Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

Studium vlivu přírodních ligandů na estrogenní receptor a potvrzení jejich účinků v buněčných kulturách

Study of the influence of natural drugs on estrogen receptor and confirmation of their effect in cell cultures

Diplomová práce

Jana Elbelová

Hradec Králové 2022 Vedoucí práce: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, že jsem řádně citovala všechny použité prameny a literaturu a že práce nebyla využita v rámci jiného vysokoškolského studia či k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 10. května 2022

Jana Elbelová

Tímto bych chtěla poděkovat PharmDr. Alejandro Carazovi, PhD. za jeho podporu, odborné rady a vstřícnost, jak během experimentální práce v laboratoři, tak během vypracovávání a konzultací diplomové práce. Dále má poděkování směřují k dalším akademikům z Katedry farmakologie a toxikologie za rady a milý přístup. Děkuji také své rodině a přátelům, kteří mi během celého studia byli oporou.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Jana Elbelová

Školitel: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium vlivu přírodních ligandů na estrogenní receptor a potvrzení jejich účinků v buněčných kulturách

Estrogeny jsou jedním z hlavních ženských pohlavních hormonů. Jejich působení v organismu je zprostředkováno estrogenním receptorem (ER). Mezi fyziologické procesy, které ovlivňují, patří reprodukce, metabolismus kosti a kardiovaskulární funkce. Jejich dlouhodobě zvýšené hladiny však mohou vést k rozvoji karcinomu prsu.

Fytoestrogeny jsou přírodními ligandy estrogenního receptoru, ve velké míře přítomné ve stravě. Díky jejich estrogenním vlastnostem mohou být přínosné v terapii menopauzálních příznaků, mají schopnost se chovat ale také jako antiestrogenní látky. Navíc mohou být důležitými hráči při vzniku jiných onemocnění (např. karcinomu prsu). Proto je možné zvažovat jejich využití v terapii onemocnění estrogenního původu.

V rámci diplomové práce bylo vybráno šest látek, dva známé fytoestrogeny a čtyři z jejich nejvýznamnějších metabolitů (genistein, daidzein, S-equol, O-desmethylangolensin, 2- (R, S)-2-(4-hydroxyfenyl) propionová kyselina, 4-ethylfenol), u kterých bylo následně studováno ovlivnění genové exprese pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Zároveň byla stanovována cytotoxicita těchto látek. Použity byly MCF7/S0.5 buňky přirozeně exprimující ER a jejich fulvestrantový derivát MCF7/182R-6.

Toxicita byla testována na různých koncentracích fytoestrogenů. Nejtoxičtější látkou byl v obou buněčných liniích S-equol v koncentraci 100 μM, pro který viabilita dosahovala 50 % a snižovala se s koncentrací. Ostatní látky v testovaných koncentracích neprokázaly významnou toxicitu. Výsledky genové exprese ukazují vysokou celkovou expresi vybraných cílových genů ER (TFF1 a ESR1), ale současně rozdílnost v závislosti na koncentraci i typu buněčné linie. Všeobecně, v linii MCF7/S0.5 byly hodnoty vyšší pro všechny otestované látky. Nejvyšší estrogenní aktivitu prokázal daidzein, a proto byl vybrán pro doplňující experimenty. Výsledky demonstrují, že aktivace ER je závislá na koncentraci. Celkově výsledky ukazují, že jsou vybrané fytoestrogeny silnými

estrogenními ligandy. Naznačují ale, že jejich účinky mohou být zprostředkovány jinak než jen přímou interakcí s receptorem.

Abstract:

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Jana Elbelová

Supervisor: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Study of the influence of natural drugs on estrogen receptor and confirmation of their influence in cell culture

Estrogens are one of the main reproductive hormones in women. Their function in the human organism is mediated by the estrogen receptor (ER). Estrogens are involved in important physiological processes such as reproduction, bone metabolism and cardiovascular function. Long term elevated levels of these hormones may also lead to breast cancer development.

Phytoestrogens are natural ligands of estrogen receptor widely found in dietary products. These compounds have beneficial properties in treatment of menopausal symptoms thank to their estrogenic activities but are able to function as antiestrogenic agents too. In addition, they may play a role in the development of other illnesses (breast cancer etc.). Therefore, they can be considered as a potential pharmacological tool for the treatment of estrogen-related conditions.

Within this master thesis, a total of six compounds, two phytoestrogens and four of their more relevant metabolites, were chosen (genistein, daidzein, S-equol, O-desmethylangolensin, 2- (R, S)-2-(4-hydroxyfenyl) propionic acid, 4-ethylphenol) and their interaction with estrogen receptor was studied by polymerase chain reaction (PCR). Cytotoxicity of the compounds was also stablished. For these purposes, we used ER expressing cell lines MCF7/S0.5 and their fulvestrant resistant derivates MCF7/182R-6.

Toxicity was tested at different concentrations. The highest toxicity was presented by S-equol in both cell lines at concentration 100 μM, which reached 50 % viability and was decreasing at lower concentrations. The remaining drugs did not report significant toxicity at all. Genetic expression results show an overall high expression of estrogen receptor target genes (TFF1 and ESR1), but at the same time differences according to concentration and cell line type. In general, results were higher in MCF7/S0.5 cell line for all phytoestrogens tested. The highest estrogenic activity was observed for daidzein, and for that reason it was chosen for further experimentation. Results show that ER fold

activation is concentration dependent. The results here presented confirm the strong estrogenic activity of the compounds. However, they indicate that the activation can be exerted also through indirect interaction with the receptor.

OBSAH

1 ÚVOD 1

2 TEORETICKÁ ČÁST 2

2.1 NUKLEÁRNÍ RECEPTORY 2

2.2 ESTROGENNÍ RECEPTOR 3

2.2.1 Mechanismy estrogenní signalizace 5

2.2.2 Estrogen 8

2.2.3 Funkce estrogenu 10

2.2.4 Ligandy estrogenního receptoru 11

2.3 FUNKCE ER 12

2.3.1 Nádory prsu 12

2.3.2 Ostatní funkce 17

2.4 FYTOESTROGENY 17

2.4.1 Genistein 19

2.4.2 Daidzein 20

2.4.3 S-Equol 21

2.4.4 4-ethylfenol 21

2.4.5 2- (R, S) -2-(4-hydroxyfenyl) propionová kyselina 22

2.4.6 O-desmethylangolensin 22

3 CÍL PRÁCE 24

4 PRAKTICKÁ ČÁST 25

4.1 POUŽITÝ MATERIÁL A POMŮCKY 25

4.1.1 Buněčné kultury 25

4.1.2 Testované látky a jejich roztoky 25

4.2 METODICKÝ POSTUP 26

4.2.1 Buněčná kultivace 26

4.2.2 Pasážování 26

4.2.3 Testování cytotoxicity 28

4.2.4 Nasazení plat na RT-PCR 29

4.2.5 Izolace RNA 30
4.2.6 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT – qPCR) 31
5 VÝSLEDKY 35
6 DISKUSE 42
7 ZÁVĚR 47
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 48
ZDROJE 50

1 Úvod

Estrogeny jsou základními pohlavními hormony žen. Jejich působení v lidském organismu je esenciální pro reprodukci, kardiovaskulární systém i metabolismus. Tyto účinky jsou zprostředkovány stimulací estrogenního receptoru. Estrogenní receptor patří do skupiny nukleárních receptorů fungujících jako ligandem aktivované transkripční faktory. Estrogeny, jakožto endogenní ligandy, estrogenní receptor aktivují a vedou ke spuštění transkripčních kaskád v buňce. Rozlišujeme dva základní typy estrogenního receptoru, α a β, které se liší zastoupením v jednotlivých tkáních organismu i strukturálními obměnami. Nedávným objevem je estrogenní receptor GPER1 (G Protein-Coupled Estrogen Receptor), který umožňuje rychlou odpověď organismu na estrogen. Kromě fyziologického fungování svou roli estrogen hrají také u hormonálně dependentních nádorů.

Karcinom prsu je celosvětově jedním z nejčastějších nádorových onemocnění. V České republice se jedná o nejrozšířenější nádorové onemocnění žen. Jednou z příčin je nadměrná estrogenní stimulace v buňkách exprimujících ER, u kterých dochází k rozvoji nádorového bujení. ER slouží navíc také jako indikátor progrese onemocnění a případné rekurence. Jelikož se jedná o hormonálně dependentní nádor, využíváme v terapii i látky ovlivňující estrogenní receptor nebo syntézu estrogenu.

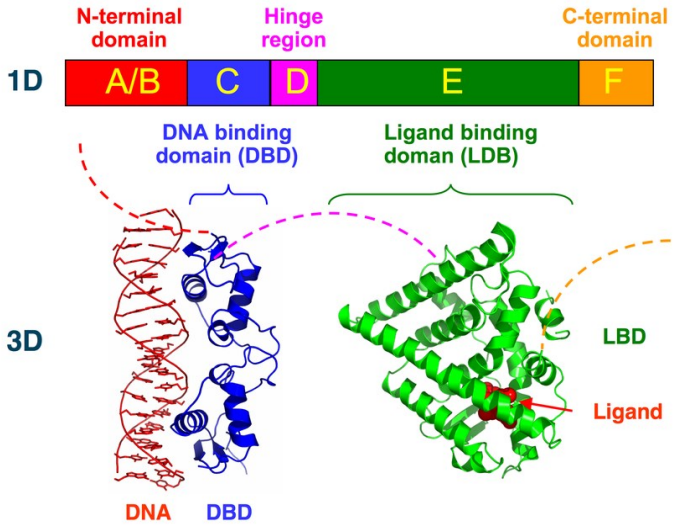
Fytoestrogeny jsou přírodními ligandy estrogenního receptoru. Jedná se o nesteroidní polyfenolické látky s přímým estrogenním působením. Jsou obsaženy v řady rostlin, významným zdrojem příjmu v potravě jsou luštěniny, zejména sója, dále ořechy a listová zelenina. Studie ukazují, že pravidelná konzumace vede ke snížení menopauzálních obtíží a poklesu incidence karcinomu prsu. Otázka možného využití fytoestrogenů v terapii karcinomu prsu je proto velmi aktuální.

V této práce bylo studováno šest vybraných fytoestrogenů (genistein, daidzein, S-equol, O-desmethylangolensin, 2- (R, S)-2-(4-hydroxyfenyl) propionová kyselina, 4-ethylfenol) a míra jakou ovlivňují genovou expresi estrogen responsivních genů v buněčných liniích MCF7/S0.5 a MCF7/182R-6. K tomuto zjištění byla využita metoda RT-qPCR, kdy byla sledována míra násobné aktivace jednotlivých genů v porovnání s estradiolem. Zároveň bylo stanoveno cytotoxické působení daných fytoestrogenů ve dvou buněčných subliniích nádorové linie MCF7.

2 Teoretická část

2.1 Nukleární receptory

Nukleární receptory (NR) jsou skupinou ligandem aktivovaných transkripčních faktorů schopných regulovat míru exprese cílových genů. Ačkoli má většina z nich známé ligandy (ER, AR, PR), existují také tzv. sirotčí nukleární receptory, které postrádají známý endogenní ligand a jsou regulovány například posttranslačními modifikacemi (např. COUP-TFII). Další skupinu tvoří receptory, které byly původně popsány jako sirotčí, ale postupně byly objeveny endogenní ligandy (např. CAR nebo PXR). Všechny NR mají velice podobnou strukturu. Tato struktura se skládá z šesti domén, z nichž každá hraje konkrétní roli ve fungování receptoru (obr. 1). A/B doména je svou strukturou značně variabilní. Obsahuje AF-1 oblast (aktivátor function-1 region), která interaguje s koregulačními proteiny po navázání ligandu. Pomocí alternativního splicingu zde dochází ke vzniku řady izoforem, a je také místem posttranslačních modifikací. Naopak DNA binding doména (DBD) je z pohledu struktury nejvíce konzervativní oblastí a je skoro totožná u všech zástupců NR superrodiny. Skládá se ze dvou dílčích domén, každá obsahující čtyři cysteinová rezidua, sloužících k formaci typické zinc finger peptidické smyčky. Následuje hinge region neboli pant doména, spojující DBD a ligand binding doménu, je nejvíce proměnlivou oblastí. Ligand binding doména (LBD) se skládá zpravidla z jedenácti α-helixů a čtyř β-vláken složených do tří paralelních vrstev, které tvoří α-helikální sandwich. Ten dále formuje hydrofobní ligand binding kapsu receptoru. Na karboxylovém konci se nachází C – terminální doména. Podílí se na dimerizaci receptoru, ovlivňuje transkripční aktivitu a stabilitu receptoru. (Weikum et al, 2018; Robinson-Rechavi et al., 2003; Huang et al., 2010).



Obrázek 1: Generální struktura nuklerárních receptorů.
Zdroj: https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor

Superrodina NR se dělí dle chemické struktury ligandu, který vážou s nejvyšší afinitou. Jednou z podskupin nukleárních receptorů jsou tzv. steroidní receptory. Jako ligandy zde figurují hormony syntetizované z cholesterolu, například estradiol či kortizol. Řadíme zde androgenní receptor (AR, NR3C4), progesteronový receptor (PR, NR3C3), glukokortikoidový receptor (GR, NR3C1), mineralokortikoidový receptor (MR, NR3C2) a estrogenní receptor (ER, NR3A), jemuž budou věnovány následující kapitoly (Weikum et al, 2018).

2.2 Estrogenní receptor

ER (NR3A) jakožto NR patří mezi jaderné transkripční faktory, které se podílí na řadě buněčných procesů a biologických funkcí jako je metabolismus či reprodukce. Jeho hlavním endogenním ligandem je estradiol, primární pohlavní hormon žen ve fertilním věku. Zásadní roli tedy hraje v menstruačním a ovulačním cyklu. Dále působí v tkáních citlivých k hormonální stimulaci. Příkladem je metabolismus adipocytů, kdy můžeme u menopauzálních žen s poklesem estrogenní stimulace pozorovat nárust hmotnosti. Ovlivňuje také denzitu kostní hmoty a kardiovaskulární funkce (Zhou et al., 2020; Deroo et al., 2006). ER je lokalizován zpravidla v cytoplazmě buňky, odkud po navázání ligandu putuje do jádra, najdeme jej ale i v plazmatické membráně (Gururaj et al., 2006). ER hraje roli v rozvoji a progresi nádoru prsu, a je zároveň klíčovým cílem jeho léčby (Yasar, 2016; Paakinaho, 2021). Kromě samotného stanovení přítomnosti ER je vhodné se zaměřit také

na míru exprese, což je důležitý prediktivní faktor vážnosti onemocnění. Studie ze sedmdesátých let minulého století naznačují přímou korelaci mezi hladinou exprese ER a odpovědí na endokrinní terapii (Byar et al., 1979; Yoon et al., 2021).

V lidském organismu rozlišujeme několik druhů estrogenních receptorů, ERα (NR3A1) a ERβ (NR3A2). ERα byl objeven v roce 1958 v laboratoři Dr. Jensena na Univerzitě Chicago, který také o několik let později vysvětlil základní mechanismus jeho působení (Fuentes et al., 2019; O´Malley et al., 2012). Druhý z receptorů ERβ byl objeven až v roce 1995 (Nilsson et al., 2001). V důsledku alternativního splicingu na posledním kódujícím exonu rozeznáváme několik izoforem ER. Jedinou plně funkční izoformou je ERβ1, jelikož ERβ2-5 nemají vlastní aktivitu v podobě homodimeru. Mohou nicméně tvořit heterodimery s ERβ1 (Leung et al., 2006). Receptory se liší, mimo jiné, přítomností v jednotlivých tkáních organismu. ERα převažuje v tkáni dělohy, prsu, hypofýzy, kosterním svalu a tukové tkáni, zatímco ERβ je typický po vaječníky, prostatu, plíce, kardiovaskulární a centrální nervový systém (Yasar, 2016; Böttner et al., 2013).

Odlišnosti nalezneme také ve strukturální charakteristice těchto proteinů. Stejně jako jiné receptory ze skupiny hormonálně dependentních jaderných receptorů se ER skládají z šesti funkčních domén. Aminoterminální doména A/B je charakteristická variabilitou mezi ER, shodná je méně než pětina její struktury. Součástí A/B domény ERα je AF-1 oblast, jejíž rolí je interakce s karboxylovým koncem proteinu. ERβ naproti tomu AF-1 oblast neobsahuje. Na aminoterminální doménu navazuje DBD, jejíž rolí je vazba ER na DNA sekvenci specifickou pro ER – tzv. estrogen responsivní element (ERE). Následně dochází k ovlivnění genové exprese. Struktura DBD je v případě ER na obou izoformách téměř totožná. Hinge region obsahuje nuclear localisation signal (NLS), který se podílí na translokaci komplexu receptor-ligand do jádra buňky. LBD je mezi receptory α a β velice podobná. Zaujímá, tak jako i u ostatních NR, tvar třívrstvé antiparalelní α-helikální obálky. K vazbě ligandu dochází pomocí hydrofobních reziduí. V případě C-terminální domény je shoda aminokyselin mezi receptory jen 18 %. Zatímco ERα ovlivňuje homodimerizaci a stabilitu receptoru, funkce domény u ERβ je nejasná (Fuentes, 2019; Yasar, 2016; Huang et al., 2005).

ERα je složen z celkem 595 aminokyselin, kratší ERβ jen z 530 aminokyselin. Hlavním rozdílem je odlišná délka aminoterminální domény těchto receptorů (Fuentes, 2019). ERα je kódován genem ESR1 na chromozomu 6, který se skládá z devíti exonů a sedmi intronů, a zaujímá velikost více než 300 kilobáze (kb). ERβ je analogicky kódován

genem ESR2 nacházejícím se však na odlišném chromozomu, a to 14 (Rusidzé, 2021; Böttner et al., 2014; Enmark et al., 1997). Novějším objevem estrogenního receptoru je tzv. G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER1) neboli membránový estrogenní receptor, který byl objeven teprve v roce 2007. Svou roli hraje v procesu tzv. rychlé odpovědi na estrogen v membráně buňky, na rozdíl od ERα a ERβ (Fuentes, 2019). Oproti těmto dvěma variantám se totiž nejedná o transkripční faktor, ale membránový protein. Nemůže tedy přímo regulovat genovou expresi. Má nicméně schopnost ovlivňovat genovou expresi nepřímo, a to aktivací proteinů, které mění aktivitu transkripčních faktorů (Romano et al., 2018).

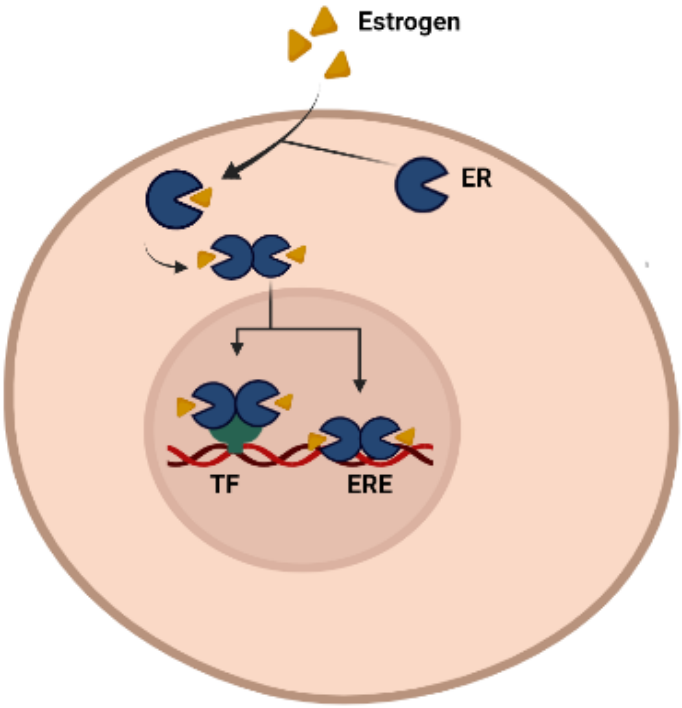
2.2.1 Mechanismy estrogenní signalizace

Rozlišujeme dva základní mechanismy estrogenní signalizace, a to přímou a nepřímou genomickou signalizaci. Estrogen, jakožto hydrofobní molekula, prostupuje plazmatickou membránou a váže se na intracelulární ERα nebo ERβ. Alternativně je také možná interakce přes receptor GPER1.

