroresveratrol



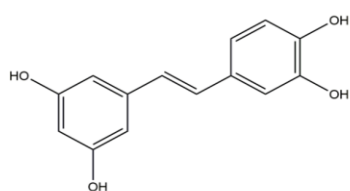
trans-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene



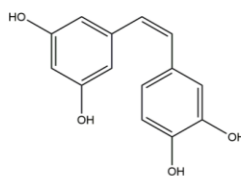
trans-2,4,3',5'-tetramethoxystilbene



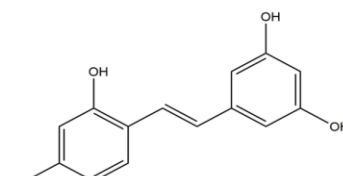
trans-4-methoxystilbene



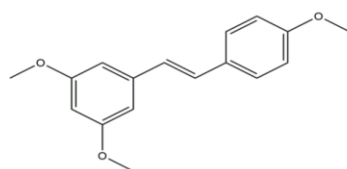
trans-piceatannol



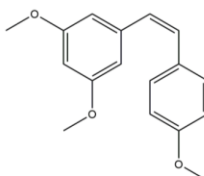
cis-piceatannol



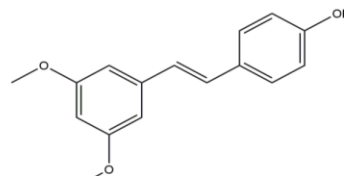
oxyresveratrol



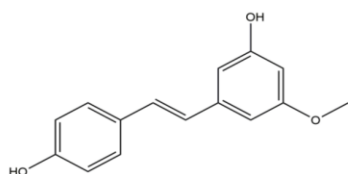
trans-trimethoxyresveratrol



cis-trimethoxyresveratrol



pterostilbene



pinostilbene

Obr. 7

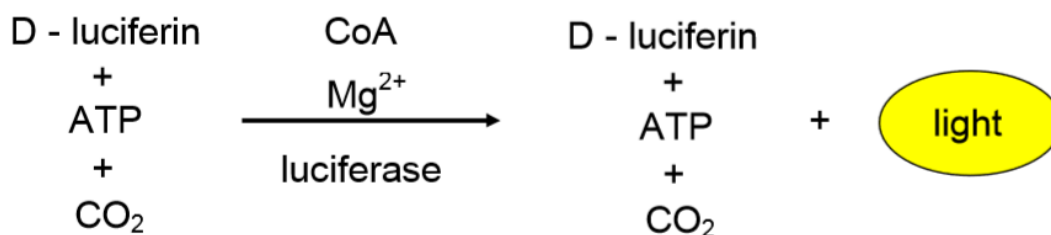
Struktury testovaných látek.

5.4 GENE REPORTER ASSAY

5.4.1 Princip

Tato metoda je mimo jiné využívána pro studium genové exprese a možností jejího ovlivnění. Genová exprese je řízena transkripčními faktory, často nukleárními receptory, které se váží na regulační (promotorovou) oblast genu, jenž je následně exprimován. Klíčovým krokem je transfekce (vlození) cirkulární DNA v podobě reportérového plazmidu do buňky, nejčastěji eukaryotních nádorových buněčných linií. Plazmidy jsou malé kruhové dvouřetězcové molekuly extrachromozómní DNA. Možností transfekce DNA je několik, v našem experimentu vkládáme DNA do buněk ve formě lipozomů – metodou lipofekce dle protokolu Lipofectamine™ 3000 Reagent od firmy ThermoFisher.

Vkládaný reportérový plazmid obsahuje promotor se specifickou sekvencí, na kterou se váže studovaný nukleární receptor, a těsně za ním kódující DNA pro reportérový gen, který je po navázání transkripčního faktoru na promotor transkribován do mRNA a translatován na protein pomocí translačního aparátu transfekované buňky. Exprese tohoto genu tedy koreluje s transkripční aktivitou receptoru. Pro studium ovlivnění genové exprese transkripčními faktory se využívá takového genu, jehož exprese je snadno detekovatelná, např. enzymovou reakcí nebo luminiscenčně. Nejčastěji používaná světlušková luciferáza (původně izolovaná ze světlušky *Photinus pyralis*) je enzym, který po přidání svého substrátu luciferinu, za přítomnosti ko-substrátů O₂ a ATP, spouští bioluminiscenční reakci za vyzáření světla, viz obr. 8 (Kameníčková 2012).



Obr. 8 Monooxygenace D-luciferinu zprostředkovaná enzymem luciferázou za emise bioluminiscenčního signálu. ATP, adenosintrifosfát; CO₂, oxid uhličitý; CoA, koenzym A.

Převzato z Kameníčková 2012

V našem experimentu jsme jako reportérový plazmid použili pPBREM-luc obsahující responzivní element pro fenobarbital lidského genu CYP2B6, na který se váže mCAR, a gen pro světluškovou luciferázu, jejíž stanovení nám slouží jako report transkripční aktivity mCAR. Druhý vkládaný plazmid tzv. expresní, nese genovou sekvenci kódující sledovaný transkripční faktor, který je exprimován transkripčním aparátem buňky. V přítomnosti jeho ligandu dochází k aktivaci a navázání na promotor reportérového plazmidu a spuštění transkripce genu pro světluškovou luciferázu.