Přímá interakce je procesem, ve kterém ER potřebuje přítomnost ligandu, aby mohl regulovat genovou expresi (obr. 2). Prvním krokem je vazba agonisty na receptor v cytoplazmě buňky, čímž dochází ke konformačním změnám a homodimerizaci receptoru. Typickým příkladem je interakce s estrogenem, který je nejaktivnějším endogenním ligandem (Farzaneh et al., 2015). Vzniklý komplex je dále translokován pomocí NLS domény do jádra, kde dochází k vazbě na chromatin ERE. K translokaci do jádra a vazbě na DNA jsou potřebné sekundární složky, tzv. koregulátory. Modifikací cílových genů chromatinu mohou ovlivnit transkripční aktivitu receptoru pozitivně, tzv. koaktivátory i negativně, tzv. korepresory. Volba koregulátoru závisí na druhu ligandu, agonisté vážou koaktivátory zatímco antagonisté korepresory. Koregulátory také často vykazují enzymatickou aktivitu jako je například acetylace či metylace. Koaktivátory mají aktivitu vnitřní histon acetyl transferázy (HATs), naopak korepresory ovlivňují histon deacetylázu (HDACs), která působí uzavření konformace chromatinu a tím znemožnění genové transkripce (Manavathi et al., 2014).

ERE je definován jako DNA palindromová sekvence, na kterou se ER váže specificky pomocí DBD. V důsledku této interakce dochází k transkripci cílových ER genů a následně ovlivnění buněčného cyklu, replikace DNA, diferenciace buněk, apoptózy a angiogeneze (Fuentes, 2019). Opačný děj nastává v případě interakce ER s antagonistou,

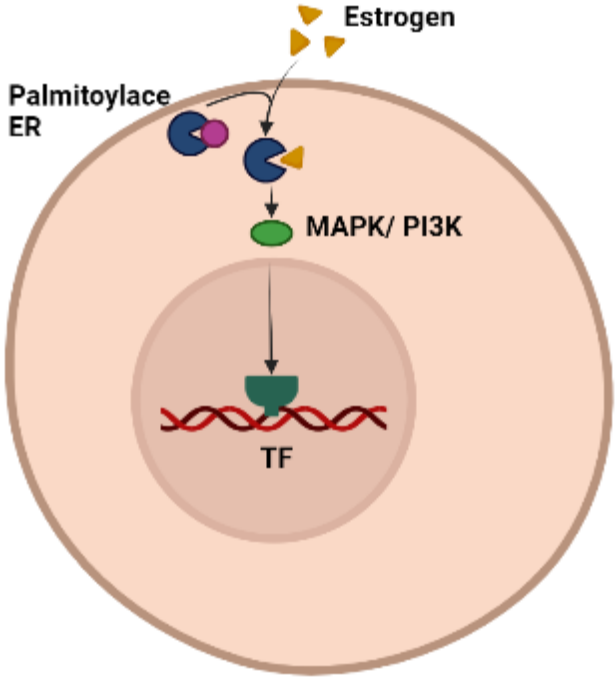
jako je například fulvestrant, který je používán v paliativní léčbě estrogen responsivních nádorů prsu u postmenopauzálních žen. Jeho navázání znemožní vazbu endogenního estrogenu a dále vede k útlumu dimerizace ER a jeho přesunu do jádra buňky. Zároveň je kompletně přerušena transkripce estrogen sensitivních genů (Jones, 2002). Nicméně až 25% estrogen regulačních genů postrádá kompletní sekvenci ERE. Další možností je tedy vazba na DNA prostřednictvím jiných transkripčních faktorů jako je Stimulační protein SP1 nebo jun/c-fos proteiny, které umožňují tvorbu dimeru s následnou vazbou na Aktivační protein AP1 a jaderný faktor NF-κβ (Rusidzé, 2021).



Obrázek 2: Schéma genomické signalizace ER. Estrogen interaguje s ER, dochází k homodimerizaci a následně k vazbě na DNA pomocí transkripčního faktoru, nebo k přímé vazbě na ERE. Vytvořeno pomocí BioRender.com

Dalším možným procesem vedoucím k aktivaci ER je takzvaná nongenomická interakce s receptorem (obr. 3). Tento proces na ERE nezávislé signalizace je poměrně složitý, zároveň je ale velmi perspektivní z hlediska rozvoje nových možností terapie nádorových onemocnění. V klidovém stavu, tedy stavu bez hormonální stimulace, je LBD ER palmitoylována (Thiebaut et al., 2021). Při stimulaci estradiolem dochází k aktivaci dvou základních signalizačních cest Src/MAPK a PI3K/Akt, které vedou k buněčné proliferaci (Fuentes, 2019). Svou roli v tomto procesu hrají také růstové faktory, jako jsou

IGF-1, EGF či TGFα, které mohou aktivovat tyrosin kinázu a tím zahájit transkripční kaskádu (Rusidzé, 2021).



Obrázek 3: Schéma nongenomické signalizace ER. ER je v klidovém stavu palmitoylován. Interakcí s estrogenem dochází k depalmitoylaci a spuštění signalizační kaskády MAPK/ PI3K, což způsobí ovlivnění trasnkripce. Vytvořeno pomocí BioRender.com

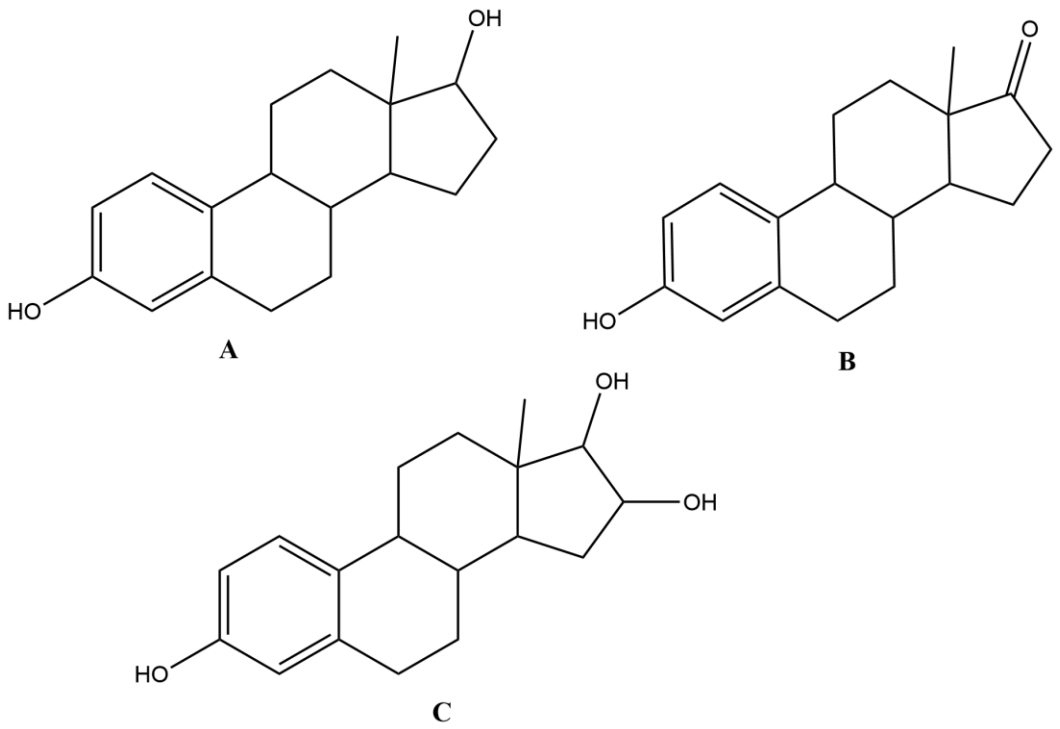
V současné době se prohlubuje výzkum v oblasti nongenomické signalizace ER u nádorů prsu, který může přinést nové perspektivy v rozvoji jejich léčby (Thiebaut et al., 2021). Jelikož se ERα nachází převážně v jádře, stejně jako u buněk nenádorových rozlišujeme dvě základní cesty ovlivnění buněčné proliferace a přežití, a to cesty Src/MAPK a PI3K/Akt. Je zde řada možností ovlivnění signalizace nádorovou buňkou. První z nich je fosforylace proapoptického proteinu BAD (BCL-2 antagonist of cell death) pomocí Akt kaskády, což vede k jeho inaktivaci a uvolnění antiapoptických proteinů Bcl-2 a Bcl-XL (Thiebaut et al., 2021). Vlivem tohoto mechanismu brání estrogenní stimulace apoptóze a buněčné smrti nádorových buněk. Další možností je narušení mechanismu oprav DNA v buňkách, kdy dochází k Akt – dependentní fosforylaci Topoisomeráza II binding proteinu 1 (TopBP1), následně jsou inhibovány checkpointy buněčného cyklu a zpožďují se opravy DNA. V plazmatické membráně může ERα interagovat s histon deacetylázou 6 (HDAC6). To vede k rychlé deacetylaci tubulinu, migraci buněk a zvýšení

jejich agresivity. Interakce ERα/HDAC6 má pravděpodobně také podíl na rozvoji rezistence k paklitaxelu (Thiebaut et al., 2021). Klíčovou roli v procesu tvorby komplexu ERα/Src/PI3K hraje argininmethyltransferáza 1 (PRMT1). Metylace ERα je totiž nezbytná pro interakci se Src a podjednotkou p85 PI3K. Prostřednictvím receptoru IGF-1R může metylaci spouštět také IGF-1. Komplex ERα/Src/PI3K se běžně vyskytuje ve zdravé prsní tkáni, je ale zároveň vysoce exprimován u nádorů prsu. Vysoký level exprese komplexu je považován za marker chabé prognózy, kdy méně pacientů dosáhne remise onemocnění (Thiebaut et al., 2021).

ERβ interaguje rovněž mechanismem nongenomické signalizace, nicméně stále nebyla vyjasněna jeho pozice případného onkosupresoru či onkogenu. Roli zde hraje pravděpodobně jak typ nádorového onemocnění, tak isoforma ERβ, kterých rozlišujeme pět (ERβ 1-5). Zvýšenou hladinu ERβ můžeme pozorovat například u karcinomu prostaty, kdy je typická pro kostní metastázy a koreluje se špatnou prognózou úzdravy pacienta (Thiebaut et al., 2021).

2.2.2 Estrogen

ER, jak již bylo řečeno, patří mezi hormonálně dependentní receptory. Hormonem, který jej ovlivňuje, je především estrogen, ale může interagovat i s dalšími látkami (např. diethylstilbestrol, tamoxifen či ethynylestradiol). Estrogeny jsou látky steroidní povahy s typickým cyklopentanovým skeletem vznikají z cholesterolu (obr. 4). Jsou tedy hydrofobní povahy, díky čemuž dobře prostupují membránami a jsou tak schopné ovlivňovat mimo jiné jaderné receptory. Základním místem syntézy estrogenů jsou vaječníky, tvoří se ale také v tkáni nadledvin, kosti, mozku či tukové tkáni vlivem enzymu aromatázy, který zajišťuje přeměnu z androstendionu a testosteronu. Estrogeny jakožto základní ženské pohlavní hormony jsou přítomny ale i v mužské populaci. Přibližně 20% denní produkce estrogenů u mužů zajišťují Leydigovy a Sertoliho buňky ve varlatech, zbytek vzniká aromatizací androgenů (Sayed, 2003). Do skupiny estrogenů řadíme tři základní přirozeně se vyskytující estrogeny – 17β-estradiol (E2), estron a estriol.



Obrázek 4: Struktura endogenních estrogenů: A – 17β-estradiol, B - estron, C – estriol. Na obrázku vidíme strukturní vzorce endogenních estrogenů s typickým steroidním skeletem.

Estriol (E3) je hlavním estrogenem v těhotenství, kdy je syntetizován v syncytiotrofoblastu aromatizací 16α-hydroxyandrostendionu. V pozdějších stádiích těhotenství je produkován také fetální tkání nadledvin z 16α-hydroxyepiandrosteronu. Estriol je krátkodobě působícím estrogenem s nižší afinitou k ER. Během těhotenství reguluje prokrvení dělohy a placenty, a zabraňuje endometriální proliferaci. Je také využíván jako marker zdraví plodu, kdy z krve nebo moči matky provádíme biochemický screening (Falah et al., 2015). Ve fertilním věku je primárním estrogenem 17β-estradiol. Zvýšená produkce E2 zahajuje u dívek pubertu, kdy dochází k více než dvojnásobnému zvýšení sérových hladin E2. Sérová koncentrace E2 závisí také na fázi menstruačního cyklu, nejvyšších hladin dosahuje v preovulační fázi a nejnižších naopak v období před menstruací. K poklesu produkce E2 dochází v perimenopauzálním období vlivem deplece ovariálních folikul. Sérové hladiny v tuto dobu značně kolísají. V postmenopauzálním období je převládajícím estrogenem estron, většina estradiolu tvořena extragonadální konverzí testosteronu (Gruber, 2002; Nelson, 2001; Huang, 2011; Levin, 2005).

2.2.3 Funkce estrogenu

Estrogen hraje klíčovou roli v řadě fyziologických procesů jako je rozvoj sekundárních pohlavních znaků žen, regulace sekrece gonadotropinu během ovulace, denzita kostní hmoty, syntéza lipoproteinů, koagulace a syntéza kolagenu, kardiovaskulární funkce, imunita, funkce v CNS. Má vliv také na růst, prokrvení a retenci vody v sexuálních orgánech. V tkáni prsu dochází vlivem estrogenní stimulace k růstu a diferenciaci epitelu terminálního duktu, rozvoji mitotické aktivity, růstu pojivové tkáně a ovlivnění mikrocirkulace. Hustota estrogenních receptorů v prsní tkáni se liší v závislosti na fázi menstruačního cyklu, kdy nejvyšších hladin dosahuje ve folikulární fázi. Estrogen ovšem stimuluje růst také nádorových buněk karcinomu prsu, kdy u postmenopauzálních pacientek můžeme pozorovat zvýšené hladiny estradiolu v důsledku in situ aromatizace, a to i přes nízké sérové koncentrace estradiolu (Gruber, 2002; Nelson, 2001).

2.2.3.1 Imunita

Estrogeny ovlivňují jak vrozenou, tak získanou imunitní odpověď. Pro T lymfocyty je typická poměrně vysoká exprese ERα, zatímco B lymfocyty exprimují vyšší hladiny ERβ. Expresi obou subtypů ER vykazují také NK buňky. Estrogeny působí supresivně na T lymfocyty, zatímco produkci protilátek B lymfocyty zvyšují. Kromě celkového inhibičního efektu na T lymfocyty pozorujeme rozdílnosti v ovlivnění T_H – lymfocytů. Estrogen inhibuje produkci T_{H1} cytokinů (IL-12, TNF-α, IFN-γ), ale stimuluje produkci T_{H2} cytokinů (IL-10, IL-4, TGF-β), které zajišťují protilátkovou odpověď (Yakimchuk et al., 2013; Salem, 2004). ER je exprimován také v myeloidní buněčné linii. U monocytů převažuje exprese ERβ, makrofágy exprimují naopak více ERα. Estrogen ovlivňuje základní procesy myeloidních buněk, jako je jejich zrání, diferenciace a migrace, zlepšuje také schopnost fagocytózy neutrofilů (Yakimchuk et al., 2013). Rozdílná hormonální stimulace mužů a žen přináší rozdíly imunitních odpovědí, kdy muži častěji trpí infekcemi, zatímco u žen je vyšší prevalence autoimunitních onemocnění (Pennel et al., 2011). Estrogenní modulace imunitního systému je patrná také v epidemiologických datech infekce Covid-19, podle kterých mají ženy lehčí průběh onemocnění a méně častěji na infekci umírají (Mateus et al., 2021).

2.2.3.2 Metabolický syndrom

S příchodem menopauzy dochází u žen k výraznému poklesu hladin estrogenu. Jedním z důsledků je rozvoj metabolického syndromu, který v sobě zahrnuje inzulinovou

rezistenci, dyslipidémii, arteriální hypertenzi a abdominální obezitu. Vyrovnanost energetického příjmu a výdeje je primárně ovlivněna ERα. Chuť k jídlu a příjem potravy jsou regulovány také centrálním nervovým systémem, a to zejména hypothalamem, který exprimuje ERα i ERβ. Insulinové sensitivity je dosaženo při fyziologických koncentracích estradiolu, a to u obou pohlaví. K rozvoji rezistence tedy dochází při suprafyziologických hladinách estradiolu nebo zvýšené stimulaci ER. V tkáních regulujících glukózu je ve vyšší míře zastoupen ERα (Hevener et al., 2015).

2.2.3.3 Kosterní svaly

Kosterní svaly zaujímají 30-40 % celkové hmotnosti člověka, a jsou tak největší tkání lidského těla. Kromě androgenu a testosteronu se na jejich homeostáze podílí také estrogeny. Studie ukazují inhibiční vliv estrogenu na svalovou atrofii způsobenou imobilizací. Estrogen přispívá k regeneraci svalu po jeho přetížení či zranění (Ikeda et al., 2019). Bylo také popsáno, že fyzická aktivita a cvičení zvyšuje expresi ER ve svalu (Wiik et al., 2005).

2.2.4 Ligandy estrogenního receptoru

Kromě fyziologických hormonů, estradiolu, estronu a estriolu, může jako ligand ER působit řada organických i anorganických látek. Jejich společnou vlastností je schopnost rozpoznat LBD receptoru. Většina látek je selektivnější k ERα (Farooq, 2015; Farzaneh et al., 2015).

Látky přírodního původu působící na ER nazýváme fytoestrogeny. Jedná se o polyfenolické sloučeniny strukturálně podobné estrogenům. Podrobněji budou zmíněny v podkapitole 2.4.

Do skupiny látek synteticky vytvořených patří řada sloučenin. Některé z nich byly vyvinuty přímo se záměrem estrogenní aktivity. Příkladem je ethynylestradiol využívaný jako estrogenní složka hormonálních kontraceptiv a hormonální substituční léčby. Dalším zástupcem je diethylstilbestrol, který byl v minulosti předepisován jako prevence komplikací během těhotenství. U něj však bylo dokázáno teratogenní a karcinogenní působení (Strohsnitter et al., 2021; Farooq, 2015).

Metalloestrogeny jsou anorganické látky ze skupiny těžkých kovů, například hliník (Al^{3+}), barium (Ba^{2+}), kadmium (Cd^{2+}), rtuť (Hg^{2+}). V důsledku kontaminace životního

prostředí – vody, potravy, kosmetiky, dochází k jejich kumulaci v organismu, což je spojeno s častějším výskytem nádorů prsu (Farooq, 2015).

Terapeuticky důležitou skupinou jsou tzv. SERMs (selective estrogen receptor modulators), kteří v některých tkáních napodobují endogenní estrogeny a v jiných působí opačně. Příkladem je tamoxifen, který v prsní tkáni působí antagonisticky, ale je agonistou například v endometriu. Využití nachází v léčbě nádorů prsu. Nevýhodou je ovšem stimulace proliferace endometria a případný rozvoj kancerogeneze. Látkou se zcela antiestrogenním působením je fulvestrant patřící do skupiny SERDs (selective estrogen receptor degraders). Svým navázáním na ER zabraňuje dimerizaci receptoru, čímž blokuje spuštění signalizačních kaskád. Je podáván pacientům s tamoxifen-rezistentními nádory (Patel et al., 2017).

2.3 Funkce ER

Stimulací ER dochází k ovlivnění genové transkripce řady genů. Díky tomuto mechanismu působí na širokou škálu pochodů v organismu. Patří mezi ně nádory prsu, prostaty a endometria, kardiovaskulární funkce a s nimi spojený metabolický syndrom, imunita, kosterní svaly (Deroo et al., 2006).

2.3.1 Nádory prsu

Nádory prsu patří k nejrozšířenějším nádorovým onemocněním žen. V roce 2020 bylo celosvětově diagnostikováno 2,3 milionu žen a 685 tisíc žen v důsledku toho onemocnění zemřelo (WHO, 19.1.2021 [online]). V České republice se jedná o druhý nejčastější nádor žen, rozšířenější jsou jen nemelanomové nádory kůže (Zdravotnická ročenka České republiky 2019, 19.1.2022 [online]). U žen je výskyt tohoto nádoru stokrát častější, nicméně u mužů je spojen v důsledku pozdní diagnostiky s horší prognózou. Zaujímají bohužel také i přední příčky z hlediska úmrtí na nádorová onemocnění, kdy u pacientů s rakovinou představuje druhou nejčastější příčinu úmrtí. Jedná se o skupinu histologicky rozdílných tumorů lokalizovaných v epiteliální tkáni prsu, a to nejčastěji v mléčných žlázách a lobulech. Nejrozšířenějšími typy jsou lobulární karcinom postihující lalůčky mléčné žlázy, duktální karcinom, který je nejčastějším typem neinvazivního nádoru prsu, a infiltrovaný duktální karcinom. Ten je charakteristický penetrací z duktů mléčné žlázy do tukové tkáně a případně i metastázemi v dalších částí těla. Až 80 % diagnostikovaných karcinomů prsu je právě tohoto typu (Sharma et al., 2010, Comsa et al., 2015).

Karcinom prsu je onemocněním heterogenním. Roli zde hrají hormonální změny, životní styl, životní prostřední, genetická predispozice a rodinná anamnéza nádorových onemocnění. Jako marker tohoto onemocnění se používá studium exprese genů BRCA1 a BRCA2, které by měly jakožto tumor supresory zprostředkovávat opravy zlomů DNA. Jejich mutací dochází k chybám v translaci a tvorbě defektních proteinů. V případě zdědění této mutace zřetelně zvyšují riziko nádoru nejen prsu ale i vaječníků během života odhadem o 40 až 85 % (Sharma et al., 2010; Kolářová, 2017). K rozvoji onemocnění dochází již v mladém věku, u ovariálního karcinomu je medián věku v době diagnózy 47 let pro BRCA1 a 57 let pro BRCA2 (Kolářová, 2017).

2.3.1.1 Terapie nádorů prsu

Stejně jako u jiných nádorových onemocnění se využívají tří základní terapeutické postupy – chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie.

Jelikož se jedná o nepříliš radiosensitivní nádor, bývá radioterapie u karcinomu prsu využívána jako přídavná terapie před a po operaci. Její využití vede ke zmenšení primárního nádoru a ke snížení vzniku lokoregionálních recidiv. V případě paliativní terapie ozařujeme metastázy ve snaze ulevit bolestem pacienta (Abrahámová, 2002).

Paleta chemoterapeutik využitelných v terapii karcinomu prsu čítá více než čtyřicet látek s různými mechanismy účinku. Ze skupiny antimetabolitů je nejvíce využíván metotrexát, raltitrexed a pemetrexed. Důležitý je také analog pirimidinů 5-fluorouracil. Alkylační látky poškozují DNA nádorových buněk, nejrozšířenější z nich je cyklofosfamid. Mechanismus vmezeření se do dvoušroubovice DNA využívají interkalační látky. U karcinomu prsu je nejpoužívanější doxorubicin, epirubicin a mitoxantron. Jako mitotické jedy můžeme uplatnit vinka alkaloidy vinblastin, vinkristin, vinorelbin a taxany paklitaxel a docetaxel. Skupina inhibitorů topoizomeráz není v této indikaci příliš využívána. Účinnost monoterapie se pohybuje v rozmezí 20 až 65 %, proto se zpravidla využívá kombinační léčba (Abrahámová, 2002; Petráková, 2009; Hassan et al., 2010).

Jelikož se jedná o hormonálně dependentní nádor, je zde také možnost využití hormonální léčby. Využíváme ji v závislosti na míře exprese hormonálních receptorů na povrchu nádorových buněk. Odpovídá na ni přibližně třetina pacientek (Abrahámová, 2002). Na základě mechanismu účinku rozlišujeme čtyři skupiny látek. První z nich jsou SERMs, tedy selektivní modulátory estrogenního receptoru, které se v tkáni prsu chovají jako antiestrogeny. Vazbou na LBD způsobují konformační změny, které zabraňují vazbě

koaktivátorů a následně i transkripci. Nejdůležitějším zástupcem této skupiny je tamoxifen. Podobným mechanismem působí SERDs neboli selektivní downregulátory estrogenního receptoru. Na rozdíl od SERMs však blokují estrogenní aktivitu zcela ve všech tkáních. Nejrozšířenější zástupce fulvestrant má až stokrát silnější afinitu k ER než tamoxifen. Třetí skupinu tvoří inhibitory aromatázy – enzymu, který zajišťuje přeměnu estrogenů z androgenů. Využívá se převážně druhá generace zástupců, a to anastrozol, letrozol a exemestan. V terapii můžeme využít také agonisty LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone), jehož stimulací dochází k downregulaci jeho vlastní produkce, a tím tedy k snížení produkce estrogenu vaječníky, což zajišťuje právě luteinizační hormon. Látkami z této skupiny jsou goserelin, buserelin, leuprorelin a triptorelin (Abdulkareem et al., 2012).

Terapeutické chirurgické výkony jsou voleny dle stupně a lokalizace nádoru. Snahou je provést úkon co nejšetrnější, krajní možností je tzv. radikální mastektomie, tedy úplná amputace prsu (Abrahámová, 2002; Sharma, 2010; Waks, 2019).

2.3.1.2 Biomarkery nádoru prsu

Karcinom prsu je možné diagnostikovat kombinací několika postupů. Základem je zjištění rodinné i osobní anamnézy, dále fyzikální vyšetření pohledem a pohmatem. Využíváme i zobrazovacích metod, a to mamografie, ultrasonografie, magnetické rezonance, počítačové tomografie a pozitronové emisní tomografie. Hematologická vyšetření mapují krevní koagulaci a celkový stav krvetvorby (Prausová, 2010). Kromě histologických nálezů určujících velikost a stupeň nádorového bujení užíváme pro stanovení prognózy a strategie terapie různé markery, které také slouží jako indikátory molekulární subtypu nádoru.

ER je využíván od poloviny sedmdesátých let minulého století jako indikátor k predikci odpovědi na léčiva a potenciální ukazatel brzké rekurence nádoru (Dai et al., 2016). Hlavním stimulem pro růst ER pozitivních (ER+) nádorů je estradiol. Buňky ER+ nádorů jsou zpravidla dobře diferenciované, méně agresivní a výsledky operací bývají optimističtější oproti ER negativním (ER-). Až 80 % nádorů prsu je ER+, a přibližně 60 % z těchto nádorů je také PR+ (Dai,2016). V pozdějších letech bylo pozorováno, že pacienti s vyšší expresí ER mívají při léčbě tamoxifenem nižší riziko rekurence nádoru. Kromě míry exprese ER můžeme sledovat také amplifikaci genu ESR1. Zvýšení amplifikací neboli počtu kopií genu je hlavním mechanismem, kterým nádorové buňky zesilují

genovou expresi a zajišťují tak svůj růst a přežití (Holst et al., 2007). Zprvu bylo naznačováno, že amplifikace genu ESR1 může být detekována přibližně u 20 % všech invazivních nádorů. Byla zaznamenána také korelace mezi amplifikací genu a mírou exprese ER. Jiné výzkumné skupiny nicméně ukázaly, že genovou amplifikaci vykazuje méně než 3 % invazivních nádorů (Weigel et al., 2010).

Progesteronový receptor je z hlediska exprese silně závislý na ER, kdy pouze 0,2 až 10 % nádorů jsou PR pozitivní (PR+) a současně ER-. Tito pacienti nicméně také profitují z endokrinní terapie. Opačným případem je nízká exprese PR u ER+ nádoru. Zde naopak můžeme pozorovat zvýšenou signalizaci růstového faktoru a v důsledku toho častěji rezistenci k tamoxifenu. Nejčastějším typem je s prevalencí okolo 60 % nádorů prsu je tzv. dvojitě pozitivní ER+PR+, který častěji postihuje pacienty vyššího věku. Nádor bývá zpravidla menšího rozsahu i stupně, je zde i nižší mortalita. Nádory dvojitě negativní ER-PR- jsou asociovány s častější rekurencí, nižší celkovou úzdravou a nemožností využití endokrinní terapie (Weigel et al, 2010, Dai et al., 2015).

Dalším důležitým biomarkerem je onkogen HER2, který je využíván jako indikátor prognózy pacienta. Jeho zvýšená exprese může značit zvýšenou pravděpodobnost relapsů a vyšší úmrtnost pacientů. Bývá detekována až u 15 % primárních karcinomů prsu, až z 55 % je zároveň ER-PR-, a v případě pozitivního nálezu je vhodné zvážit anti-HER2 terapii monoklonální protilátkou trastuzumab, která na tento gen přímo cílí (Weigel et al., 2010). Kromě terapie trastuzumabem byl u HER2 pozitivních nádorů doložen také benefit adjuvantní chemoterapie založené na doxorubicinu a také podávání paklitaxelu po čtyřech cyklech doxorubicinu společně s cyklofosfamidem (Weigel et al., 2010). HER2 pozitivita bývá také často spojena s relativní, ne však absolutní rezistencí k endokrinní terapii, což rovněž odpovídá inverznímu vztahu HER2 s ER/PR. Na základě současných znalostí můžeme tedy označit ER+PR+HER2- nádory jako ty s nejlepší prognózou a odpovědí na hormonální terapii, naopak ER-PR-HER2+ a ER-PR-HER2- jsou kvůli špatné diferenciaci a agresivnímu chování v organismu ty, u nichž je šance na úzdravu nejnižší. (Weigel et al, 2010, Dai et al., 2015).

Kromě tří výše zmíněných základních biomarkerů můžeme pro hodnocení nádoru využít také adrenergní receptor, který je exprimován přibližně u 90 % ER pozitivních a 55 % ER negativních nádorů prsu. Jeho role se zdá být podobná jako u onkogenu HER2 (Dai et al., 2015). Androgeny primárně stimulují nádorové bujení prostatické tkáně, nicméně působí i na nádorové buňky karcinomu prsu. Exprese AR dle studií koreluje

s menší velikostí tumoru a nižší mírou lymfatických metastáz. Na základě těchto výsledků se přepokládá inhibiční efekt AR na růst nádorové tkáně, a tedy jeho protektivní působení. Vysoká míra exprese AR je typická pro postmenopauzální pacientky, jelikož hladiny estrogenu v tomto období klesají na úroveň hladin estrogenu u mužů, zatímco hladina androgenů zůstává nezměněna. Pro terapii AR pozitivních nádorů se zdá být výhodná terapie inhibitory aromatázy, kdy dochází k potlačení estrogenního působení a zároveň k stimulaci AR (Ogawa et al., 2008).

2.3.1.3 Buněčné linie nádorů prsu

Pro výzkum nádorů je esenciální práce na molekulární úrovni buněčných linií. Jako první buněčná linie rakoviny prsu byla v roce 1958 popsána linie BT-20 pocházející z pleurálního výpotku sedmdesáti čtyřleté pacientky s duktálním karcinomem prsu. Izolaci provedli E. Y. Lasfargues a L. Ozzello (Lasfargues et al., 1958). Od té doby bylo definováno přibližně sto dalších linií (Lacroix et al., 2004). Tyto buněčné linie můžeme rozlišovat na základě exprese ER, PR a HER2. Linie exprimující ER a/ nebo PR jsou charakteristické větší diferenciací a menší migrací do okolních tkání. HER2 pozitivní linie jsou oproti ER+PR+ liniím agresivnější. Specifickým případem jsou tzv. triple negativní linie, spojené s velmi nízkou nebo žádnou expresí ER, PR a HER2. (Dai, 2017).

Buněčná linie MCF-7 patří mezi nejčastěji využívané linie ke studiu nádoru prsu. Svůj název získala zkratkou instituce, která tyto buňky izolovala – Michigan Cancer Foundation. Izolace byla provedena v roce 1973 z pleurálního výpotku šedesáti devítileté ženy s nádorem prsu v metastatickém stádiu. Již v roce 1975 byl demonstrován inhibiční účinek tamoxifenu a stimulace růstu estrogenem, což potvrdilo ER+ subtyp této linie. Mezi základní charakteristiky linie patří nízký stupeň agresivity, neinvazivnost a nízký metastatický potenciál. Ačkoli by se mohlo zdát, že se jedná o celistvou buněčnou linii, nalezneme zde řadu fenotypů, které se liší expresí genů, receptorů, i zastoupením signalizačních cest (Lee et al., 2015; Comsa et al., 2015). Takovéto rozmanitosti MCF7 sublinií bylo dosaženo in vito studiemi probíhajícími na příklad za nedostatku estrogenu. Takto byla vyčleněna skupina long-term estrogen-deprivated (LTED) buněk. Estrogenní nedostatek vede ke zpomalení růstu buněk. Pro tuto linii je typická vysoká exprese hladin ER a hypersensitivita k estrogenní stimulaci. Dalším z příkladů je tamoxifen rezistentní linie buněk, která je využívána pro výzkum estrogenní rezistence. Těchto vlastností bylo dosaženo dlouhodobou expozicí vysokým dávkám tohoto SERM. Analogickým postupem

byla získána také fulvestrant rezistentní linie, kdy byly buňky dlouhodobě vystaveny tomuto antiestrogenu. (Lee et al., 2015).

Z molekulárního hlediska se MCF-7 vyznačují vysokými hladinami ERα a nízkou expresí ERβ. V původních liniích je exprese ER nižší oproti tamoxifen rezistentním podliniím, naopak je u nich silná exprese PR. Zvýšenou expresi ER můžeme pozorovat také při estrogenní deprivaci (Comsa et al., 2015). Vlivem působení estradiolu dochází k růstu nádorových buněk. Za odlišnosti v růstu ovšem nezodpovídá odlišná exprese ER, ale sekrece autokrinního faktoru aktivujícího receptor insulinu podobného růstového faktoru typu I (IGF-IR). Dalšími receptory ovlivňujícími růst buněk nádoru prsu jsou plazmatické receptory membránou asociovaných růstových faktorů. Do této skupiny patří například epidermální růstový faktor (EGF) a receptor-2 lidského epidermálního růstového faktoru (HER-2) (Comsa et al., 2015).

2.3.2 Ostatní funkce

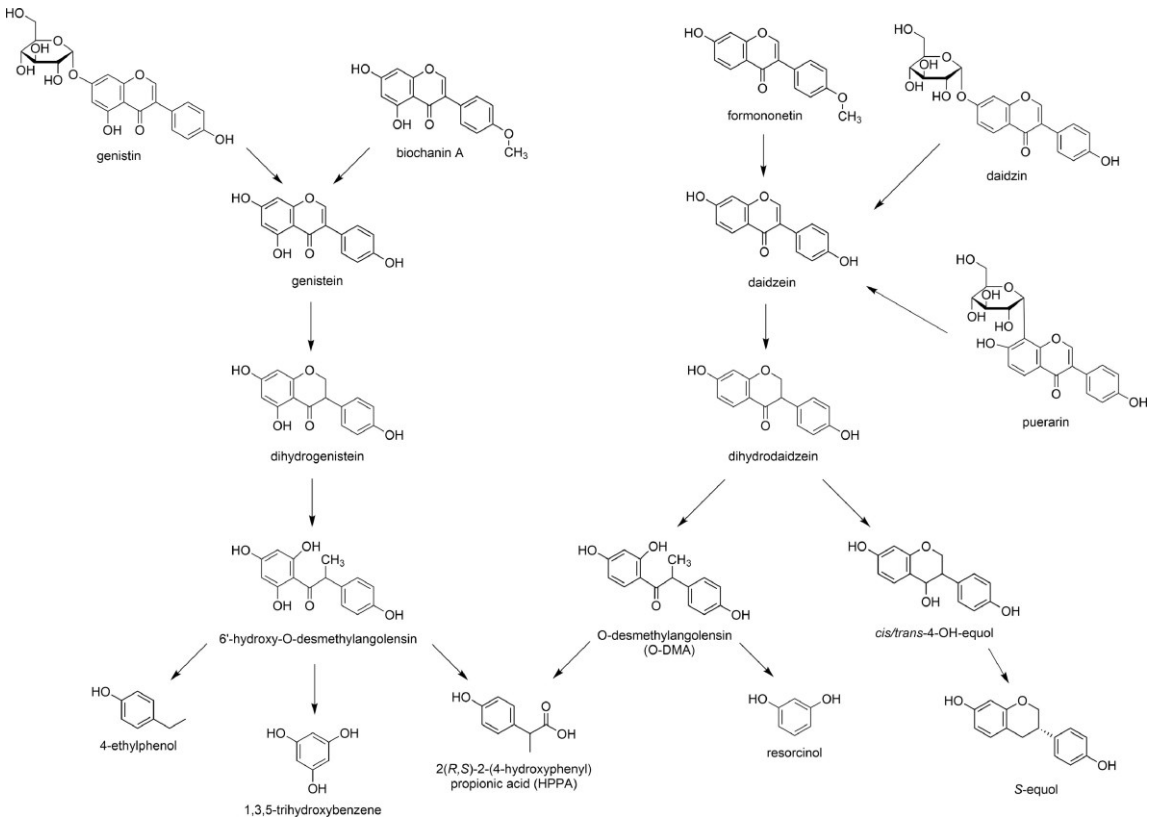
Mezi další procesy, na kterých se ER podílí, patří neurodegenerativní onemocnění, kdy byl popsán neuroprotektivní efekt estrogenu na Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu a cévní mozkovou příhodu. ER se nachází také v kostní tkáni. Vlivem estrogenní stimulace je regulována resorpce kostní hmoty osteoklasty, což brání rozvoji osteoporózy. V tukové tkáni potlačuje estrogen aktivitu lipoprotein lipázy (LPL). V důsledku toho dochází ke snížení štěpení triglyceridů na volné mastné kyseliny a jejich ukládání do adipocytů. Jedná se tedy o prevenci obezity (Deroo et al., 2006).