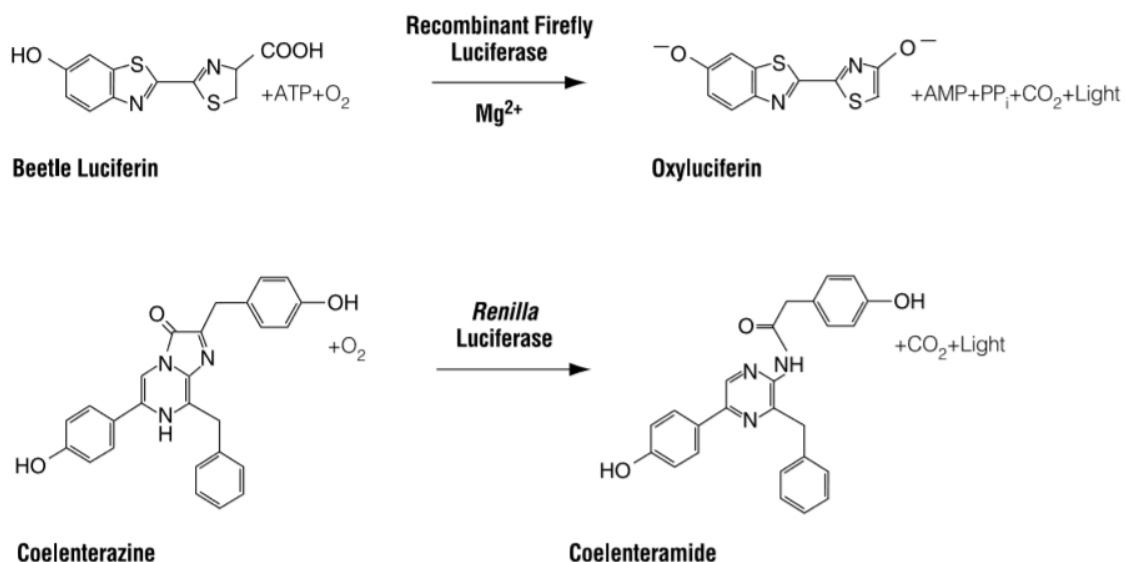
V experimentu sledujeme, zda látky ze skupiny stilbenoidů interagují s nukleárním receptorem mCAR, vloženým do buněčné linie HepG2 pomocí expresního plazmidu, detekcí luminiscence vzniklé reakcí katalyzovanou světluškovou luciferázou ve srovnání s negativní kontrolou 1% v/v DMSO, jako pozitivní kontrola byl použit TCPOBOP v koncentraci 10 μ M/l. Expres luciferázy byla normalizovaná použitím Dual-Luciferase® Reporter Assay.

Dual-Luciferase® Reporter Assay Systém

Duální reportérové systémy se běžně používají ke zvýšení přesnosti prováděných experimentů. Termín „duální reportér“ odkazuje na souběžnou expresi a detekci dvou reportérových enzymů v jediném systému. Experimentální reportér koreluje s experimentálními podmínkami, zatímco aktivita kotransfekovaného kontrolního reportéru zajišťuje vnitřní kontrolu. Normalizací aktivity experimentálního reportéru na aktivitu vnitřní kontroly minimalizujeme variabilitu způsobenou odlišnou viabilitou buněk nebo efektivitou transfekce. Další zdroje variability jako rozdíly v pipetovaných objemech, efektivita buněčné lýzy či efektivita samotného testu lze takto také účinně odstranit. Duální reportérové systémy tak dovolují spolehlivější interpretaci získaných dat snížením vnějších vlivů (Promega Technical Manual No. 040, Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2015).

Pro náš experiment byla použita firefly luciferáza (světluška *Photinus pyralis*) jako experimentální reportér a *Renilla* luciferáza (mořská maceška *Renilla reniformis*) jako vnitřní kontrola. Aktivita světluškové luciferázy je měřena jako první. Přidáním Luciferase Assay Reagentu II (připraven smícháním Luciferase Assay Substrate a Luciferase Assay Buffer II) dochází ke vzniku luminiscenčního signálu, který je kvantifikován spektrofotometr-luminometrem Synergy 2 (BioTech). Následně je signál „zhasnut“ přidáním Stop&Glo Reagentu (připraven smícháním Stop&Glo Buffer a Stop&Glo Substrate), který obsahuje i substrát pro *Renilla* luciferázu, takže je v jednom kroku ukončena reakce světluškové luciferázy a zároveň vyvolána chemiluminiscenční reakce *Renilla* luciferázy. Její reakce

spočívá v přeměně koelentarazinu za přítomnosti O_2 na koelenteramid a emisi fotonu, viz Obr. 9. Další výhodou je, že oba enzymy jsou aktivní hned po translaci a ke své funkci nepotřebují posttranslační modifikace, takže je lze stanovovat téměř okamžitě (Promega Technical Manual No. 040, Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2015).



Obr. 9 Bioluminiscenční reakce katalyzované světluškovou a *Renilla* luciferázou.

(převzato z Promega Technical Manual No. 040, Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2015).

Transfekované plazmidy

pmCAR – expresní plazmid obsahující kódující genovou sekvenci (cDNA) myšního konstitutivního androstanového receptoru

pPBREM2B6-luc – reportérový plazmid nesoucí promotor – PBREM, responzivní element fenobarbitalu z genu CYP2B6, na který se váže ligandem aktivovaný mCAR; virový CMV promotor a reportérový gen pro světluškovou luciferázu

pRL-TK – expresní vektor pro *Renilla* luciferázu

pRXR alfa – expresní vektor pro retinoidní X receptor alfa, tvorba heterodimeru s mCAR

5.4.2 Postup metody

1. V prvním kroku nasadíme buňky buněčné linie HepG2 na 48-jamkovou destičku (40 tis. buněk na cm^2), do každé jamky přidáme 150 μl DMEM média (Dulbecco's Modified Eagle's Medium).
2. Destičku umístíme do inkubátoru, který je temperován na 37°C v 5% atmosféře CO_2 . Inkubujeme 24 hodin.
3. Po inkubaci zkontrolujeme pod mikroskopem buňky a vyměníme staré médium (odsátím odsávačkou) za nové, opět 150 μl na jamku.
4. Vypočítáme množství plazmidů a LipofectamineTM 3000 Reagent a P3000TM Reagent potřebné k transfekci a připravíme transfekční směs.

Složení transfekční směsi:

Část 1:

15 μl Opti-MEM média a 0,6 μl P3000 Reagentu (2 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA) na 1 jamku s obsahem plazmidů:

- a) pRL-TK 30 ng na jamku
- b) pPBREM-luc 150 ng na jamku
- c) pmCAR 100 ng na jamku
- d) pRXR α 100 ng na jamku

Část 2:

15 μl Opti-MEM média a 0,45 μl Lipofectamine 3000 Reagent na 1 jamku

Transfekční směs připravíme přidáním části 1 do části 2 (*tedy roztok obsahující DNA do roztoku Lipofectaminu*) a necháme 15 min inkubovat za pokojové teploty.

5. Do každé jamky připipetujeme 30 μl připravené transfekční směsi a necháme inkubovat 24 hodin za stejných podmínek.
6. Médium opět odsajeme a nahradíme ho 150 μl roztoku, který se skládá z testovaných látek ve výše uvedených koncentracích, DMSO, ve kterém byly látky rozpuštěny (v koncentraci 1‰ v/v) a z DMEM média. Jako pozitivní kontrola slouží TCPOBOP v koncentraci 10 $\mu\text{M}/\text{l}$. Negativní kontrolu poskytuje 1‰ v/v roztok DMSO v DMEM a CITCO v koncentraci 10 $\mu\text{M}/\text{l}$.
7. 24-hodinová inkubace za výše uvedených podmínek.
8. Z jamek odsajeme směsi média a testovaných látek, buňky opláchneme PBS pufrem temperovaným v lázni na 37°C .

9. Připipetujeme 85 μ l/jamka Passive lysis buffer a destičku umístíme do mrazáku, kde dochází díky tvorbě krystalků vody k lýze buněk.
10. Destičku se zmrzlými lyzovanými buňkami umístíme na třepačku a necháme roztát.
11. Připravíme si 96-jamkovou destičku, na kterou přeneseme 40 μ l lyzátu z každé jamky. K němu následně přidáme 40 μ l Luciferase Assay Reagentu II (*obsahující luminol*).
12. Destičkovým spektrofotometr-luminometrem Synergy 2 (BioTek) analyzujeme chemiluminiscenci prostřednictvím světluškové luciferázy.
13. Do každé jamky přidáme 30 μ l Stop&Glo Reagentu připraveného ze Stop&Glo Substrate a Stop&Glo Buffer v poměru 1:50.
14. Destičkovým spektrofotometrem/luminometrem Synergy 2 (BioTek) analyzujeme chemiluminiscenci prostřednictvím *Renilla* luciferázy.
15. Vyhodnocení získaných dat.

5.5 Statistická analýza dat

Předběžná statistická analýza dat byla provedena v programu GraphPad PRISM 8.1.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), za použití analýzy rozptylu (ANOVA) a Dunettova testu. Statistická významnost na úrovni $p < 0,05$ je vyznačena *, $p < 0,01$ pak **, $p < 0,001$ pak *** a $p < 0,0001$ jako ****.

Pro naše účely byly předběžně analyzovány výsledky triplikátu z pouze jednoho gene reporter assay testu, pro validní výsledky statistiky by bylo zapotřebí tří nezávislých měření.