2.4 Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou rozmanitou skupinou látek přírodního původu, která se vyznačuje estrogenní aktivitou. Vyskytují se zejména v luštěninách čeledi *Fabaceae*, tedy například sója, fazole či hrášek, dalšími dietními zdroji mohou být ořechy, čaj a káva. Ze zeleniny je na obsah fytoestrogenů bohatá brokolice, zelí, listová zelenina, z ovoce pak lesní plody (Kleijn et al., 2001). Důležitým společným prvkem v chemické struktuře těchto látek je fenolická funkční skupina, díky níž jsou schopné tvořit vodíkové vazby s aminokyselinami argininem (Arg), histidinem (His) a glutamátem (Glu) ligand binding domény ER (Cho et al., 2021). Fytoestrogeny jsou perspektivní skupinou látek z důvodu řady zdravotních benefitů v terapii menopauzálních příznaků a prevenci hormonálně dependentních nádorů včetně nádoru prsu. Jejich aktivita spočívá zejména ve schopnosti přímé interakce s ER. Kromě toho působí také nonestrogenně, a to inhibici tyrosinkinázy,

buněčného cyklu, DNA topoizomerázy, angiogeneze a antioxidačních mechanismů. Dále také ovlivňují hladiny steroid hormone binding globulinu (SHBG), rozrušují estrogenní metabolismus a působí změny hladin ER (Matsumura et al., 2004). Dokladem těchto účinků fytoestrogenů mohou být data, podle kterých je prevalence nádoru prsu vyšší u žen v Evropě a Severní Americe než u žen v Asii. Stejně tak pozorujeme vyšší incidenci u Asiatek, které žijí na těchto kontinentech a nikoli v Asii. Jedním z rozdílů, který byl pozorován, je míra konzumace potravy bohaté na fytoestrogeny, zejména sóji a sójových produktů. Zatímco u tradiční asijské stravy je průměrná konzumace sójového proteinu v rozmezí 20-30 gramů denně, což odpovídá 100 mg isoflavonoidů, v západních zemích je to méně než jeden gram sójového proteinu denně (Kumar et al., 2021). Do skupiny fytoestrogenů řadí většina autorů čtyři podskupiny – isoflavony, kumestany, lignany a stilbeny. V této práci se budeme dále věnovat skupině isoflavonoidů.

Isoflavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě C-β-D- nebo O-β-D-glykosidů, jejichž aglykony se vyznačují schopností vazby na ERα i ERβ. Afinita k ERβ bývá u některých isoflavonoidů, například equolu, silnější než k ERα (Hod et al., 2021). Z chemického hlediska se jedná o 3-aryl-4H-chromen-4-ony, které vznikají z flavanonů strukturální změnou arylu a následnou dehydrogenací. Nejběžnějšími isoflavonoidy v přírodě jsou daidzein a genistein (Dias et al., 2021; Fokialakis et al., 2019). Kromě nich bude v této práci věnována pozornost také derivátům daidzeinu a genisteinu (S-equolu, 4-ethylfenolu, 2- (R, S)-2-(4-hydroxyfenyl)propionové kyselině a o-desmethylangolensinu) (obr. 5). Jejich hladiny v organismu se mohou u jednotlivců lišit a rozdílné díky tomu může být i jejich estrogenní působení.

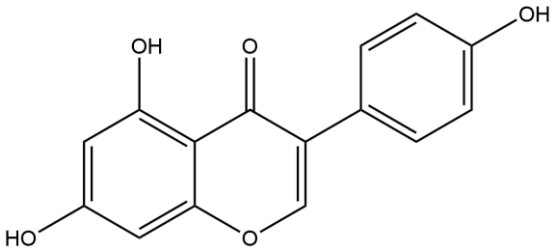


Obr. 5: Schéma metabolismu fytoestrogenů v gastrointestinálním traktu (Migkos et al., 2019).

2.4.1 Genistein

Genistein, chemickým názvem 4´,5,7-trihydroxyisoflavon, je společně s daidzeinem a glyciteinem jedním ze tří základních isoflavonoidů obsažených v sójových bobech (*Glycine max, Fabaceae*). Dalšími rostlinami, které jej obsahují, jsou například vlčí bob (*Lupinus perennis, Fabaceae*) nebo bob obecný (*Vicia faba, Fabaceae*) (Kaufman et al., 1997). Genistein má schopnost inhibovat v nádorové tkáni některé DNA replikační enzymy. Patří mezi ně DNA topoizomerázy I a II, matrix metalloproteinu (MMP9) a tyrosin kináza (McCarty, 2004). Tyrosin kináza je protein katalyzující fosforylaci vlastních tyrosinových reziduí i reziduí jiných proteinů, včetně růstových faktorů zapojených v proliferaci nádorových buněk. Inhibicí tyrosin kinázy dochází v organismu k řadě dějů. V nádorové tkáni nádorů prsu a prostaty tak dochází ke zpomalení tumorgeneze. V mozku má inhibice tyrosin kinázy neuroprotektivní účinek, jelikož fosforegulace tyrosin kinázy v mozkové tkáni fyziologicky ovlivňuje odpověď na neurodegeneraci, neuronální poranění a synaptickou aktivitu. Inhibicí tyrosin kinázy dochází rovněž ke zlepšení kardiovaskulárních funkcí a zabránění vaskularizace nádorů. Mezi další z účinků genisteinu patří snižování expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF),

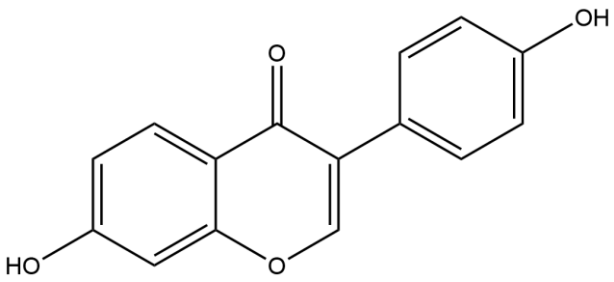
dobré antioxidační účinky a protizánětlivé působení (Patisaul et al., 2010). Genistein působí agonisticky jak na ERα, tak na ERβ, afinita k ERβ je ovšem mnohonásobně větší (8,4 nM pro ERα a 145 nM pro ERβ). Je tedy schopen aktivovat transkripci pomocí ERβ při nižších koncentracích než pomocí ERα (McCarty, 2004).



Obrázek 6: Strukturní vzorec genisteinu

2.4.2 Daidzein

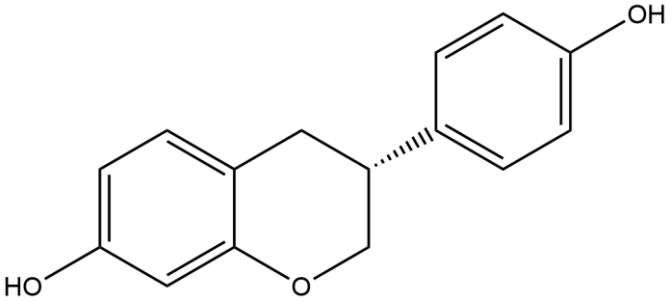
Stejně jako genistein i daidzein řadíme mezi základní isoflavonoidy sóji luštinaté. Obsahují jej i další rostliny čeledi *Fabaceae*, například puerarie laločnatá neboli kudzu (*Pueraria lobata*) (Kaufman et al., 1997; Ahn et al., 2019). Studie na této molekule potvrdily její schopnost inhibice růstu nádorů pankreatu, střeva, vaječníků a prsu (Alshehri et al., 2021; Kumar et al., 2021). Mechanismy toho působení zahrnují zvýšení exprese proapoptického faktoru Bax a současný pokles exprese antiapoptického faktoru Bcl-2. V důsledku těchto dějů také dochází k ovlivnění oxidačního stresu, kdy je vlivem vzplanutí volných radikálů uvolněn cytochrom C, který mění permeabilitu mitochondriální membrány (Kumar et al., 2021). Daidzein působí také snížení nežádoucích projevů menopauzy jako je osteoporóza, kdy zabraňuje snížení kostní denzity, redukuje návaly horka, bolesti svalů a šlach, únavu a psychické projevy jako deprese a úzkost. Další z oblastí jeho působení jsou kardiovaskulární onemocnění, kdy daidzein vykazuje kardioprotektivní vlastnosti snížením agregace destiček. Redukuje také hladiny triglyceridů a kyseliny močové (Alshehri et al., 2021). Stravitelnost daidzeinu v ileu dosahuje pouze okolo 32 %. Zbylých 68 % daidzeinu tedy prostupuje do tlustého střeva, odkud je následně vyloučen stolicí. Z celkového množství daidzeinu ve střevní hmotě je 62 % přítomných jako metabolit daidzeinu – equol. Equol je také nejvíce zastoupenou složkou daidzeinu exkretovanou do stolice (Poulsen et al., 2009).



Obrázek 7: Strukturní vzorec daidzeinu

2.4.3 S-Equol

Objev isoflavonoidu equolu datujeme do roku 1932, kdy byl izolován z moči březí klisny. Výskyt byl potvrzen také u ovcí, slepic a psů. Equol, chemickým názvem 3-(4-hydroxyfenyl) -3,4dihydro-2H-1-benzopyran-7-ol, je metabolitem daidzeinu vznikajících činností střevní mikroflóry. Odlišnosti střevní mikroflóry mezi jedinci v populaci ovšem vedou k variabilnímu zastoupení equolu, k jeho konverzi dochází pouze u 30-50% populace, a tudíž i k nekonzistentním výsledkům studií jeho působení v populaci. Jedná se o chirální molekulu, což umožňuje výskyt dvou enantiomerů R-equolu a S-equolu. S-equol vzniká *in vivo* jako produkt střevní mikroflóry, zatímco R-equol je tvořen synteticky. Z tohoto důvodu jsme se v této práci zaměřili pouze na S-equol. Kromě výzkumu v oblasti prevence nádorů můžeme pozorovat také výsledky v terapii menopauzálních potíží, kdy značně snižuje návaly horka a úbytek kostní hmoty (Hod et al., 2021).

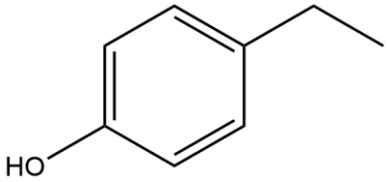


Obrázek 8: Strukturní vzorec S-Equolu

2.4.4 4-ethylfenol

4-ethylfenol je bioaktivní látkou vznikající štěpením flavonoidního kruhu genisteinu pomocí enzymů střevní mikroflóry. Z celkového množství genisteinu a jeho produktů v terminálním ileu však zaujímá pouze 3 %. Většina dietního genisteinu totiž zůstává v terminálním ileu trávicího traktu v nemetabolizované formě. V reprodukční tkáni skotu bylo zjištěno, že 4-ethylfenol stimuluje produkci prostaglandinu F2α (Poulsen

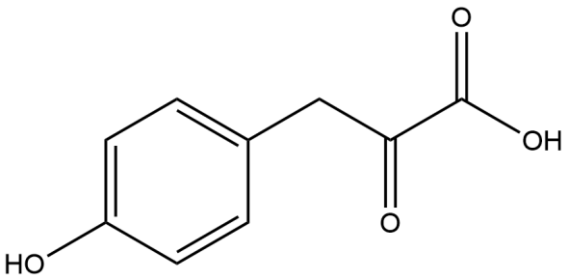
et al., 2009). Není známo, zda je tento efekt vlivem estrogenní aktivity, nicméně byla potvrzena inhibice stimulačního efektu estrogenním antagonistou. Jelikož ale prostaglandiny patří mezi významné mediátory zánětu, mohou zde být důležité fyziologické důsledky u zánětlivých onemocnění (Poulsen et. al, 2009).



Obrázek 9: Strukturní vzorec 4-ethylfenolu

2.4.5 2- (R, S) -2-(4-hydroxyfenyl) propionová kyselina

2-(4-hydroxyfenyl) propionová kyselina (HPPA) patří mezi méně známé isoflavonoidy. Vzniká intestinální přeměnou daidzeinu na O-desmethylangolensin a jeho další metabolizací právě na HPPA, kromě ní vzniká také resorcinol. Další možností je také degradace genisteinu přes 6´-hydroxy-O-desmethylangolensin. Na rozdíl od genisteinu, daidzeinu, 4-ethylfenolu i O-DMA nemá HPPA antiagregační vliv. Spolu s ostatními isoflavonoidy ji ale můžeme považovat za slabého chelátora mědi, ovšem méně aktivního než O-DMA. Patří také mezi nejaktivnější přímé vychytávače volných radikálů, stejně jako O-DMA (Migkos et al., 2019).

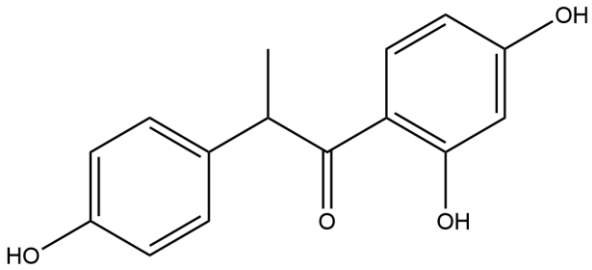


Obrázek 10: Strukturní vzorec HPPA

2.4.6 O-desmethylangolensin

O-DMA je stejně jako equol produktem metabolismu daidzeinu vznikajícím přeměnou intestinální mikroflórou. Strukturálním rozdílem je ale rozštěpení jednoho z kruhů, a tudíž ztráta difenolického uspořádání podobného 17β-estradiolu. Vyskytuje se ve formě monoglukuronidované, diglukuronidované, sulfatované nebo jako samotný aglykon. Některé studie naznačují další částečné štěpení na resorcinol a 2-(4-hydroxyfenyl) propionovou kyselinu. O-DMA ovlivňuje řadu mechanismů jako například růst buněk, vazba a transaktivace estrogenního, androgenního a progesteronového receptoru, formace

osteoklastů, vazba a transaktivace PPARγ, vychytávání volných radikálů či inhibice sekrece leptinu (Frankenfeld, 2011).



Obrázek 11: Strukturní vzorec O-DMA

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit míru genové exprese estrogen resposivních genů zvolených fytoestrogenů v MCF7 buněčné linii a v jejím derivátu rezistentním na fulvestrant. Stanoven byl také cytotoxický vliv na tyto buňky.

4 Praktická část

4.1 Použitý materiál a pomůcky

4.1.1 Buněčné kultury

Diplomová práce byla prováděna na dvou buněčných subtypech buněčné linie MCF7. Jedná se o epiteliální buňky izolované z lidské prsní tkáně.

Jako první byla ve výzkumu použita linie MCF7/S0.5, která je variantou přizpůsobenou na nízkou přítomnost séra. Od základní linie MCF7 byla odvozena postupnou redukcí sérové koncentrace fetálního bovinního séra v růstovém médiu z 10 % na 1 % koncentraci. MCF7 exprimuje jak ER, tak PR. Jako kultivační médium se pro tuto linii používá Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) a Ham´s F-12 médium v poměru 1:1, bez použití indikátoru červeného fenolu od firmy Gibco (Waltham, MA, USA). Médium bylo dále obohaceno o 2mM glutamin, 1 % antibiotikum (penicilin/streptomycin) a insulin v koncentraci 6ng/ml.

Druhou použitou subkulturou MCF7 je fulvestrant rezistentní linie MCF7/182R-6. Byla vytvořena z klonu buněk MCF7/S0.5 přeživších dlouhodobý růst v nepřetržité přítomnosti fulvestrantu – steroidního antiestrogenu v koncentraci 100 nM. Rezistence je zachována i při následném snížení stimulace nebo při krátkodobé absenci fulvestrantu. MCF7/182R-6 exprimují pouze ER, nikoli PR. Dochází také ke zvýšené expresi EGFR, proteinu ovlivňujícího signalizační cesty kontroly buněčného dělení a růstu. Kultivační médium má stejné složení jako u MCF7/S0.5, ale oproti MCF7/S0.5 je obohaceno navíc o fulvestrant v koncentraci 100 nM pro zachování rezistence.

Obě buněčné sublinie byly pořízeny z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) sídlící ve Velké Británii.

4.1.2 Testované látky a jejich roztoky

V rámci této práce bylo testováno celkem šest přírodních fytoestrogenů – genistein, daidzein, S-equol, 4-ethylfenol, O-desmethylangolensin a 2- (R, S) -2-(4-hydroxyfenyl) propionová kyselina. Všechny látky byly zakoupeny v sypké podobě od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Byly vytvořeny 30 mM zásobní roztoky těchto látek v DMSO.

4.2 Metodický postup

4.2.1 Buněčná kultivace

Buněčné kultury jsou dlouhodobě uchovávány v prostředí kapalného dusíku, což zajišťuje jejich trvanlivost. Kompletní kultivační médium je doplněno o 10 % DMSO jako kryogenní prvek. Při práci s buňkami je třeba dodržovat co nejsterilnější prostředí, proto všechny kroky popsané v této metodice budou probíhat v laminárním boxu, pokud nebude specifikováno jinak (centrifugace atd.) Před samotným zahájením kultivace je tedy potřeba buňky rozmrazit. Zkumavku se zmrazenými buňkami přesuneme do vodní lázně nahřáté na teplotu 37 °C a když zbývají již jen malé zmražené kousky, buňky přesuneme do sterilního prostředí v laminárního boxu. Přidáme vhodné kultivační médium o teplotě 37 °C a směs resuspendujeme. Následně směs centrifugujeme 5 minut za teploty 20 °C při 200 otáčkách a poté odstraníme supernatant. Do pelletu s buňkami přidáme cca 10 ml kompletního kultivačního média, resuspendujeme a buňky přesuneme do kultivační lahvičky. Pokud je třeba, doplníme o další médium. Takto nasazené buňky přesuneme do inkubátoru, který buňkám poskytuje vhodné podmínky k růstu – teplota 37 °C, atmosféra 5 % CO_2 a relativní vlhkost atmosféry kolem 90 %. Po 48 hodinách nasazené lahvičky kontrolujeme pohledem proti světlu a mikroskopicky. Zároveň také vyměníme kultivační médium, které předem nahřejeme na teplotu 37 °C. Z kultivačních lahviček odsajeme zbytkové médium a pomocí sterilní pipety doplníme nové. Poté buňky opět umístíme do inkubátoru. Po dosažení konfluence cca 80 %, tedy přibližně týdnu, jsou připraveny k pasážování a po cca 4-5 pasážích jsou buňky nachystané k nasazení k pokusům.

4.2.2 Pasážování

Pasážování buněk je procesem, při kterém dochází k uvolnění buněk od povrchu kultivační lahvičky i od sebe navzájem. Provádíme jej v okamžiku, kdy jsou buňky ze 70-80 % konfluentní, tzn. pokrývají 70-80 % kultivačního povrchu. Pokud bychom pasážování v tomto stádiu neprovedli, došlo by k inhibice dělení buněk, jelikož by pak neměly dostatek prostoru k růstu. Před zahájením samotného pasážování si nejprve ve vodní lázni nahřejeme kultivační médium, trypsin a PBS pufr (fosfátový pufr) na teplotu 37 °C.

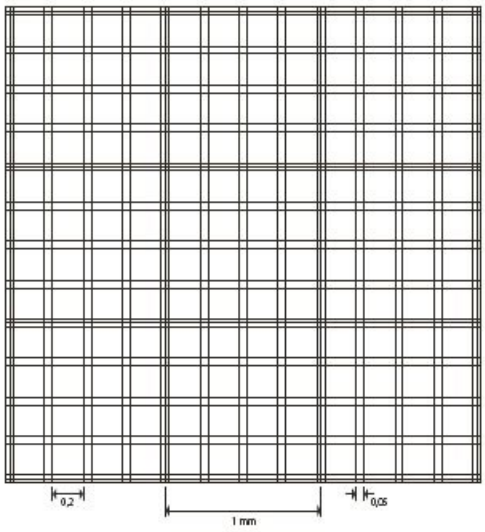
Po nachystání a nahřátí všech prostředků odsajeme zbytkové médium, poté buňky promyjeme 2 ml PBS, díky čemuž dojde k odstranění pozůstatků proteinů a mrtvých buněk. Pufr odsajeme a přidáme 1-2 ml trypsinu, který rozprostřeme rovnoměrně po dnu

kultivační lahve. Jedná se o proteázový enzym, kterým jsou natráveny bílkovinné adhezní molekuly, díky čemuž dojde k oddělení buněk a jejich odštěpení ze dna kultivační lahvičky. Lahvičku s trypsinem umístíme na přibližně 5 minut do inkubátoru. Poté obsah lahviček suspendujeme a v mikroskopu zkontrolujeme rozdělení buněk. K neutralizaci enzymu se přidává kultivační médium 1:1. Celý obsah kultivační lahvičky přeneseme do připravené 50 ml falkonky a přidáme přibližně 8 ml média. Směs pipetou suspendujeme.

Pro další práci s buňkami a jejich nasazení na plata je potřeba zjistit jejich počet. K počítání buněk využíváme Bürkerovu komůrku, kterou si předem očistíme a překryjeme krycím sklíčkem (obr. 13). Následně aplikujeme 10 µl suspenze do obou částí komůrky tak, aby se dobře rozptýlila po celém povrchu. Buňky počítáme ve čtyřech čtvercích v horní a dolní části komůrky. Pomocí vzorce uvedeného níže vypočítáme počet buněk v 1 ml suspenze (obr. 12). Buňky nasadíme v potřebném počtu do mikrodestiček k experimentaci a část pipetujeme do nové kultivační lahvičky k pokračování kultivace. Na závěr buňky opět zkontrolujeme pod mikroskopem a přemístíme do inkubátoru.

$$x = \frac{a \times 1000}{n \times V}$$

Obrázek 12: Vzorec pro výpočet počtu buněk v 1 ml, kdy X= počet buněk v 1 ml, a= stanovený počet buněk, n= počet počítaných čtverců, V= objem počítaného útvaru

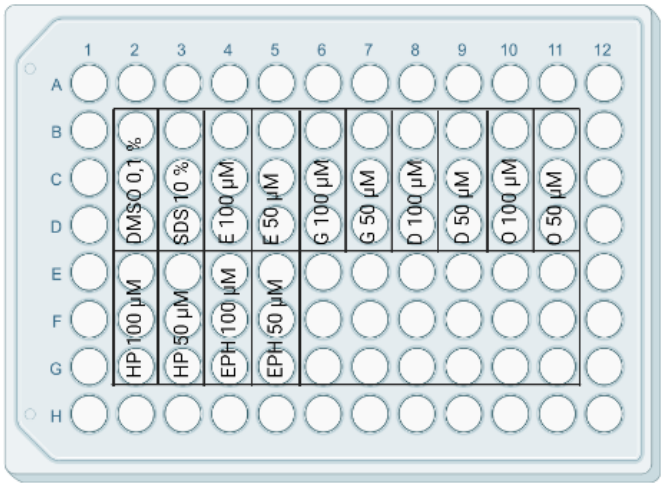


Obrázek 13: Schéma Bürkerovy komůrky. Každý ze čtverců mřížky se skládá z šestnácti čtverců, z nichž ve čtyřech počítáme množství buněk.
Zdroj: www.thermofisher.com

4.2.3 Testování cytotoxicity

Prvním z cílů této práce bylo stanovení cytotoxicity vybraných fytoestrogenů. K tomuto účelu byly použity buněčné linie MCF7/S0.5 a MCF7/182R-6. Po spočítání počtu buněk jsme nasadili 80 000 buněk na jamičku v 96jamkové mikrotitrační destičce. Takto přichystaná plata jsme nechali v inkubátoru kultivovat 48 hodin.

Po 48 hodinách jsme plata zkontrolovali pod mikroskopem k vyloučení kontaminace a zjištění, že jsou buňky dobře rozmístěné po celé jamičce. Poté jsme si připravili roztoky látek. Jako pozitivní kontrola byl využit 0,1 % dimethylsulfoxid (DMSO). Negativní kontrolu představoval roztok detergentu sodium dodecyl sulfát 10 % (SDS), který působí denaturaci buněčných membrán, a tedy následnou smrt buněk. Roztoky testovaných látek byly připraveny z 30 mM zásobních roztoků ve třech koncentracích - 100 µM, 50 µM a 10 µM. 96jamičková plata jsme v laminárním boxu otevřeli a odsáli médium z jamiček. Dle níže znázorněného schématu jsme do jamiček pipetovali 100 µl jednotlivé látky v triplikátech příslušných koncentrací (obr. 14). Plata jsme opět umístili na 48 hodin do inkubátoru.



Obr. 14: Schéma rozložení 96 jamkového plata pro testování cytotoxicity. Byly použity triplikáty každé z látek. Okrajové jamičky zůstávají naplněné pouze médiem. Vytvořeno pomocí BioRender.com

Třetí část pokusu představovalo měření samotné cytotoxicity. Plata s buňkami jsme zkontrolovali pod mikroskopem. Poté jsme do každé z jamiček s testovanou látkou přidali 20 µl MTS nahřátého na teplotu 37 °C ve vodní lázni. Plata jsme opět umístili do inkubátoru. MTS neboli [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- karboxymethoxyfenyl)-2-(4-

sulfofenyl)-2H-tetrazol je bioredukován živými buňkami na ve vodě rozpustný formazan. Tato konverze vyžaduje mitochondriální metabolickou aktivitu buňky. MTS byl pořízen od výrobce Promega (USA). Po tříhodinové inkubaci bylo ve spektrofotometru provedeno měření absorbance při vlnové délce 490 nm. Množství formazanu změřeného pomocí absorbance přímo odpovídá počtu živých buněk. Jelikož se jedná o barevný produkt, SDS jakožto negativní kontrola by mělo být bezbarvé.

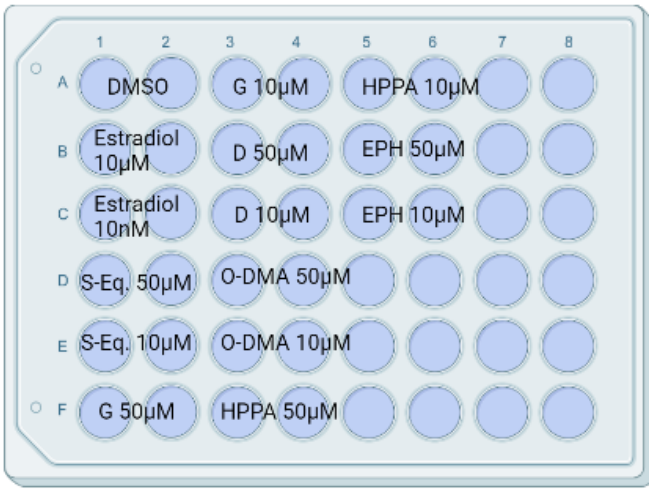
4.2.4 Nasazení plat na RT-PCR

Za účelem studia genové exprese pomocí RT-PCR jsme si nasadili 48jamičková plata buněk. Množství buněk na jednu jamičku bylo stanoveno na 240 000.

Postup práce byl téměř totožný jako při nasazování plat k měření cytotoxicity. Po 48 hodinách od nasazení buněk na testovací plata jsme přidali roztoky testovaných látek v koncentraci 10 µM a 50 µM. Jako vehicle bylo opět použito DMSO 0,1 %. Dále jsme jako pozitivní kontrolu použili roztoky estradiolu v koncentraci 10 µM. Na rozdíl od 96jamičkových plat jsme látky nasadili pouze v duplikátech (obr. 15).

Po dalších 48 hodinách jsme odsáli kultivační média a do každé z jamiček pipetovali TRI reagent v objemu 150 µl na jamičku. V důsledku přidání této látky dochází k rozrušení buněčných struktur, rozpuštění biomembrán, a tedy denaturaci proteinů, což je první krok potřebný k izolaci RNA.

Následně byla plata umístěna do mrazu, kde mohou být uchovávána i po dobu několika měsíců.



Obrázek 15: Schéma rozložení 48 jamkového plata pro RT-PCR. Látky byly přidány v duplikátech. Vytvořeno pomocí BioRender.com

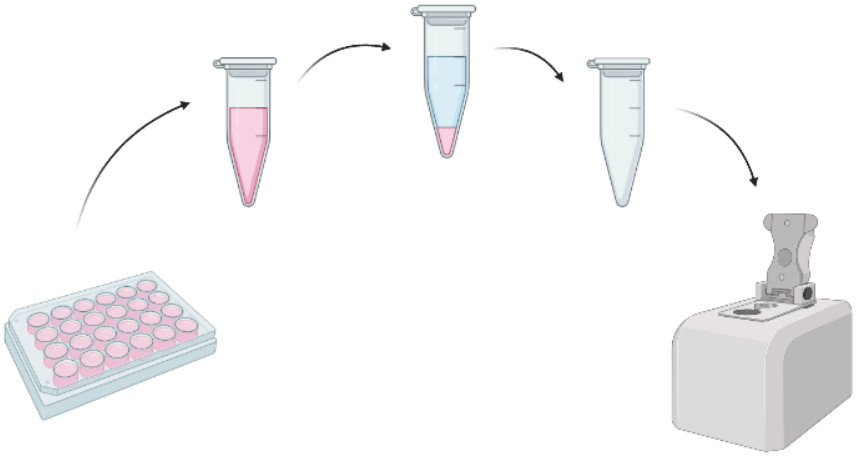
4.2.5 Izolace RNA

Plata s TRI reagentem nasazenými buňkami jsme vytáhli z mrazničky a nechali stát při pokojové teplotě do jejich úplného rozmrznutí. Následně byly vzorky sesbírány do 1,5 ml zkumavek. Poté byl přidán chloroform v polovičním množství celkově přidaného TRI reagentu, tedy 150 µl. Přídavek chloroformu vede k denaturaci proteinů buněk. Směs je dále protřepána a vortexována, inkubována několik minut při pokojové teplotě a poté centifugována při teplotě 4 °C 15 minut na 12 000 otáček. Centrifugací dochází k oddělení tří vrstev. Spodní fáze je organická (růžová), tvoří ji chloroform a TRI reagent. Následuje mezifáze tvořená denaturovanými proteiny a zbytky buněk (bílá). RNA se nachází ve vrchní vodné fázi (čirá). Ta je následně odebrána do nových 1,5 ml zkumavek.

Jako další činidlo je přidán isopropanol, a to 400 µl pro každý vzorek. Zkumavky jsou následně vortexovány a ponechány 10 minut při pokojové teplotě. Poté opět centrifugujeme při teplotě 4 °C 15 minut na 12 000 otáček. Tímto docílíme vysrážení RNA z vodné fáze. Supernatant odstraníme a na dně zkumavky ponecháme sedimentovaný pellet obsahující mRNA.

Pellety jsou následně promyty 70 % etanolem v objemu 800 µl na vzorek. Důvodem je přečištění vysrážené mRNA. Opět vortexujeme a centrifugujeme při teplotě 4 °C 5 minut na 7 500 otáček. Stejně jako v předchozím kroku odstraníme supernatant. Vzorky ponecháme odpařovat pět až deset minut na vzduchu. Na závěr přidáme 20 µl vody bez nukleáz, ve které sediment resuspendujeme. Pro účely měření čistoty a koncentrace odebereme 2 µl vzorků do 0,5 ml zkumavek (obr. 16).

Čistotu a koncentraci izolovaných vzorků RNA stanovujeme při měření absorbance pomocí NanoDrop^{TM} spektrofotometru v poměru A260/ A280 nm.



Obrázek 16: Schéma izolace RNA. Roztoky buněk byly odebrány do zkumavek, přidáním činidel vznikly tři vrstvy. Vzniklé pellety byly promyty a měřeny v NanoDrop. Vytvořeno pomocí BioRender.com

4.2.6 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT – qPCR)

Tato laboratorní metoda je modifikací klasického PCR, kdy je jako templát používána DNA. V případě RT – PCR je templátem mRNA. Jedná se o proces skládající se ze dvou kroků. Nejprve je mRNA přepsána reverzní transkriptázou do jednovláknové cDNA. Následně je cDNA amplifikována a detekována pomocí fluorescenční sondy.

Reverzní transkripce je enzymatickou reakcí, při které je přepisována genetická informace z mRNA do jednovláknové cDNA (complementary DNA). Tento proces je katalyzován enzymem reverzní transkriptáza. Před zahájením práce je potřeba naředit vzorky izolované RNA na stejnou koncentraci. Dalším krokem je příprava směsi reagencií, a to v přesně stanoveném pořadí a objemu (tab. 1). Pro účely této práce byl využit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit od firmy ThermoFisher (Waltham, MA, USA). Směs důkladně resuspendujeme mikropipetou. Takto připravenou směs reagencií rozpipetujeme do připravených stripů v objemu 17 µl na jamičku. Do jednotlivých jamiček přidáme 3 µl vzorku mRNA námi testovaných látek. Opět promícháme mikropipetou tak, aby směs neobsahovala vzduchové bubliny. Celou reakci připravujeme v ledu. V druhém kroku můžeme provést samotnou reverzní transkripci. Nastavíme reakční objem 20 µl. Reakce probíhá v termocykléru QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR Systém od firmy ThermoFisher ve třech fázích (tab. 2). Po uplynutí času RT stripy vyjmeme a umístíme opět do mrazničky. Před zahájením PCR do každé z jamiček stripu přidáme 100 µl nuclease-free vody a směs opět promícháme.

Tabulka 1: Reagencia použitá k RT.

Pořadí	Činidlo	Objem (µl) na vzorek
1	5x RT buffer	4
2	Voda bez nukleáz	9
3	Random Hexamer primers nebo dNTP mix 10 mM	1
4	Tetro Reverse Transcriptase 200U/µl	1
5	RNAase inhibitor 10U /µl	1

Tabulka 2: Podmínky průběhu RT

Teplota (°C)	Čas (min)
25	10
37	120
85	5

Polymerázová řetězová reakce je enzymatickou reakcí, jejímž cílem je amplifikace specifického úseku DNA, v našem případě cDNA. Tento úsek je na obou koncích ohraničen primery, které kódují konkrétní DNA sekvenci. Mají volný 5´-OH konec, 3´-OH konec je blokován dimetoxytritylem. Reakce probíhá ve dvou fázích (tab. 3). Nejprve je to tzv. holding stage, následuje cycling stage, která se čtyřicetkrát opakuje. Při teplotě 95 °C dochází k denaturaci, kdy disociují fragmenty DNA na jednotlivé řetězce. Tato fáze trvá jednu sekundu. Poté probíhá 20 sekund annealing, u něhož teplotu snižujeme na 60 °C. Probíhá zde navázání primerů na vlákno cDNA. V této práci byla využita tzv. real-time PCR, kdy měření amplifikovaných produktů cDNA probíhá již během měření na základě intenzity fluorescence použité sondy. K tomuto účelu využíváme TaqMan hydrolyzační sondy na 5´konci značené zářičem a na 3´konci zhášečem. Během annealingu se vážou na cDNA. Taq polymeráza během extenze sondu rozštěpí a oddálí zářič a zhášeč, čímž dojde ke fluorescenci, kterou následně detekujeme. Jako indikátory kvality procesu daného PCR využíváme housekeepingové geny, které odhalí případný falešně negativní výsledek způsobený inhibicí PCR. V případě této práce byl použit β-aktin.

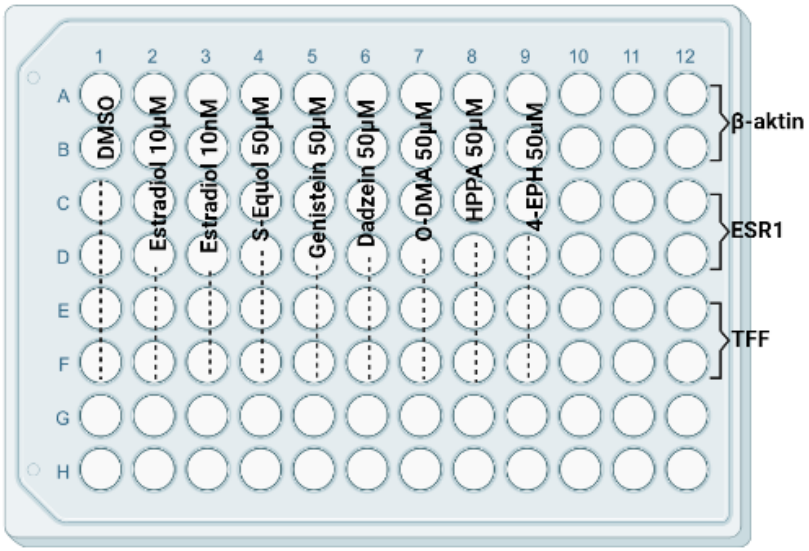
Tabulka 3: Podmínky průběhu qPCR.

	Teplota (°C)	**Čas**
Holding stage	50	2 minuty
	95	2 minuty
Cycling stage (40x)	95	1 sekunda
	60	20 sekund

Postup práce je v určitých bodech analogický k přípravě RT. Nejprve si v ledu připravíme reakční směs. V 1,5 ml Eppendorf zkumavce smícháme vodu bez nukleáz a TaqMan Fast Advanced Master mix od firmy ThermoFisher (tab. 4). Tento Master mix se skládá z DNA polymerázy, která je termostabilní a katalyzuje vznik fosfodiesterových vazeb, dále uracil-N glykosylasy zabraňující falešně pozitivní amplifikaci, ROX barvivo, pufru a deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs), které tvoří stavební jednotky nově syntetizované DNA. Tuto směs důkladně promícháme. Jelikož používáme tři primery, rozpipetujeme mix stejnoměrně do tří 0,5 ml Eppendorf zkumavek. Do takto připravených zkumavek následně přidáme primery. Jejich funkcí je ohraničovat replikovaný úsek cDNA. V případě této práce se jednalo o β-aktin, ESR1 a TFF1. Po opětovném promíchání obsahů zkumavek pipetujeme 15 µl Master mixu do jednotlivých jamiček 96 jamkového plata. Druhým krokem je přidání templátu, kterým je cDNA získaná předchozí RT. Naředěný roztok poté pipetujeme do jamiček plata v objemu 5 µl na jamičku (obr. 17). Plato přelepíme ochrannou folií a pro větší homogenitu směsi krátce centrifugujeme. V termocykleru nastavíme výše zmíněné cyklické fáze o příslušných teplotách a čase (tab. 3).

Tabulka 4: Reagencia použitá k PCR.

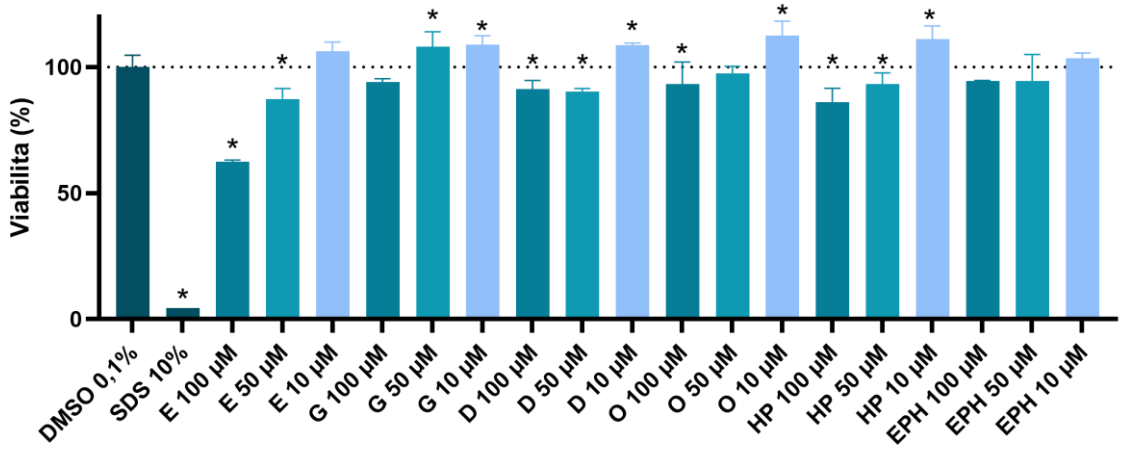
Reagencia	Objem na vzorek (µl)
Voda bez nukleáz	3
TaqMan Fast Advanced Master mix	10
primer	2
Templát DNA	5



Obrázek 17: Schéma rozložení plata pro PCR 50 µM vzorků. Pro každý primer pipetujeme duplikáty testovaných látek. Vytvořeno pomocí BioRender.com

5 Výsledky

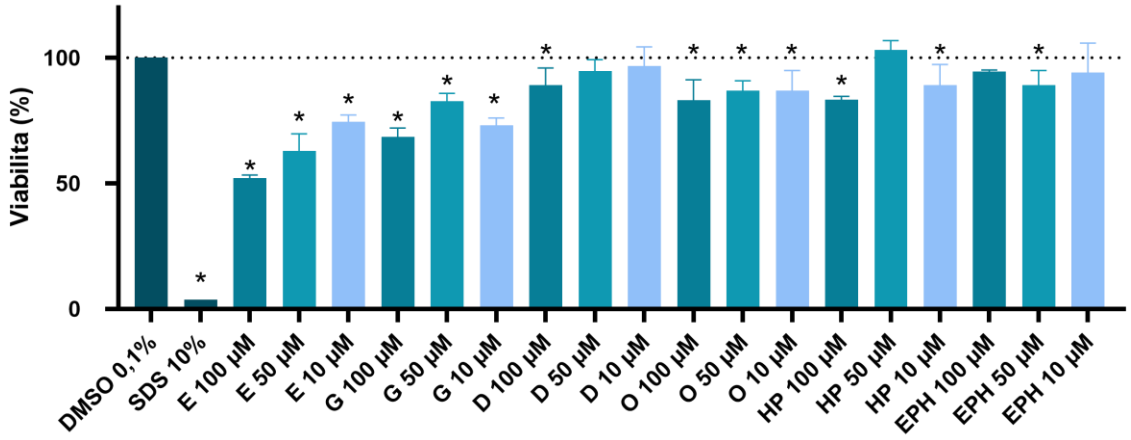
V prvním kroku bylo testováno cytotoxické působení látek, a to na obou buněčných liniích. Procentuální míra viability pro jednotlivé testované látky je porovnávána s pozitivní kontrolou 0,1 % DMSO a negativní kontrolou SDS 10 %. Výsledky DMSO byly stanoveny jako 100 % viabilita buněk. DMSO byl použit jako kontrola, jelikož byly v tomto rozpouštědle látky rozpuštěny. Výsledky v linii MCF7/S0.5 vykazují zřetelný vzrůst životnosti buněk se snižující se koncentrací pro všechny otestované fytoestrogeny (obr. 18). V případě všech látek byla při koncentraci 100 µM viabilita nižší než u DMSO 0,1 %, ačkoli se vždy s výjimkou S-equolu pohybovala okolo 90 %. U většiny látek byla viabilita pro 50 µM vyšší než u 100 µM, ale lehce pod hodnotou viability DMSO. Můžeme tedy konstatovat, že je toxicita testovaných látek závislá na koncentraci. Všechny látky vykazovaly bezpečnou aktivitu při nejnižší použité koncentraci (10 µM), dokonce všechny látky působily v této koncentraci lehce proliferativně.



Obrázek 18: Cytotoxicita otestovaných látek v linii MCF7/S.05. Graf znázorňuje procentuální viabilitu buněk po přidání testovaných látek. Statisticky testováno one-way ANOVA, *p <0,001, n=9. Zkratky: E - S-equol, G – genistein, D – daidzein, O – O-DMA, HP – HPPA, EPH – 4-ethylfenol

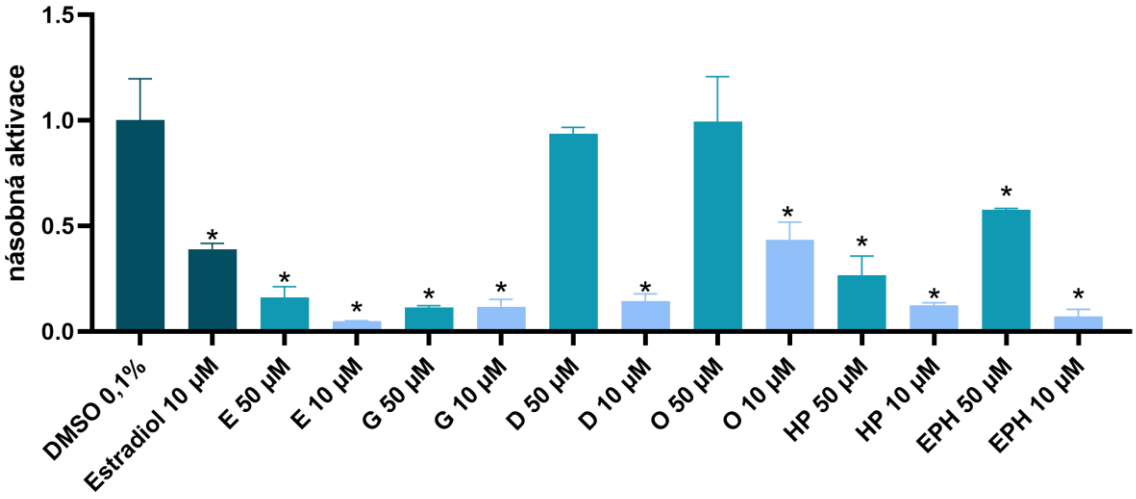
Stejný proces byl proveden u linie MCF7/182R-6. Jako v předchozích výsledcích, i v tomto případě je patrná závislost toxického působení testovaných fytoestrogenů na jejich koncentraci. Viabilita buněk se zvyšující se koncentrací fytosterogenů klesala, ale celková toxicita byla patrně vyšší než u parentálních buněk. Nejtoxičtěji působil opět S-equol, a to v koncentraci 100 µM, kde viabilita činila 50 %. Cytotoxicita v nižších koncentracích

poklesla, ale při koncentraci 10 µM byla přibližně 75 %. Výrazně toxicky působily také ostatní látky ve všech třech koncentracích. Poměrně konzistentní hodnoty viability ve všech koncentracích dosáhl O-DMA a 4-ethylfenol, pro které všechny koncentrace vykazovaly viabilitu kolem 80 %, respektive 90 %. Výrazně toxický účinek měl v této linii také genistein.



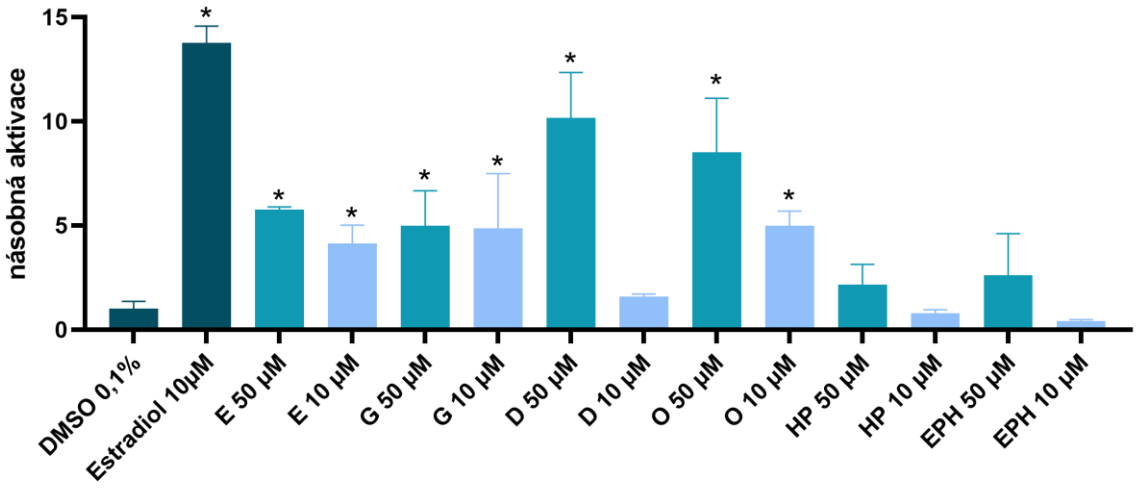
Obrázek 19: Cytotoxicita otestovaných látek v linii MCF7/182R-6. V grafu vidíme viabilitu fulvestrant rezistentní linie MCF7 při aplikaci daných koncentrací fytoestrogenů. Statisticky testováno one-way ANOVA, *p <0,001, n=9. Zkratky: E – S-equol, G – genistein, D – daidzein, O – O-DMA, HP – HPPA, EPH – 4-ethylfenol

Druhou fází této práce byla studie genové exprese estrogen responsivních genů pomocí RT-qPCR. Měření bylo prováděno pro dva estrogen responsivní geny, ESR1 (ESRα) a trefoil factor (TFF1). Jako housekeeper gen byl použit β-aktin. V první řadě byl proveden screening aktivity látek na ER za použití koncentrací 10 a 50 µM. Všechny látky byly porovnány s estradiolem 10 µM, který v buněčné linii MCF7/S0.5 vykazoval represi genu ESR1 (obr. 20). Většina otestovaných látek se chovala podobně jako estradiol. U některých látek (S-equol 50 a 10 µM, genistein 50 a 10 µM, daidzein 10 µM, HPPA 50 a 10 µM, 4-ethylfenol 10 µM) byla represe ESR1 výraznější než u estradiolu, ale jiné (daidzein 50 µM, O-DMA 50 a 10 µM, 4-ethylfenol 50 µM) měly menší represivní účinek. Každopádně nikdy nepřesahovaly hodnotu pro DMSO. Tyto výsledky naznačují podobný efekt těchto látek jako u estradiolu, s vysokou afinitou pro ER.



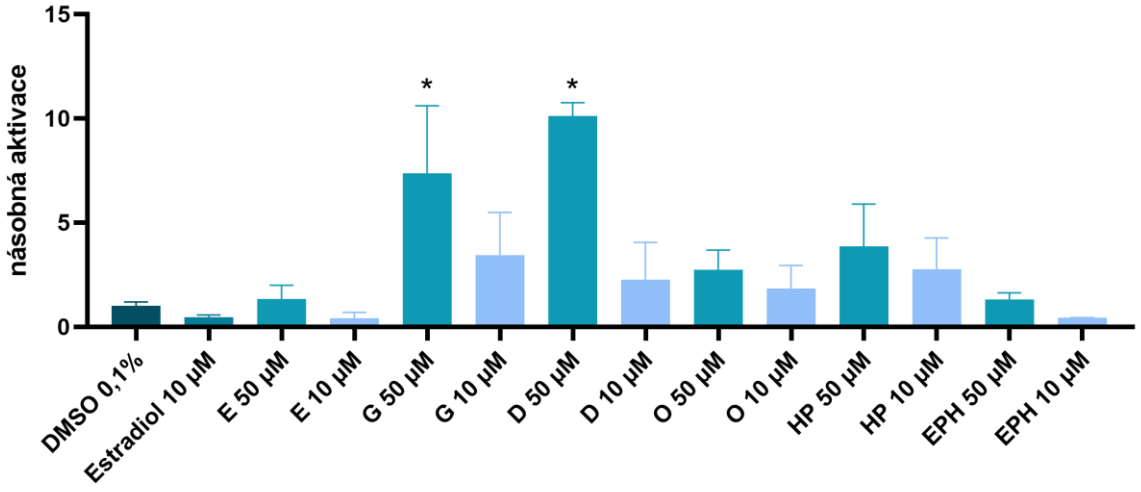
Obrázek 20: Exprese ESR1 v buněčné linii MCF7/S.05. Statisticky testováno one-way ANOVA, *p <0,0001, n=4. Zkratky: E – S-equol, G – genistein, D – daidzein, O – O-DMA, HP – HPPA, EPH – 4-ethylfenol

Druhý studovaný gen byl TFF1. V linii MCF7/S0.5 byla zvýšená aktivace tohoto genu patrná pro všechny otestované látky. Hodnota násobné aktivace estradiolu byla, jak bylo očekáváno, poměrně vysoká, a dosáhla skoro patnáctinásobné aktivace oproti vehikulu. Nejvyšší násobnou aktivaci ze všech látek měl daidzein 50 µM, který tak můžeme označit za látku nejsilněji ovlivňující gen TFF1 v buněčné linii MCF7/S0.5. Zajímavé je, že jeho aktivita byla výrazně snížena u druhé testované koncentrace (10 µM). O něco nižších hodnot poté dosáhl O-DMA 50 µM, který vykazoval významnou aktivaci i při koncentraci 10 µM. Významné byly i hodnoty aktivace pro S-equol a genistein při 50 i 10 µM. Ostatní vzorky nedosáhly významné násobné aktivace. Byl pozorován znatelný pokles násobné aktivace se snižující se koncentrací fytoestrogenů.



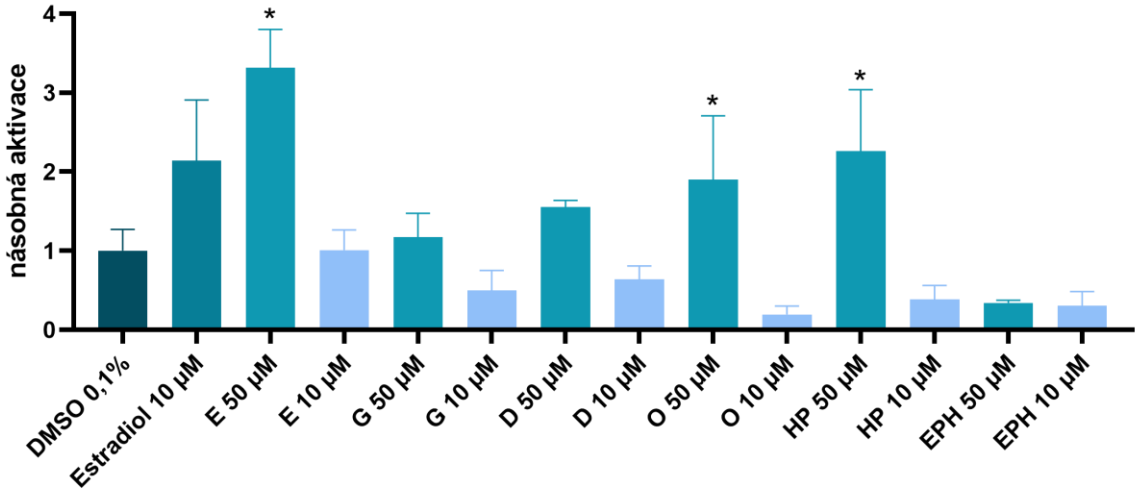
Obrázek 21: Exprese TFF1 v buněčné linii MCF7/S0.5. Statisticky testováno one-way ANOVA, *p <0,0001, n=4. Zkratky: E – S-equol, G – genistein, D – daidzein, O – O-DMA, HP – HPPA, EPH – 4-ethylfenol

Dále byla studována genová exprese na buněčné linii MCF7/182R-6, a to za stejných podmínek jako u linie MCF7/S0.5. Tato buněčná linie byla vyvinuta k rezistenci na fulvestrant, díky tomu můžeme pozorovat rozdíly v aktivaci ER danou látkou. Pro gen ESR1 dosáhla pozitivní kontrola estradiol 10 µM podobného represivního účinku. Aktivita otestovaných látek byla vždy vyšší než u pozitivní kontroly, s výjimkou 4-ethylfenolu v koncentraci 10 µM. Avšak v koncentraci 50 µM měla tato látka lehce aktivující účinky. Nejsilnější násobné aktivace byly pozorovány pro genistein a daidzein. U všech vzorků je patrná závislost ovlivnění genové exprese ESR1 na koncentraci (obr. 22)



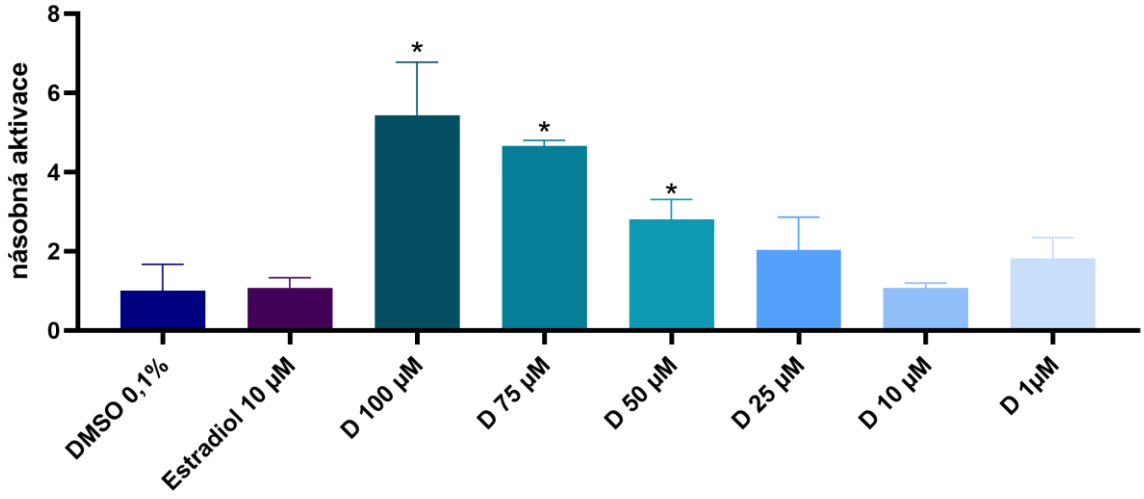
Obrázek 22: Exprese ESR1 v buněční linii MCF7/182R-6. Statisticky testováno one-way ANOVA, *p <0,0001, n=4. Zkratky: E – S-equol, G – genistein, D – daidzein, O – O-DMA, HP – HPPA, EPH – 4-ethylfenol

Exprese TFF1 byla v souladu s výsledky dosaženými u S0.5, ale mnohem slabší. Tento jev se dalo očekávat. Nižší byla i hodnota estradiolu 10 µM. Nejvyšší aktivaci vykazoval S-equol, a to v koncentraci 50 µM, koncentrace 10 µM byla srovnatelná s vehikulem. Z ostatních látek měly srovnatelné výsledky s estradiolem jen O-DMA a HPPA. Zajímavé je, že 4-ethylfenol vykazoval v obou koncentracích represi genu, což ukazuje potenciální jiný způsob účinku oproti ostatním látkám. Tyto výsledky také ukazují závislost exprese genu na koncentraci (obr. 23).



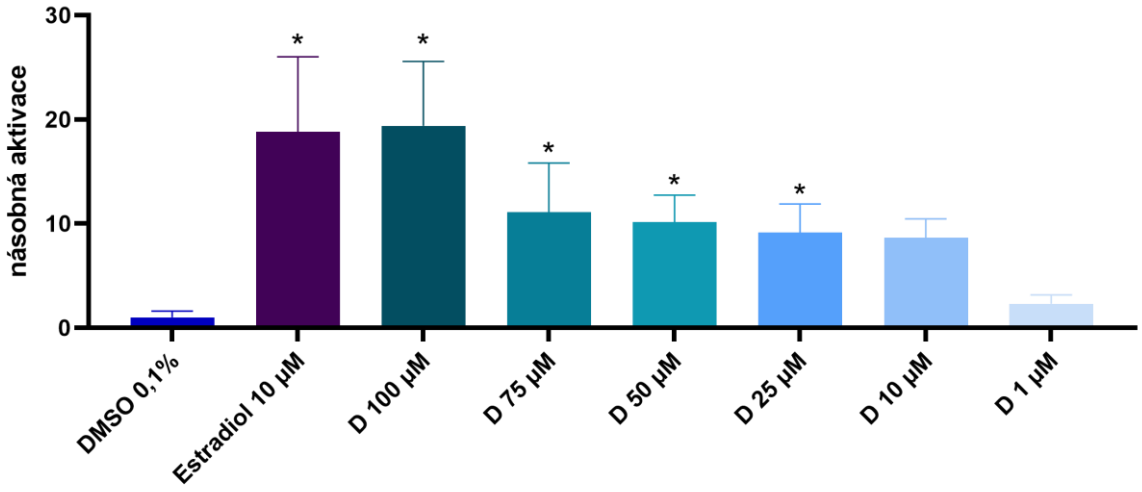
Obrázek 23: Exprese TFF1 v buněčné linii MCF7/182R-6. Statisticky testováno one-way ANOVA, *p <0,0001, n=4. Zkratky: E – S-equol, G – genistein, D – daidzein, O – O-DMA, HP – HPPA, EPH – 4-ethylfenol

Na základě předchozích výsledků byl daidzein vybrán k podrobnějšímu studiu aktivity. Pro tento účel byla proměřena koncentrační křivka daidzeinu, a to jen na buněčné linii MCF7/S0.5. Daidzein byl testován v koncentracích 100, 75, 50, 25, 10 a 1 µM. Výsledky pro gen ESR1 ukazují patrný pokles násobné aktivace se snižující se koncentrací daidzeinu (obr. 24). Oproti pozitivní kontrole byla pozorována vyšší násobná aktivace daidzeinu ve všech koncentracích.