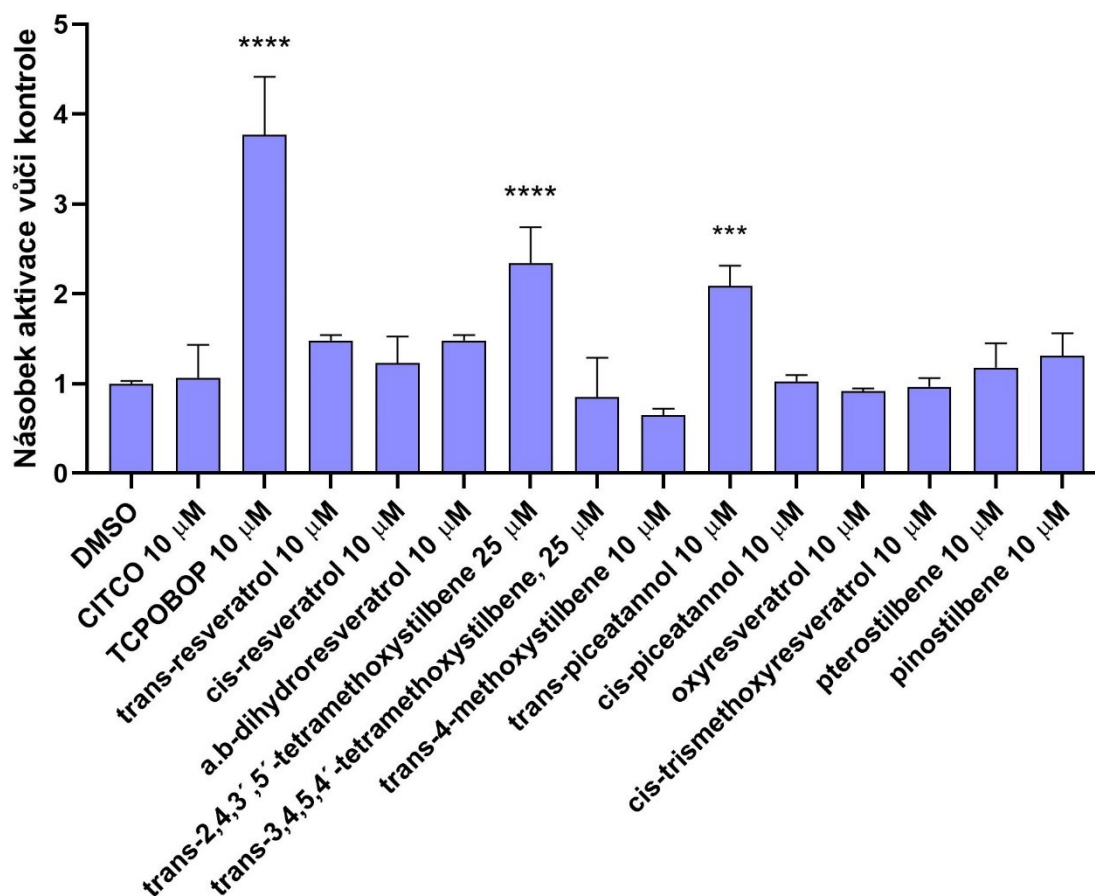
6. Výsledky

6.1 Gene reporter assay

Pomocí této metody jsme zjišťovali, zda některé z námi testovaných látek ze skupiny stilbenoidů nejsou ligandy mCAR, tedy zda nezvyšují jeho transkripční aktivitu, což by se projevilo jako luminiscenční signál vzniklý v důsledku exprese světluškové luciferázy z reportérového plazmidu a jí katalyzovanou reakcí luciferinu. Jako negativní kontrolu jsme použili vehikulum/solvent DMSO v koncentraci 1% v/v a jako pozitivní TCPOBOP v koncentraci 10 μ M (viz Obr. 10). Transfekované buňky byly exponovány testovaným látkám vždy v triplikátech pro každou látku.

Tento experiment byl proveden jako základní screening pro identifikaci možné interakce vybrané skupiny látek s mCAR. Látky, které vykazali možnou interakci byly podrobeny dalšímu experimentu. Výsledky tohoto testu byly předběžně statisticky analyzovány.

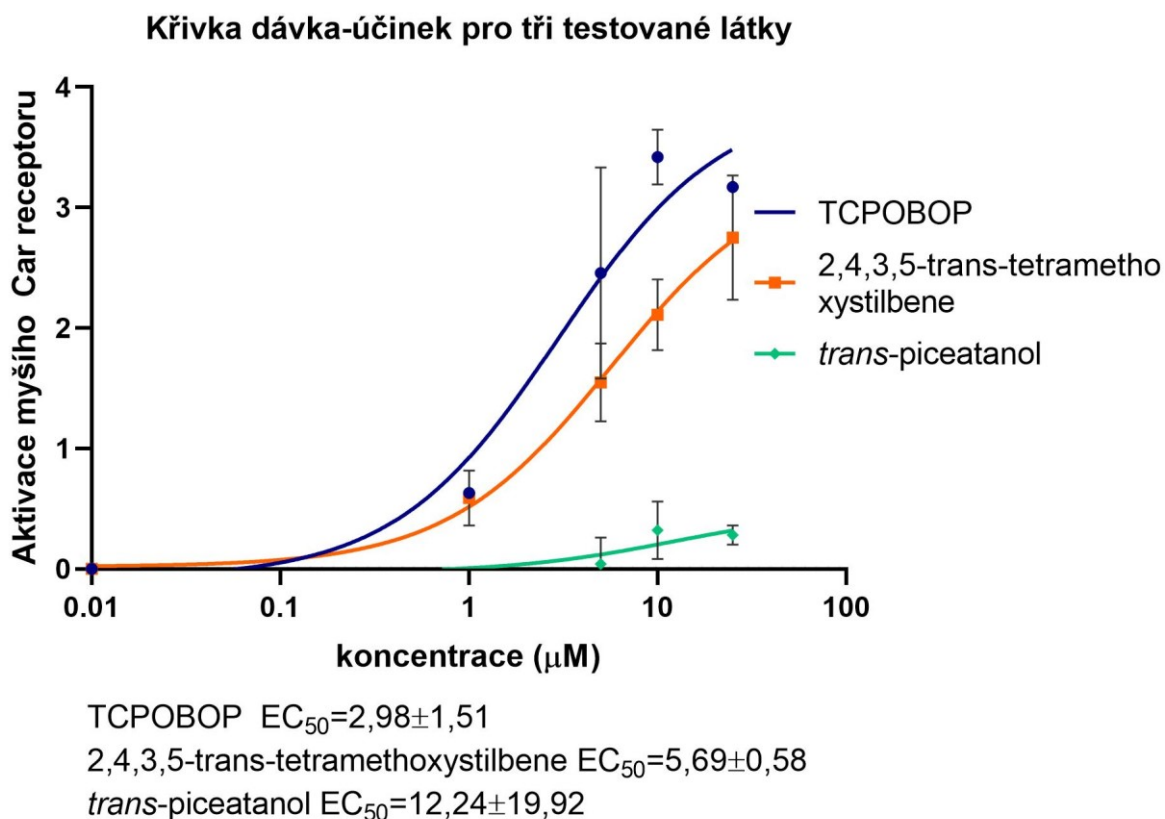
Aktivace myšního CAR receptoru stilbenoidy



Obr. 10 Analýza interakce testovaných látek ze skupiny stilbenoidů s mCAR receptorem metodou gene reporter assay s reportérovým plazmidem pPBREM2B6-luc na HepG2 buněčné linii. Interakce byla měřena po 24hodinové inkubaci s danými látkami (v koncentracích uvedených v grafu) jako míra luminiscence a vyjádřena jako poměr luminiscenčních signálů firefly a *Renilla* luciferáz pro jednotlivé látky vzhledem k poměru firefly a *Renilla* luciferáz u kontroly DMSO (1% v/v). Předběžná statistická významnost zjištěná provedením předběžného testu ANOVA s Dunnetovým post hoc testem na úrovni $p < 0,001$ je vyznačena *** a $p < 0,0001$ pak ****.

Zvýšení transkripční aktivity receptoru jsme na předběžné statistické úrovni $p < 0,0001$ pozorovali u známého mCAR ligandu TCPOBOP v koncentraci 10 μ M a u *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenu v koncentraci 25 μ M a na předběžné statistické úrovni $p < 0,001$ u *trans*-piceatannolu v koncentraci 10 μ M.

V dalším experimentu jsme testovali látky *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilben a *trans*-piceatanol v koncentracích 1, 5, 10 a 25 μM , jako pozitivní kontrolu jsme použili TCPOBOP ve stejných koncentracích a DMSO (1‰ v/v) jako kontrolu negativní (viz Obr. 11). Z naměřených dat jsme získali hodnoty EC_{50} .



Obr. 11 Logaritmická závislost dávka-účinek u TCPOBOP, *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenu a *trans*-piceatannolu. Transfekované buňky byly exponovány mediem s TCPOBOP, *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenem a *trans*-piceatannolem v koncentracích 1, 5, 10 a 25 μM a inkubovány 24 hodin. Míru aktivace vyjádřenou jako poměr luminiscence světluškové a *Renilla* luciferáz vztažené k poměru luminiscence světluškové a *Renilla* luciferáz kontroly DMSO (1‰ v/v) jsme použili pro vyjádření závislosti dávky a účinku a výpočet jejich EC_{50} .

Nejnižší hodnotu $EC_{50}=2,98\pm 1,51$ (a tedy nejvyšší aktivaci mCAR) jsme dle očekávání zjistili u TCPOBOP, nicméně směrodatná odchylka je příliš vysoká, což by mohly způsobit nepřesnosti při provádění experimentu. Vyšší hodnota $EC_{50}=5,69\pm 0,58$ *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenu vypovídá o nižší afinitě této látky k receptoru a tedy i jeho nižším aktivačním potenciálu oproti TCPOBOP. *Trans*-piceatannol při tomto experimentu prokázal velice omezenou aktivaci mCAR o čemž svědčí získaná EC_{50} a směrodatná odchylka ($12,24\pm 19,92$), v tomto testu tedy nevyšel jako významný agonista mCAR.

7. Diskuze

Naším cílem při provádění této experimentální diplomové práce bylo otestovat 12 látek ze skupiny stilbenoidů jako potenciální ligandy myšího konstitutivního androstanového receptoru. Tomu, že by mohli tyto sloučeniny ovlivňovat aktivitu CAR, napovídalo i objevení *trans*-stilbene oxidu (TSO) jako ligandu myšího a potkaního CAR (Slitt a kol. 2006). Schopnost těchto látek aktivovat mCAR jsme zkoumali pomocí metody gene reporter assay za použití buněčné linie HepG2. Výsledkem prvního experimentu byla identifikace *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenu a *trans*-piceatannolu jako možných ligandů mCAR. K potvrzení statistické významnosti těchto výsledků je však třeba experiment několikrát opakovat.

Druhý experiment jsme provedli s cílem zjistit závislost dávky testovaných látek na jejich účinku. V souladu s výsledky předchozího testu se jako nejsilnější agonista mCAR ukázal TCPOBOP následován *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenem. Avšak u *trans*-piceatannolu jsme získali rozporuplné výsledky, v prvním experimentu (koncentrace 10 μ M) zvyšoval transkripční aktivitu mCAR s předběžnou statistickou významností, kdežto při druhém testu se objevilo pouze mírné zvýšení při nejvyšší použité koncentraci, tedy 25 μ M. Nesrovnalosti ve výsledcích *trans*-piceatannolu a vysoká směrodatná odchylka hodnot EC_{50} naznačují nutnost opakovat tyto experimenty za různých podmínek, případně použít další metody. Zda je či není piceatannol aktivátorem mCAR, bude tedy nutné ověřit dalšími experimenty.