Obrázek 24: Exprese ESR1 v buněčné linii MCF7/S0.5. Statisticky testováno one-way ANOVA, *p <0,0001, n=4. Zkratky: D – daidzein

V případě genu TFF1 je opět patrný pokles aktivace v závislosti na koncentraci (obr. 25). Aktivace genu byla velmi silná pro koncentraci 100 µM, kdy byla rovněž srovnatelná s estradiolem 10 µM. S nižšími koncentracemi se aktivace genu snižovala postupně, ale i při koncentraci 1 µM vykazoval daidzein dvojnásobnou expresi genu TFF1.



Obrázek 25: Exprese TFF1 v buněčné linii MCF7/S.05. Statisticky testováno one-way ANOVA, *p <0,0001, n=4. Zkratky: D – daidzein

6 Diskuse

Fytoestrogeny neboli „dietní estrogeny“ patří mezi exogenní látky, které jsou schopné napodobit aktivitu estradiolu anebo blokovat jeho účinky. Jejich výskyt v potravě je významný, zejména v asijské stravě, která je v západním světě čím dál populárnější. Důkazem jsou epidemiologická data nižšího výskytu rakoviny prsu u asijských žen oproti jiným kulturám (Youn et al., 2020). Nejbohatšími zdroji fytoestrogenů v potravě jsou luštěniny, zvláště sója luštinatá, dále bobulovité ovoce, žito a pivo. Ke zjištění potenciální interakce fytoestrogenů s estrogenním receptorem bylo v této práci testováno celkem šest zástupců, a to na základě jejich výskytu v potravě a v následném metabolismu: daidzein, genistein, O-desmethylangolensin, 2- (R, S) -2-(4-hydroxyfenyl) propionová kyselina, S-equol a 4-ethylfenol. Jedná se o látky ze skupiny isoflavonoidů, jejichž společným strukturním rysem je fenolická funkční skupina připojená v poloze 3 k benzopyranonovému cyklu. Fenolická skupina umožňuje pomocí vodíkových můstků vazbu na LBD ER. O-DMA, HPPA, S-equol a 4-ethylfenol vznikají ve střevě metabolickou přeměnou genisteinu a daidzeinu, jako metabolity jsou tedy z fyziologického hlediska relevantnější. Metabolický proces často vyústí v jednoduché, hydrofilní a méně toxické molekuly, které umožňují lepší vyloučení látek z organismu. Ačkoli většinou jsou tyto metabolity méně toxické než původní látky, stává se, že deriváty vykazují vyšší toxicitu, a mohou tak poškodit různé tkáně nebo orgány v těle. Příkladem takovéhoto metabolitu je N-acetyl-parabenzochinonimin (NAPQI) vznikající metabolizací paracetamolu (Dargan et al., 2003). Variabilita střevní mikroflóry mezi jedinci v populaci vede k jejich rozdílnému zastoupení v organismu. Proto byly v této práci testovány základní fytoestrogeny (daidzein, genistein) a zároveň jejich metabolity, jejichž působení na ER a toxicita nebyly dosud příliš zkoumány. Pro pochopení účinku základních fytoestrogenů jsou tyto poznatky ovšem esenciální.

V předchozích studiích bylo popsáno bifázické působení genisteinu, kdy nízké koncentrace (1-5 μM) působí proliferativně a vysoké (nad 10 μM) působí toxicky (Choi et al., 2013; Lavigne et al., 2007; Wang et al., 1996). Toxicita daidzeinu na parentální linii MCF7 byla rovněž dříve zkoumána. Studie prokazují závislost proliferace na koncentraci, kdy nejvyšší proliferace dosahují buňky při koncentraci daidzeinu 1 μM (Ju et al., 2006; Choi et al., 2012; Choi et al., 2008). Výrazné toxické působení S-equolu oproti daidzeinu rovněž koresponduje s předchozími studiemi (Ju et al., 2006; Choi et al., 2009; Onoda et

al., 2011). Míra toxicity O-DMA je srovnatelná s předchozími experimenty, kdy 10 μM koncentrace již toxicky nepůsobí (Choi et al., 2013).

Jelikož jsme se v této práci soustředili na ERα, použili jsme buněčné linie nádorů prsu MCF7, které přirozeně exprimují tento receptor. Pro porovnání byla použita fulvestrant rezistentní linie, na které tyto fytoestrogeny nebyly dosud testovány. Fulvestrant jakožto SERDs působí v tkáních antiestrogenně. U buněk, které jsou k němu rezistentní, by tedy měla být estrogenní aktivita snížena.

Nejprve byla zjišťována míra cytotoxického působení vybraných fytoestrogenů na buněčné linie nádorových buněk. Všechny látky byly testovány ve třech koncentracích – 100, 50 a 10 μM. Z výsledků je u většiny vzorků patrná zvyšující se toxicita látek s jejich zvyšující se koncentrací. Tento jev se dal předpokládat, avšak některé látky, například genistein, O-DMA a 4-ethylfenol, vykazovaly v koncentraci 10 μM vysokou viabilitu nebo i lehce proliferativní účinky na MCF7/S0.5. Naopak nejtoxičtěji působil S-equol, a to v závislosti na koncentraci, s nejnižší viabilitou (60 %) pro koncentraci 100 μM, a netoxickým působením při nejnižší zkoušené koncentraci. Tyto výsledky byly poměrně překvapující, jelikož S-equol vzniká z daidzeinu tříkrokovou metabolickou přeměnou. Experimenty byly zopakovány také na buněčné linii rezistentní na fulvestrant. Všeobecně byla viabilita v této linii nižší pro všechny látky ve všech otestovaných koncentracích. Každopádně zde byl také nejtoxičtější S-equol, který vykazoval v koncentraci 100 μM viabilitu okolo 50 %. V této linii byla toxická i jeho nejslabší koncentrace 10 μM, kdy byla, na rozdíl od výsledků dosažených na parenterální linii, viabilita 80 %. Druhou výrazně toxickou látkou byl genistein, a to zejména ve fulvestrant rezistentní linii, kde se viabilita pohybovala kolem 60 %. Naopak v parentální linii nevykazoval genistein toxicitu, a působil proliferativně, zejména u nejnižší koncentrace 10 μM. Pro ostatní látky nebyla toxicita významná, v slabších koncentracích pak působily neutrálně, nebo i růst mírně podporovaly. Ve fulvestrant rezistentní linii všeobecně platilo, že všechny látky dosáhly nižší viability.

Můžeme tedy konstatovat, že v koncentraci 100 μM všechny látky prokázaly cytotoxické působení, i když u některých nebylo významné. Pokles viability byl výraznější u linie MCF7/182R-6. Tyto výsledky potvrzují data publikovaná v předchozích studiích, které prokázaly v linii MCF7 závislost toxického působení genisteinu, daidzeinu, S-equolu a O-DMA na koncentraci. Pokud víme, HPPA a 4-ethylfenol nebyly dosud z hlediska

cytotoxicity na MCF7 zkoumány, a tyto výsledky jsou tak první, které popisují jejich toxicitu.

Schopnost látek modifikovat genovou expresi vybraných estrogen responsivních genů byla předpokládána z důvodu jejich chemické struktury, a následně testována pomocí dvoukrokové kvantitativní PCR. Pro tento účel jsme vybrali dva geny, jejichž exprese je přímo ovlivněna interakcí ER s ligandem, a to ESR1, gen kódující izoformu ERα, a TFF1 (pS2). Estradiol je nejvýznamnějším endogenním ligandem estrogenního receptoru, a proto jsme vůči němu porovnávali aktivitu testovaných látek.

Výsledky násobné aktivace estradiolu v MCF7/S0.5 pro gen ESR1 odpovídají předpokladům. I když bychom na první pohled očekávali, že ESR1 bude vysoce aktivován estradiolem, naše výsledky ukazují, že aktivita ER je při vysoké koncentraci estradiolu snížená, což je v souladu se studií Ellison-Zelski et al. Jedná se o způsob negativní regulace (tzv. negative feedback). Transkripční aktivita je zde snížena vlivem vazby ERα na oblasti v blízkosti promotoru ESR1, kdy dochází k aktivaci proteinu Sin3A, acetylaci a následně zeslabení ESR1 transkripce (Ellison-Zelski et al., 2009). Násobná aktivace estradiolu je v tomto případě nižší než násobná aktivace DMSO.

Na začátku byl proveden screening aktivity testovaných látek za použití pouze dvou koncentrací testovaných látek, 10 μM a 50 μM. V případě obou buněčných linií dosáhl nejvyšších hodnot násobné aktivace daidzein, a to v koncentraci 50 μM. V linii MCF7/S0.5 ovlivňoval aktivitu genu ESR1 stejně silně jako estradiol 10 μM, který byl ovšem regulován negativní zpětnou vazbou. V linii MCF7/182R-6 byla jeho aktivace nejvyšší ze všech testovaných látek. Závislost genové exprese na koncentraci daidzeinu byla již dříve prokázána pro koncentraci 1 μM. V dané studii byla ovšem provedena 24hodinová inkubace, zatímco v tomto měření 48hodinová. (Ju et al., 2006). U fulvestrant rezistentní linie by se dalo očekávat, že bude oproti parenterální linii vykazovat nižší estrogenní aktivitu, jelikož je aktivita estrogenního receptoru blokována. Jednou z příčin rezistence může být také mutace v genu ESR1 (Kaminska et al., 2021; Frogne et al., 2005; Jensen et al., 1999). Genistein dosáhl vyšších hodnot násobné aktivace v linii MCF7/182R-6, kdy se v koncentraci 50 μM u genu ESR1 jednalo po daidzeinu o druhý nejsilnější aktivátor. V tomto měření měla i 10 μM koncentrace nejvyšší aktivaci ze vzorků dané koncentrace. V linii MCF7/S0.5 bylo ovlivnění slabší. Gen ESR1 byl S-equolem exprimován oproti jiným vzorkům slaběji v linii MCF7/S0.5 i v linii MCF7/182R-6, a to z důvodu jeho toxického působení na buňky. O-DMA dosahoval vysoké aktivity zejména

v linii MCF7/S0.5, kdy byla pro gen ESR1 koncentrace 50 μM i 10 μM nejvyšší mezi otestovanými fytoestrogeny. HPPA patřila z hlediska ovlivnění genové exprese mezi slabší až středně silné aktivátory. Poslední testovanou látkou byl 4-ethylfenol. Jeho hodnoty násobné aktivace se liší dle použité buněčné linie. V linii MCF7/S0.5 dosáhl 4-ethylfenol poměrně vysokých hodnot. Pro ESR1 byla 50 μM koncentrace třetím nejsilnějším aktivátorem genové transkripce. To naznačuje přímou interakci této látky s receptorem. 10 μM vzorek byl ovšem druhý nejslabší. V linii MCF7/182R-6 byla aktivita 4-ethylfenolu srovnatelná s S-equolem. Vysoké hodnoty násobné aktivace některých látek byly překvapivé. Pro gen ESR1 bychom očekávali nízkou expresi, nepřímo úměrnou koncentraci testovaných fytoestrogenů. Důvodem opačného jevu může být saturabilní mechanismus či nepřímá aktivace ER.

Druhým testovaným genem byl TFF1. Na rozdíl od ESR1 pro TFF1 platí, že čím silnější je aktivita, tím výraznější je stimulace receptoru. V MCF7/S0.5 jej opět nejsilněji ovlivňoval daidzein. V parentální linii byly výsledky S-equolu nižší než daidzeinu, což odpovídá předchozím studiím, kdy byla zjištěna nižší exprese S-equolem 1 μM než daidzeinem 1 μM. V dané studii byly ovšem buňky implementovány v ovariektomizovaných myších. (Ju et al., 2006). Výsledky genisteinu jsou v parentální linii srovnatelné s S-equolem, patřil tedy k silnějším aktivátorům. Výsledky genisteinu na genu TFF1 korespondují s předchozími experimenty, které prokázaly jeho schopnost indukovat TFF1 ve všech koncentracích (Lavigne et al, 2007; Wang et al., 2006). Schopnost genisteinu indukovat expresi TFF rovněž potvrzuje primární působení genisteinu přes ERα, jelikož TFF1 je ERα responsivní gen (Pons et al., 2019). O-DMA dosáhl vysoké aktivace zejména v MCF7/S0.5, kdy byla 50 μM koncentrace druhá nejsilnější a 10 μM koncentrace nejsilnější ze vzorků dané koncentrace. Předchozí studie na linii MCF7 vyhodnocují aktivitu O-DMA v porovnání s daidzeinem a S-equolem jako slabší, jak z hlediska ovlivnění genové exprese TFF1, tak z hlediska afinity k ER (Frankenfeld, 2011; Hwang et al., 2006; Schmitt et al., 2001). V této práci bylo ale ovlivnění genové exprese v linii MCF7/S0.5 O-DMA vyšší než S-equolem. Pro HPPA byly hodnoty aktivace v MCF7/S0.5 v obou koncentracích nejnižší ze všech vzorků. Jelikož je HPPA finálním metabolitem daidzeinu a genisteinu v organismu, jedná se ale o relativní výsledky. 4-ethylfenol byl v obou liniích velmi slabým aktivátorem. Ve fulvestrant rezistentní linii působil nejsilněji S-equol. Hodnoty genisteinu byly naopak v MCF7/182R-6 nižší. Aktivace O-DMA byla průměrná, zatímco vzorek 50 μM HPPA byl druhým nejsilnějším

ze všech fytoestrogenů. Studie genové exprese nebyly na těchto genech pro 4-ethylfenolu a HPPA dosud provedeny, a proto jsou výsledky této práce velmi přínosné pro další výzkum. Ze získaných výsledků vyplývá, že se jedná o látky jen slabě toxické. Při podání ve fyziologických koncentracích, které jsou nižší než koncentrace testované v této práci, nicméně toxické působení nepředpokládáme (Ibarreta et al., 2001). Suplementace fytoestrogenů v koncentracích použitých v této práci může u premenopauzálních žen vést k poklesu hladin folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH), a k prodloužení délky menstruačního cyklu. U postmenopauzálních žen došlo ke zvýšení hladin E2, FSH a LH ale ovlivněny nebyly (Hooper et al., 2009). Genová exprese je silněji ovlivněna HPPA. Příčinou může být větší strukturní podobnost s endogenními estrogeny. Výsledky naznačují silnou interakci s ER, a zároveň i nepřímé ovlivnění genové exprese, které je patrné ve fulvestrant rezistentní linii. Tyto poznatky mohou být dále využity ke studiu metabolismu genisteinu a daidzeinu a k racionalizaci jejich příjmu potravou, případně i samostatnému podání HPPA a 4-ethylfenolu.

Na základě výsledků měření genové exprese byla dále studována aktivita daidzeinu, a to jen v linii MCF7/S0.5, kdy byly testovány vzorky o koncentraci 100, 75, 50, 25, 10 a 1 μM. Předchozí studie se soustředily na nižší koncentrace anebo na vzorky nádorů od pacientů. U obou genů byla prokázána závislost násobné aktivace na koncentraci fytoestrogenu. Gen ESR1 byl ovlivněn daidzeinem silněji než estradiolem 10 μM. Naopak u genu TFF1 bylo ovlivnění estradiolem 10 μM silnější. Je zde opět patný pokles transkripční aktivity estradiolu na ERα.

7 Závěr

Výsledky této práce potvrzují ovlivnění genové exprese vybranými fytoestrogeny v závislosti na koncentraci, kdy nejvyšších hodnot násobné aktivace dosahoval daidzein. Aktivita byla zjištěna ale také u jeho metabolitu HPPA a 4-ethylfenolu, metabolitu genisteinu, které dosud nebyly z hlediska ovlivnění genové exprese testovány. Z výsledků na buněčné linii rezistentní na fulvestrant je patrné, že tyto látky jsou schopné interagovat s ER jak přímou, tak nepřímou interakci s ER. Jelikož se tyto sloučeniny vyskytují v potravě, lze předpokládat, že čím vyšší bude dietní příjem daidzeinu a genisteinu, tím více budou v organismu zastoupeny i jejich intestinální metabolity HPPA a 4-ethylfenol, což by mohlo vést k vyšší aktivaci ER. Tato zjištění mohou být přínosem v racionalizaci dietního příjmu fytoestrogenů. Potenciálně můžeme také zvažovat podávání samotného 4-ethylfenolu a HPPA, ať už jako doplňků stravy nebo léčivých přípravků v konkrétních indikacích.

Limitací této studie je model buněčné linie vybraný ke studiu a dostupnost daidzeinu v organismu. Po příjmu se daidzein rychle metabolizuje a otázka je, zda může mít výrazný účinek. Z toho důvodu nelze tvrdit, že příjem potravin bohatých na fytoestrogeny či konkrétně daidzein podporuje výskyt rakoviny prsu, nelze ale vyloučit určitou roli. Zároveň tyto fytoestrogeny mohou mít i jiné účinky či funkce v organismu. K potvrzení těchto teorií je třeba pokračovat ve výzkumu isoflavonoidů, například na zvířecích modelech.

Seznam použitých zkratek

AF-1	aktivátor function-1 region
AR	adrenergní receptor
BAD	BCL-2 Antagonist of cell Death
cDNA	complementary DNA
DBD	DNA binding domain
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
E2	estradiol
E3	estriol
EGF	epidermal growth factor
ER	estrogenní receptor
ERE	estrogen responsivní element
ESR1	gen Estrogen receptor 1
FSH	folikulostimulační homon
GPER1	G-protein Coupled Estrogen Receptor 1
HATs	histon acetyltransferasa
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HDACs	histon deacetylasa
HPPA	2-(4-hydroxyfenyl) propionová kyselina
LBD	ligand binding domain
LH	luteinizační hormon
MR	mineralokortikoidní receptor
NLS	nuclear localisation signal
NR	nukleární receptor
O-DMA	O-desmethylangolensin
PR	progesteronový receptor
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SDS	sodium dodecyl sulfát
SERDs	selective estrogen receptor downregulators
SERMs	selective estrogen receptor modulators

SHBG	steroid hormone binding globuline
TFF1	Trefoil Factor 1
VEGF	vascular endothelial growth factor

Zdroje

Abdulkareem, I., & Zurmi, I. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, *15*(1), 9.

Abrahámová, J. (2002). Current Oppotunities in Breast Carcinoma Treatment. *Remedia. 12*, 233-246

Ahn, S.-Y., Jo, M. S., Lee, D., Baek, S.-E., Baek, J., Yu, J. S., Jo, J., Yun, H., Kang, K. S., Yoo, J.-E., & Kim, K. H. (2019). Dual effects of isoflavonoids from *Pueraria lobata* roots on estrogenic activity and anti-proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Bioorganic Chemistry*, *83*, 135–144.

Böttner, M., Thelen, P., & Jarry, H. (2014). Estrogen receptor beta: Tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *139*, 245–251.

Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(8), 808.

Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *ANTICANCER RESEARCH*, 8, 3147-3154.

Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, *8*(16), 3131–3141.

Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*, *7*(10), 1281–1294.