Snahu identifikovat nový ligand konstitutivního androstanového receptoru podmiňuje absence specifického endogenního ligandu CAR a nevhodné vlastnosti dosud známých syntetických ligandů, což limituje další studium funkcí a mechanismů působení tohoto nukleárního receptoru. CITCO, agonista lidského CAR vykazuje slabší aktivitu a účinek nepřímo působícího fenobarbitalu je nespecifický. TCPOBOP, ligand myšího CAR vykazuje mitogenní působení na jaterní tkáň a proliferaci jaterní tkáně exponovaného zvířete (Bhushan a kol. 2019).

Sama aktivace hlodavčího CAR je spojována s mitogenním efektem, hypertrofií a hyperplazií jater. Jeden z navrhovaných mechanismů negenotoxické kancerogeneze myších jater je významně závislý na aktivaci mCAR. U normálních (wild type) myší podání TCPOBOP nebo fenobarbitalu vede k ovlivnění řady signálních kaskád podílejících se na potlačení apoptózy. Nicméně aktivace mCAR vede i ke zvýšení exprese proapoptotických faktorů (Dušek a kol. 2019). Vystává tedy otázka, zda je hypertrofie jater zprostředkována aktivací

mCAR, nebo zda má větší podíl TCPOBOP. K objasnění by mohlo pomoci nalezení nových ligandů mCAR. Pokud by podávání nového ligandu vedlo k aktivaci mCAR ale nikoliv k hypertrofii a hyperplazii jater, byl by to argument pro teorii, že proliferaci jaterní tkáně způsobuje TCPOBOP jako takový, a nikoliv aktivace mCAR jak je navrhováno.

Teorii, že TCPOBOP by mohl být zodpovědný za proliferaci hepatocytů podpořily i výsledky nedávné studie Bhushana a kol. (2019), podle kterých inhibice MET (receptor pro jaterní růstový faktor Met) a EGRF (receptor epidermálního růstového faktoru), což jsou důležité regulátory signálních kaskád podílejících se na regeneraci jater, vedla k významnému snížení TCPOBOP navozené proliferace jaterní tkáně a hepatomegalie u MET knockoutovaných a EGFRi myších modelů oproti normálním myším. V žádných předchozích studiích nebyl prokázán takovýto významný efekt na TCPOBOP navozenou hepatomegalii ovlivněním jiného mediátoru než mCAR. Z výsledků tedy vyplývá, že TCPOBOP ovlivňuje i jiné důležité mediátory vedoucí k proliferaci jater (Bhushan a kol. 2019).

Za předpokladu, že další experimenty potvrdí *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilben jako ligand mCAR, bylo by vhodné otestovat jeho vliv na proliferaci a tumorigenezi jater a vliv na apoptózu. Výhodou oproti TCPOBOP by mohla být také farmakokinetika *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenu. Stilbenoidy obecně jsou velmi rychle metabolizovány a vyloučeny v řádu hodin (Sirerol a kol. 2015), zatímco TCPOBOP je vysoce lipofilní polychrolovaná a polyaromatická sloučenina, která se kumuluje v tukové tkáni a udržuje stabilní koncentrace v játrech i 14 dní po podání jediné dávky, bez toho, aby byla metabolizována (Dušek a kol 2019).

Extrapolace výsledků dosažených zkoumáním např. myších modelů na člověka je značně omezena odlišnostmi mezi lidským a hlodavčími CAR, mezi nimi i rozdílností ligandů. To dokumentuje i fakt, že *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilben není ligand lidského CAR (Hyrsova a kol. 2018). Výsledek této práce by tedy mohl sloužit jako podnět pro další zkoumání *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenu a jemu podobných látek, které by mohli přispět k dalšímu studiu mCAR.

8. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo otestovat 12 látek ze skupiny stilbenoidů jako potenciální ligandy myšního konstitutivního androstanového receptoru pomocí metody gene reporter assay na lidské hepatomové linii HepG2.

Zjistili jsme, že látka *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilben interaguje s mCAR a zvyšuje jeho transkripční aktivitu. Porovnáním *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilbenu se známým ligandem TCPOBOP pomocí závislosti dávka-účinek jsem zjistila, že je slabším agonistou nežli TCPOBOP.

Ze získaných výsledků lze předpokládat, že *trans*-2,4,3',5'-tetramethoxystilben by mohl mít vliv na expresi cílových genů mCAR, a tak ovlivňovat farmakokinetiku spolupodaných léčiv a glukózový a lipidový metabolismus. Nový ligand by rovněž mohl být využit pro další studium tohoto receptoru mimo rámec dosud studovaných funkcí CAR.

9. Literatura

Abass K, Lämsä V, Reponen P, Küblbeck J, Honkakoski P, Mattila S, et al. (2012). Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology* 2012;294:17 – 26. 140.

Anisimova, N. Y., Kiselevsky, M. V., Sosnov, A. V., Sadovnikov, S. V., Stankov, I. N., & Gakh, A. A. (2011). Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: a comparative study. *Chemistry Central journal*, 5, 88.

Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493–506.

Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., & Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ precision oncology*, 1, 35.