Dargan, P. I., & Jones, A. L. (2003). Management of paracetamol poisoning. *TRENDS in Pharmacological Sciences. 4.*

de Kleijn, M. J. J., van der Schouw, Y. T., Wilson, P. W. F., Adlercreutz, H., Mazur, W., Grobbee, D. E., & Jacques, P. F. (2001). Intake of Dietary Phytoestrogens Is Low in Postmenopausal Women in the United States: The Framingham Study. *The Journal of Nutrition*, *131*(6), 1826–1832.

Deroo, B. J., & Korach K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(3), 561–570.

Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, *26*(17), 5377.

Dip, R., Lenz, S., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Gmuender, H., & Naegeli, H. (2008). Global gene expression profiles induced by phytoestrogens in human breast cancer cells. *Endocrine Related Cancer*, *15*(1), 161–173.

Ellison-Zelski, S. J., Solodin, N. M., & Alarid, E. T. (2009). Repression of *ESR1* through Actions of Estrogen Receptor Alpha and Sin3A at the Proximal Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(18), 4949–4958.

Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., & Gustafsson, J.-Å. (1997). Human Estrogen Receptor β-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *82*(12), 4258–4265.

Falah, N., Torday, J., K. Quinney, S., & M. Haas, D. (2015). Estriol review: Clinical applications and potential biomedical importance. *Clinical Research and Trials*, *1*(2).

Farooq, A. (2015). Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *15*(14), 1372–1384.

Farzaneh, S., & Zarghi, A. (2016). Estrogen Receptor Ligands: A Review (2013–2015). *Scientia Pharmaceutica*, *84*(3), 409–427.

Fokialakis, N., Alexi, X., Aligiannis, N., Boulaka, A., Meligova, A. K., Lambrinidis, G., Kalpoutzakis, E., Pratsinis, H., Cheilari, A., Mitsiou, D. J., Mitakou, S., & Alexis, M. N. (2019). Biological evaluation of isoflavonoids from *Genista halacsyi* using estrogen-target cells: Activities of glucosides compared to aglycones. *PLOS ONE*, *14*(1), e0210247.

Frankenfeld, C. L. (2011). O-Desmethylangolensin: The Importance of Equol's Lesser Known Cousin to Human Health. *Advances in Nutrition*, *2*(4), 317–324.

Frogne, T., Jepsen, J. S., Larsen, S. S., Fog, C. K., Brockdorff, B. L., & Lykkesfeldt, A. E. (2005). Antiestrogen-resistant human breast cancer cells require activated Protein Kinase B/Akt for growth. *Endocrine-Related Cancer*, *12*(3), 599–614.

Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 116, 135–170.

Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., & Huber, J. C. (2002). Production and Actions of Estrogens. *New England Journal of Medicine*, *346*(5), 340–352.

Gururaj, A. E., Rayala, S. K., Vadlamudi, R. K., & Kumar, R. (2006). Novel Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy: Genomic and Nongenomic Considerations. *Clinical Cancer Research*, *12*(3), 1001s–1007s.

Hassan. M. S. U., Ansari, J., Spooner, D., & Hussain, S. A. (2010). Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncology Reports*, *24*(5), 1121-1131.

Hevener, A. L., Clegg, D. J., & Mauvais-Jarvis, F. (2015). Impaired estrogen receptor action in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *418*, 306–321.

Hod, R., Maniam, S., & Mohd Nor, N. H. (2021). A Systematic Review of the Effects of Equol (Soy Metabolite) on Breast Cancer. *Molecules*, *26*(4), 1105.

Holst, F., Stahl, P. R., Ruiz, C., Hellwinkel, O., Jehan, Z., Wendland, M., Lebeau, A., Terracciano, L., Al-Kuraya, K., Jänicke, F., Sauter, G., & Simon, R. (2007). Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nature Genetics*, *39*(5), 655–660.

Hooper, L., Ryder, J. J., Kurzer, M. S., Lampe, J. W., Messina, M. J., Phipps, W. R., & Cassidy, A. (2009). Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update. 15(4),* 423-440.

Hua, H., Zhang, H., Kong, Q., & Jiang, Y. (2018). Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Experimental Hematology & Oncology*, *7*(1), 24.

Huang, D., Yang, F., Wang, Y., & Guan, X. (2017). Mechanisms of resistance to selective estrogen receptor down-regulator in metastatic breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1868*(1), 148–156.

Huang, J., Li, X., Maguire, C. A., Hilf, R., Bambara, R. A., & Muyan, M. (2005). Binding of Estrogen Receptor β to Estrogen Response Element in Situ Is Independent of Estradiol and Impaired by Its Amino Terminus. *Molecular Endocrinology*, *19*(11), 2696–2712.

Huang, P., Chandra, V., & Rastinejad, F. (2010). Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annual Review of Physiology*, *72*(1), 247–272.

Huang, Y., Li, X., & Muyan, M. (2011). Estrogen receptors similarly mediate the effects of 17β-estradiol on cellular responses but differ in their potencies. *Endocrine*, *39*(1), 48–61.

Hwang, C. S., Kwak, H. S., Lim, H. J., Lee, S. H., Kang, Y. S., Choe, T. B., Hur, H. G., & Han, K. O. (2006). Isoflavone metabolites and their *in vitro* dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *101*(4–5), 246–253.

Chen, W.-F., Huang, M.-H., Tzang, C.-H., Yang, M., & Wong, M.-S. (2003). Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1638*(2), 187–196.

Cho, H. W., Gim, H. J., Li, H., Subedi, L., Kim, S. Y., Ryu, J.-H., & Jeon, R. (2021). Structure–Activity Relationship of Phytoestrogen Analogs as ERα/β Agonists with Neuroprotective Activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *69*(1), 99–105.

Choi, E. J., Ahn, W. S., & Bae, S. M. (2009). Equol induces apoptosis through cytochrome c-mediated caspases cascade in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Chemico-Biological Interactions*, *177*(1), 7–11.

Choi, E. J., Jung, J. Y., & Kim, G.-H. (2014). Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ERα expression and induction of apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *8*(2), 454–458.

Choi, E. J., & Kim, G.-H. (2008). Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. *Phytomedicine*, *15*(9), 683–690.

Choi, E. J., & Kim, G.-H. (2013). Antiproliferative activity of daidzein and genistein may be related to ERα/c-erbB-2 expression in human breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *7*(3), 781–784.

Choi, E. J., & Kim, G.-H. (2013). O-desmethylangolensin inhibits the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells by inducing apoptosis and promoting cell cycle arrest. *Oncology Letters*, *6*(6), 1784–1788.

Ibarreta, D., Daxenberger, A., & Meyer, H. H. D. (2001). Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. 109*, 161-84.

Ignatov, T., Treeck, O., Kalinski, T., Ortmann, O., & Ignatov, A. (2020). GPER-1 expression is associated with a decreased response rate to primary tamoxifen therapy of breast cancer patients. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *301*(2), 565–571.

Ikeda, K., Horie-Inoue, K., & Inoue, S. (2019). Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *191*, 105375.

Jensen, B. L., Skouv, J., Lundholt, B. K., & Lykkesfeldt, A. E. (1999). Differential regulation of specific genes in MCF-7 and the ICI 182780-resistant cell line MCF-7/182R-6. *British Journal of Cancer*, *79*(3–4), 386–392.

Jones, S. E. (2002). A New Estrogen Receptor Antagonist – An Overview of Available Data. *Breast Cancer Research and Treatment*, *75*(S1), 19–21.

Ju, Y. H., Fultz, J., Allred, K. F., Doerge, D. R., & Helferich, W. G. (2006). Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. *Carcinogenesis*, *27*(4), 856–863.

Kaminska, K., Akrap, N., Staaf, J., Alves, C. L., Ehinger, A., Ebbesson, A., Hedenfalk, I., Beumers, L., Veerla, S., Harbst, K., Ehmsen, S., Borgquist, S., Borg, Å., Pérez-Fidalgo, A., Ditzel, H. J., Bosch, A., & Honeth, G. (2021). Distinct mechanisms of resistance to fulvestrant treatment dictate level of ER independence and selective response to CDK inhibitors in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*, *23*(1), 26.

Katzenellenbogen, B. S., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T. R., Martini, P. G. V., Montano, M., Sun, J., Weis, K., & Katzenellenbogen, J. A. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: Selective ligands and receptor pharmacology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *74*(5), 279–285.

Kaufman, P. B., Duke, J. A., Brielmann, H., Boik, J., & Hoyt, J. E. (1997). A Comparative Survey of Leguminous Plants as Sources of the Isoflavones, Genistein and Daidzein: Implications for Human Nutrition and Health. *The Journal of Alternative and Comlementary Medicine. 3(1),* 7-12.

Khan, S. U., Ahemad, N., Chuah, L.-H., Naidu, R., & Htar, T. T. (2022). G protein-coupled estrogen receptor-1: Homology modeling approaches and application in screening new GPER-1 modulators. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(7), 3325–3335.

Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., Aomori, T., Nagao, T., Okabe, H., Nohara, T., & Masamune, Y. (2004). Interactions of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β (III). Estrogenic Activities of Soy Isoflavone Aglycones and Their Metabolites Isolated from Human Urine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin 27*(2), 4.

Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, *29*(14), 2905–2919.

Kolářová, H. (2017). Care for BRCA1 and BRCA2 gene carriers from the gynecologist's point of view. *Onkologie*, *11*(5), 228–230.

Kumar, V., & Chauhan, S. (2021). Daidzein Induces Intrinsic Pathway of Apoptosis along with ER α/β Ratio Alteration and ROS Production. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *22*(2), 603–610.

Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of Breast Cancer Cell Lines as Models for Breast Tumours: An Update. *Breast Cancer Research and Treatment*, *83*(3), 249–289.

Lasfargues, E. Y., & Ozzello, L. (1958). Cultivation of Human Breast Carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. *21*, 1131-1147.

Lavigne, J. A., Takahashi, Y., Chandramouli, G. V. R., Liu, H., Perkins, S. N., Hursting, S. D., & Wang, T. T. Y. (2008). Concentration-dependent effects of genistein on global gene expression in MCF-7 breast cancer cells: An oligo microarray study. *Breast Cancer Research and Treatment*, *110*(1), 85–98.

Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, *107*(7), djv073–djv073.

Levin, E. R. (2005). Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Molecular Endocrinology*, *19*(8), 1951–1959.

Linder, M. E., & Deschenes, R. J. (2007). Palmitoylation: Policing protein stability and traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(1), 74–84.

Manavathi, B., Samanthapudi, V. S. K., & Gajulapalli, V. N. R. (2014). Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: The orchestrators of mammary gland cell fate and development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *2*.

Mateus, D., Sebastião, A. I., Carrascal, M. A., Carmo, A. do, Matos, A. M., & Cruz, M. T. (2021). Crosstalk between estrogen, dendritic cells, and SARS-CoV-2 infection. *Reviews in Medical Virology*.

Matsumura, A., Ghosh, A., Pope, G. S., & Darbre, P. D. (2005). Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *94*(5), 431–443.

McCarty, M. F. (2006). Isoflavones made simple – Genistein's agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Medical Hypotheses*, *66*(6), 1093–1114.

Menashe, I., Maeder, D., Garcia-Closas, M., Figueroa, J. D., Bhattacharjee, S., Rotunno, M., Kraft, P., Hunter, D. J., Chanock, S. J., Rosenberg, P. S., & Chatterjee, N. (2010). Pathway Analysis of Breast Cancer Genome-Wide Association Study Highlights Three Pathways and One Canonical Signaling Cascade. *Cancer Research*, *70*(11), 4453–4459.

Migkos, T., Applová, L., Horký, P., Tvrdý, V., Karlíčková, J., Macáková, K., Hrubša, M., Catapano, M. C., Tomanek, M., Pour, M., & Mladěnka, P. (2019). The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper. *Phytomedicine*, *62*, 152974.

Muthyala, R. S., Ju, Y. H., Sheng, S., Williams, L. D., Doerge, D. R., Katzenellenbogen, B. S., Helferich, W. G., & Katzenellenbogen, J. A. (2004). Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *12*(6), 1559–1567.

Nelson, L. R., & Bulun, S. E. (2001). Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *45*(3), S116–S124.

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., & Gustafsson, J.-Å. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, *81*(4), 1535–1565.

Ogawa, Y., Hai, E., Matsumoto, K., Ikeda, K., Tokunaga, S., Nagahara, H., Sakurai, K., Inoue, T., & Nishiguchi, Y. (2008). Androgen receptor expression in breast cancer: Relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *International Journal of Clinical Oncology*, *13*(5), 431–435.

O'Malley, B. W., & Khan, S. (2013). Elwood V. Jensen (1920–2012): Father of the nuclear receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 3707–3708.

Onoda, A., Ueno, T., Uchiyama, S., Hayashi, S., Kato, K., & Wake, N. (2011). Effects of S-equol and natural S-equol supplement (SE5-OH) on the growth of MCF-7 in vitro and as tumors implanted into ovariectomized athymic mice. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(9), 2279–2284.

Osborne, C. K., Hobbs, K., & Trent, J. M. (1987). Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Research and Treatment*, *9*(2), 111–121.

Paakinaho, V., & Palvimo, J. J. (2021). Genome-wide crosstalk between steroid receptors in breast and prostate cancers. *Endocrine-Related Cancer*, *28*(9), R231–R250.

Patel, H. K., & Bihani, T. (2018). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, *186*, 1–24.

Patisaul, H. B., & Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *31*(4), 400–419.

Pennell, L. M., Galligan, C. L., & Fish, E. N. (2012). Sex affects immunity. *Journal of Autoimmunity*, *38*(2–3), J282–J291.

Petráková, K. (2009). Chemotherapy and hormontherapy of breast cancer. *Medicína pro praxi*. 6(6), 320-324.

Thermofisher.cz (2021). *Počítací komůrka dle Bürkera, bez svorek*.

Pons, D. G., Vilanova-Llompart, J., Gaya-Bover, A., Alorda-Clara, M., Oliver, J., Roca, P., & Sastre-Serra, J. (2019). The phytoestrogen genistein affects inflammatory-related genes expression depending on the ERα/ERβ ratio in breast cancer cells. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *70*(8), 941–949.

Prausová, J. (2010) Breast cancer – the major problém also in the 21. century. *Interní medicína*. *12(1)*, 26-32.

Rigalli, J. P., Scholz, P. N., Tocchetti, G. N., Ruiz, M. L., & Weiss, J. (2019). The phytoestrogens daidzein and equol inhibit the drug transporter BCRP/ABCG2 in breast cancer cells: Potential chemosensitizing effect. *European Journal of Nutrition*, *58*(1), 139–150.

Robinson-Rechavi, M., Garcia, H. E., & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*, *116*(4), 585–586.

Romano, S. N., & Gorelick, D. A. (2018). Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors. *General and Comparative Endocrinology*, *261*, 190–197.

Rusidzé, M., Adlanmérini, M., Chantalat, E., Raymond-Letron, I., Cayre, S., Arnal, J.-F., Deugnier, M.-A., & Lenfant, F. (2021). Estrogen receptor-α signaling in post-natal mammary development and breast cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(15), 5681–5705.

Salem, M. (2004). Estrogen, A Double-Edged Sword: Modulation of TH1- and TH2-Mediated Inflammations by Differential Regulation of TH1 / TH2 Cytokine Production. *Current Drug Target – Inflammation & Allergy*, *3*(1), 97–104.

Sayed, Y., & Taxel, P. (2003). The use of estrogen therapy in men. *Current Opinion in Pharmacology*, *3*(6), 650–654.

Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research. 1*(2). 109-126.

Schmitt, E., Dekant, W., & Stopper, H. (2001). Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. *Toxicology in Vitro*, *15*(4–5), 433–439.

Strohsnitter, W. C., Hyer, M., Bertrand, K. A., Cheville, A. L., Palmer, J. R., Hatch, E. E., Aagaard, K. M., Titus, L., Romero, I. L., Huo, D., Hoover, R. N., & Troisi, R. (2021). Prenatal Diethylstilbestrol Exposure and Cancer Risk in Males. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *30*(10), 1826–1833.

Structural Organization of Nuclear Receptors. *Wikipedia.org* [online]. 2.8. 2007 [cit.21.1.2022]. https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor#/media/File:Nuclear_Receptor_Structure.png

Tang, Z.-R., Zhang, R., Lian, Z.-X., Deng, S.-L., & Yu, K. (2019). Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Cells*, *8*(10), 1123.

Thiebaut, C., Vlaeminck-Guillem, V., Trédan, O., Poulard, C., & Le Romancer, M. (2021). Non-genomic signaling of steroid receptors in cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *538*, 111453.

Tsuji, M., Tanaka, T., Nagashima, R., Sagisaka, Y., Tousen, Y., Nishide, Y., Ishimi, Y., & Ishimi, Y. (2018). Effect of daidzein and equol on DNA replication in MCF-7 cells. *The Journal of Biochemistry*, *163*(5), 371–380.

van Meeuwen, J. A., ter Burg, W., Piersma, A. H., van den Berg, M., & Sanderson, J. T. (2007). Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(11), 2319–2330.

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, *321*(3), 288.

Wang, D.-Y., Fulthorpe, R., Liss, S. N., & Edwards, E. A. (2004). Identification of Estrogen-Responsive Genes by Complementary Deoxyribonucleic Acid Microarray and Characterization of a Novel Early Estrogen-Induced Gene: *EEIG1*. *Molecular Endocrinology*, *18*(2), 402–411.

Wang, T. T. Y., Sathyamoorthy, N., & Phang, J. M. (1996). Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*, *17*(2), 271–275.

Weigel, M. T., & Dowsett, M. (2010). Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(4), R245–R262.

Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology*, *4*(3), 192–208.

Weikum, E. R., Liu, X., & Ortlund, E. A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science*, *27*(11), 1876–1892.

Wiik, A., Gustafsson, T., Esbjörnsson, M., Johansson, O., Ekman, M., Sundberg, C. J., & Jansson, E. (2005). Expression of oestrogen receptor α and β is higher in skeletal muscle of highly endurance-trained than of moderately active men. *Acta Physiol Scand*, 8, 105-112.

Willard, S. T., & Frawley, L. S. (1998). Phytoestrogens Have Agonistic and Combinatorial Effects on Estrogen-Responsive Gene Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Endocrine*, *8*(2), 117–122.

World Health Organization (2021). *Breast cancer*. [online]. 26.3. 2021 [cit. 2022-01-19]. Dostupné z: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer

Yakimchuk, K., Jondal, M., & Okret, S. (2013). Estrogen receptor α and β in the normal immune system and in lymphoid malignancies. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *375*(1–2), 121–129.

Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., & Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, *16*(1), 4–20.

Yoon, K.-H., Park, Y., Kang, E., Kim, E.-K., Kim, J. H., Kim, S. H., Suh, K. J., Kim, S. M., Jang, M., Yun, B. L., Park, S. Y., & Shin, H.-C. (2021). Effect of Estrogen Receptor Expression Level and Hormonal Therapy on Prognosis of Early Breast Cancer. *Cancer Research and Treatment*.

Youn, H. J., & Han, W. (2020). A Review of the Epidemiology of Breast Cancer in Asia: Focus on Risk Factors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *21*(4), 867–880.

Zdravotnická ročenka České republiky (2019) [online]. Praha: *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR,* 2020, 37 [cit. 2022-01-19]. Dostupné z: https://www.uzis.cz/res/f/008381/zdrroccz2019.pdf

Zhou, Z., Moore, T. M., Drew, B. G., Ribas, V., Wanagat, J., Civelek, M., Segawa, M., Wolf, D. M., Norheim, F., Seldin, M. M., Strumwasser, A. R., Whitney, K. A., Lester, E., Reddish, B. R., Vergnes, L., Reue, K., Rajbhandari, P., Tontonoz, P., Lee, J., … Hevener, A. L. (2020). Estrogen receptor α controls metabolism in white and brown adipocytes by regulating *Polg1* and mitochondrial remodeling. *Science Translational Medicine*, *12*(555), eaax8096.