Bhushan, B., Stoops, J. W., Mars, W. M., Orr, A., Bowen, W. C., Paranjpe, S., & Michalopoulos, G. K. (2018). TCPOBOP-induced hepatomegaly & hepatocyte proliferation is attenuated by combined disruption of MET & EGFR signaling. *Hepatology*.

Burk O, Piedade R, Ghebreghiorghis L, Fait JT, Nussler AK, Gil JP, et al. (2012). Differential effects of clinically used derivatives and metabolites of artemisinin in the activation of constitutive androstane receptor isoforms. *Br J Pharmacol*, 167:666 – 81. 63.

Chai, S. C., Lin, W., Li, Y., & Chen, T. (2019). Drug discovery technologies to identify and characterize modulators of the pregnane X receptor and the constitutive androstane receptor. *Drug Discovery Today (Accepted manuscript)*

Carrizzo, A., Forte, M., Damato, A., Trimarco, V., Salzano, F., Bartolo, M., Vecchione, C. (2013). Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 215–226.

Chen, Y., Tang, Y., Guo, C., Wang, J., Boral, D., & Nie, D. (2012). Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochemical pharmacology*, 83(8), 1112-26.

Cherian, M. T., Chai, S. C., & Chen, T. (2015). Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 11(7), 1099-1114.

Chong, J., Poutaraud, A., & Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177(3), 143–155.

Dau, P. T., Sakai, H., Hirano, M., Ishibashi, H., Tanaka, Y., Kameda, K., ... Iwata, H. (2012). Quantitative Analysis of the Interaction of Constitutive Androstane Receptor with Chemicals and Steroid Receptor Coactivator 1 Using Surface Plasmon Resonance Biosensor Systems: A Case Study of the Baikal Seal (*Pusa sibirica*) and the Mouse. *Toxicological Sciences*, 131(1), 116–127.

DeKeyser JG, Stagliano MC, Auerbach SS, Prabhu KS, Jones AD, Omiecinski CJ. (2009). Di(2-ethylhexyl)phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2. *Mol Pharmacol*;75:1005 – 13. 143.

Di Masi, A., Marinis, E. D., Ascenzi, P., & Marino, M. (2009). Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(5), 297–343. Duarte, J., Perrière, G., Laudet, V., & Robinson-Rechavi, M. (2002). NUREBASE: database of nuclear hormone receptors. *Nucleic acids research*, 30(1), 364-8.

Dubrovina, A. S., & Kiselev, K. V. (2017). Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta*, 246(4), 597–623.

Dušek, J., Škoda, J., Holas, O., Horvatová, A., Smutný, T., ... Pávek, P. (2019). Stilbene compound trans-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene, a potential anticancer drug, regulates constitutive androstane receptor (Car) target genes, but does not possess proliferative activity in mouse liver. *In press*.

Faucette SR, Zhang T-C, Moore R, Sueyoshi T, Omiecinski CJ, LeCluyse EL, et al. (2007) Relative activation of human pregnane X receptor versus constitutive androstane receptor defines distinct classes of CYP2B6 and CYP3A4 inducers. *J Pharmacol Exp Ther*;320:72 – 80.

Gao, J., & Xie, W. (2010). Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor at the Crossroads of Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12), 2091–2095.

Garcia, M., Thirouard, L., Sedès, L., Monrose, M., Holota, H., Caira, F., Volle, D. H., Beaudoin, C. (2018). Nuclear Receptor Metabolism of Bile Acids and Xenobiotics: A Coordinated Detoxification System with Impact on Health and Diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3630.

Hernandez, J. P., Mota, L. C., & Baldwin, W. S. (2009). Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. *Current pharmacogenomics and personalized medicine*, 7(2), 81-105.

Huang W, Zhang J, Wei P, Schrader WT, Moore DD. (2004). Meclizine is an agonist ligand for mouse constitutive androstane receptor (CAR) and an inverse agonist for human CAR. *Mol Endocrinol*;18:2402 – 8. 141.

Hyrsova, L., Vanduchova, A., Dusek, J., Smutny, T., Carazo, A., Maresova, V., ... Pavek, P. (2018). Trans-resveratrol, but not other natural stilbenes occurring in food, carries the risk of drug-food interaction via inhibition of cytochrome P450 enzymes or interaction with xenosensor receptors. *Toxicology Letters. Accepted Manuscript*

Jyrkkärinne J, Windshügel B, Rönkkö T, Tervo AJ, Küblbeck J, Lahtela-Kakkonen M, et al. (2008). Insights into ligand-elicited activation of human constitutive androstane receptor based on novel agonists and three-dimensional quantitative structureactivity relationship. *J Med Chem*; 51:7181 – 92.

Kershaw, J., & Kim, K. H. (2017). The Therapeutic Potential of Piceatannol, a Natural Stilbene, in Metabolic Diseases: A Review. *Journal of medicinal food*, 20(5), 427–438.

Koskela, A., Reinisalo, M., Hyttinen, J. M., Kaarniranta, K., & Karjalainen, R. O. (2014). Pinosylvin-mediated protection against oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells. *Molecular vision*, 20, 760–769.

Küblbeck J, Jyrkkärinne J, Molnár F, Kuningas T, Patel J, Windshügel B, et al. (2011). New in vitro tools to study human constitutive androstane receptor (CAR) biology: discovery and comparison of human CAR inverse agonists. *Mol Pharm*; 8:2424 – 33.

Küblbeck J, Jyrkkärinne J, Poso A, Turpeinen M, Sippl W, Honkakoski P, et al. (2008). Discovery of substituted sulfonamides and thiazolidin-4-one derivatives as agonists of human constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol*; 76:1288 – 97.

Küblbeck J, Laitinen T, Jyrkkärinne J, Rousu T, Tolonen A, Abel T, et al. (2011). Use of comprehensive screening methods to detect selective human CAR activators. *Biochem Pharmacol*, 82:1994 – 2007.

Langcake, P. and Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, vol. 9, no. 1, pp.77–86.

Li L, Chen T, Stanton JD, Sueyoshi T, Negishi M, Wang H. (2008). The peripheral benzodiazepine receptor ligand 1-(2-chlorophenylmethylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide is a novel antagonist of human constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol*;74:443 – 53.

Lynch C, Pan Y, Li L, Ferguson SS, Xia M, Swaan PW, et al. (2013) Identification of novel activators of constitutive androstane receptor from FDA-approved drugs by integrated computational and biological approaches. *Pharm Res*; 30:489 – 501.

Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, et al. (2003). Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J Biol Chem*;278:17277 – 83. 139.

McCormack, D., & McFadden, D. (2013). A review of pterostilbene antioxidant activity and disease modification. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 575482.

Molnár, F., Küblbeck, J., Jyrkkärinne, J., Prantner, V., & Honkakoski, P. (2013). An update on the constitutive androstane receptor (CAR). *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 28(2).

Pannu, N., & Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2237–2251.

Pávek P., Červený L., Mičuda S., Štaud F., Novotná-Čečková M., Fendrich Z. (2005). Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí, *Remedia* 15 (4-5), str. 380-383

Piotrowska, H., Kucinska, M., & Murias, M. (2012). Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750(1), 60–82.

Piotrowska, H., Myszkowski, K., Abraszek, J., Kwiatkowska-Borowczyk, E., Amarowicz, R., Murias, M., ... Jodynis-Liebert, J. (2014). DMU-212 inhibits tumor growth in xenograft model of human ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(4), 397–400.

Piotrowska-Kempisty, H., Ruciński, M., Borys, S., Kucińska, M., Kaczmarek, M., Zawierucha, P., ... Jodynis-Liebert, J. (2016). 3'-hydroxy-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene, the metabolite of resveratrol analogue DMU-212, inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in a mice xenograft model. *Scientific Reports*, 6(1).

Prasad, K. (2012). Resveratrol, wine, and atherosclerosis. *Int. J. Angiol.* 21, 7–18.

Qatanani, M., & Moore, D. (2005). CAR, The Continuously Advancing Receptor, in *Drug Metabolism and Disease*. *Current Drug Metabolism*, 6(4), 329–339.

Shen, T., Wang, X.-N., & Lou, H.-X. (2009). Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports*, 26(7), 916.

Sirerol, J. A., Rodríguez, M. L., Mena, S., Asensi, M. A., Estrela, J. M., & Ortega, A. L. (2015). Role of Natural Stilbenes in the Prevention of Cancer. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 3128951.

Slitt, A. L. (2006). trans-Stilbene Oxide Induces Expression of Genes Involved in Metabolism and Transport in Mouse Liver via CAR and Nrf2 Transcription Factors. *Molecular Pharmacology*, 69(5), 1554–1563.

Slitt, A. L., Cherrington, N. J., Fisher, C. D., Negishi, M., & Klaassen, C. D. (2006). Induction of Genes for Metabolism and Transport by trans-Stilbene Oxide in Livers of Sprague-Dawley and Wistar-Kyoto Rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(7), 1190–1197.

Smoliga, J. M., Baur, J. A., & Hausenblas, H. A. (2011). Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(8), 1129–1141.

Szkudelska, K., & Szkudelski, T. (2010). Resveratrol, obesity and diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 635(1-3), 1–8.

Tolson, A. H., & Wang, H. (2010). Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Advanced drug delivery reviews*, 62(13), 1238–1249.

Tsai, H.-Y., Ho, C.-T., & Chen, Y.-K. (2017). Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 134–147.

Tzamelis, I., Pissios, P., Schuetz, E. G., & Moore, D. D. (2000). The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Molecular and cellular biology*, 20(9), 2951–2958.

Wang, Y. M., Ong, S. S., Chai, S. C., & Chen, T. (2012). Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 8(7), 803-17.

Yan, J., Chen, B., Lu, J., & Xie, W. (2014). Deciphering the roles of the constitutive androstane receptor in energy metabolism. *Acta pharmacologica Sinica*, 36(1), 62-70.

Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Rogi T, Taieishi N, et al. (2011). Polyphenols in alcoholic beverages activating constitutive androstane receptor CAR. *Biosci Biotechnol Biochem*;75:1635 – 7. 142.

Internetové zdroje:

HepG2 cells [internet], [citováno: 2019, 03, 18]. Dostupné z: <http://www.hepg2.com/>

Kameníčková, A. Gene reporter assay [internet]. Olomouc: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2012 [citováno: 2018, 04, 27]. Dostupné z: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=219&t=0>

Firemní literatura:

Invitrogen, Lipofectamine™ 3000 Reagent Protocol, 2016, firemní manuál, dostupný na: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/lipofectamine3000_protocol.pdf

Promega Technical Manual No. 040 revised, Dual-Luciferase® Reporter Assay System, 2015, firemní manuál, dostupný z:

<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf>