

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**SKRÍNING AKTIVITY VYBRANÝCH ALKALOIDOV  
Z ČEĽADÍ *FUMARIACEAE* A *AMARYLLIDACEAE* NA  
FARNEZOIDNÝ X RECEPTOR A RECEPTOR ŽLČOVÝCH  
KYSELÍN SPOJENÝ S G PROTEÍNOM 1**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vedúci diplomovej práce: Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

**PREHLÁSENIE**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne (pod vedením konzultanta). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal(a), sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá na získanie iného či rovnakého titulu.“

## POĎAKOVANIE

Týmto by som chcela srdečne poďakovať prof. PharmDr. Petrovi Pávkovi, Ph.D. za príležitosť byť súčasťou jeho výskumného tímu, za odborné vedenie, profesionálny prístup, cenné rady pri písaní mojej práce, trpezlivosť a čas, ktorý mi v rámci dohľadu nad touto prácou venoval.

Zároveň by som chcela veľmi pekne poďakovať PharmDr. Alžbete Štefela, Ph.D. za odborný dohľad nad mojou prácou, neustálu ochotu, spoluprácu, vecné a praktické rady, priateľský a zároveň profesionálny prístup, trpezlivosť a čas, ktorý mi týmto spôsobom venovala.

Veľké poďakovanie patrí aj prof. Ing. Lucii Cahlíkovej, Ph.D. a doc. PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D., a kolektívu z katedry farmakognózie a farmaceutickej botaniky za spoluprácu v rámci skúšaných alkaloidov.

**ABSTRAKT**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študent/ka: Miriam Hutníková

Školitel': prof. PharmDr. Petr Pávek, PhD.

Názov diplomovej práce: Skrínig aktivity vybraných alkaloidov z čeľadí *Fumariaceae* a *Amaryllidaceae* na Farnezoidný X receptor a Receptor žlčových kyselín spojený s G proteínom 1

Farnesoidní X receptor (FXR) a receptor žlučových kyselin spojený s G proteinem 1 (TGR5) výrazně ovlivňují metabolické děje v lidském organismu. Byla objevena i role FXR při neuronální apoptóze u Alzheimerovy choroby (AD). Možná strukturní podobnost malých lipofilních molekul vážících se na tyto receptory a alkaloidů vyskytujících se v rostlinách *Corydalis cava* a *Narcissus pseudonarcissus*, a zároveň bohaté využití těchto rostlin v lidové medicíně, představuje potenciální terapeutický cíl těchto molekul. V našich skrínigových metodách jsme provedli testy pomocí luciferázové genové reportérové eseje na určení schopnosti zkoumaných alkaloidů interagovat s FXR a TGR5 receptory v buněčné linii HepG2. Mnoho derivátů prokázalo silnou schopnost antagonizovat FXR a TGR5 aktivovaný kyselinou obeticholovou (OCA), resp. lithocholovou (LCA) v této eseji. Naopak některé testované látky prokázaly schopnost potencovat účinky OCA nebo LCA. Testy na cytotoxicitu byly provedeny k vyloučení cytotoxických účinků zkoumaných látek na živé buňky. Na základě těchto testů se potvrdila cytotoxicita nebo vliv na viabilitu mnoha derivátů, které jsme z následného zkoušení vyloučili. Dále jsme u FXR provedli bezbuněčný test TR-FRET (časově rozlišený fluorescenční rezonanční přenos energie), abychom určili schopnost alkaloidů vázat se přímo na doménu vážící ligand rekombinantního FXR. I tímto experimentem jsme potvrdili antagonistické vlastnosti (-)-kanadinu a (+)-korydalinu, ze kterých jsme následně vyhodnotili jejich IC<sub>50</sub> (střední inhibiční koncentraci) na základě CRC (křivky závislé na koncentraci). U hippeastrinu, který byl schopen potencovat účinky LCA v genové reportérové eseji jsme provedli zkoušky na určení těchto schopností i u dalších derivátů žlučových kyselin a navrhli následní postupy jeho zkoušení. Tyto údaje vyžadují další studie, které by potvrdily možné potenciální léčebné využití.

**ABSTRACT**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Miriam Hutníková

Supervisor: Prof. PharmDr. Petr Pávek, PhD.

Title of diploma thesis: Screening of selected alkaloids of *Fumariaceae* and *Amaryllidaceae* families on the farnesoid X receptor and the G protein coupled receptor 1

Farnesoid X receptor (FXR) and bile acid receptor associated with G protein 1 (TGR5) significantly affect metabolic processes in the human body. The role of FXR in neuronal apoptosis in Alzheimer's disease (AD) has also been discovered. The possible structural similarity of the small lipophilic molecules binding to these receptors and the alkaloids found in the plants *Corydalis cava* and *Narcissus pseudonarcissus*, as well as the rich use of these plants in traditional medicine, represent a potential therapeutic intervention for these molecules. In our screening methods, we performed tests using a luciferase gene reporter assay to determine the ability of the alkaloids to interact with FXR and TGR5 in the HepG2 cell line. Many derivatives have shown a strong ability to antagonize FXR and TGR5 activated by obethicholic (OCA) or lithocholic (LCA) acids in this assay. Some of the compounds also demonstrated the ability to potentiate the effects of OCA or LCA. Cytotoxicity assays were performed to exclude the cytotoxic effects of tested substances on living cells. Based on these tests, the toxicity or effects on viability of many derivatives were confirmed, which we excluded from the subsequent testing. We also performed a TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) cell-free assay on FXR to determine the ability of alkaloids to bind directly to the ligand-binding domain of recombinant FXR, where the antagonistic properties of (-)-canadine and (+)-corydalin were confirmed. We subsequently evaluated their IC<sub>50</sub> (mean inhibitory concentration) based on CRC (concentration-dependent curves). For hippeastrin, which was able to potentiate the effects of LCA in a gene reporter assay, we performed tests to determine these abilities in other bile acid derivatives and proposed subsequent testing procedures. These data warrant further studies to demonstrate potential therapeutic utility.

*The study was supported by InoMed OP VV and SVV 260 549 projects*

**OBSAH**

Prehlásenie .....	2
Podakovanie.....	3
Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
1. Zoznam skratiek .....	9
2. Úvod.....	14
3. Teoretická časť .....	15
3.1. Nukleárne receptory a ich štruktúra .....	15
3.2. Princípy regulácie nukleárných receptorov .....	18
3.3. Farnesoidný X receptor (FXR) .....	19
3.3.1. Role FXR v metabolizme žlčových kyselín.....	20
3.3.2. Role FXR v metabolizme lipidov.....	22
3.3.3. Role FXR v metabolizme glukózy .....	23
3.3.4. Role FXR v ovplyvnení Alzheimerovej choroby.....	23
3.4. Receptory spojené s G proteínom a ich štruktúra .....	26
3.5. Princíp regulácie receptorov spojených s G proteínom .....	26
3.6. Receptor žlčových kyselín spojený G proteínom (GPBAR1/TGR5).....	28
3.6.1. Role TGR5 v ovplyvnení pečenej fibrózy.....	30
3.6.2. Role TGR5 v ovplyvnení autoimunitnej hepatitídy a hepatitídy B.....	32
3.6.3. Role TGR5 v ovplyvnení nealkoholickej steatohepatitídy .....	33
3.6.4. Role TGR5 v ovplyvnení portálnej hypertenzie .....	34
3.7. <i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. a Koerte ako zástupca čeľade Fumariaceae .....	35
3.7.1. Morfológický popis .....	35
3.7.2. Taxonomické zaradenie.....	35
3.7.3. Obsahové látky a použitie .....	36
3.8. <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. cv. Dutch Master ako zástupca čeľade amaryllidaceae. 37	

3.8.1. Morfológický popis .....	37
3.8.2. Taxonomické zaradenie.....	38
3.8.3. Obsahové látky a použitie .....	38
4. Ciele práce.....	40
5. Experimentálna časť.....	41
5.1. Experimentálne metódy.....	41
5.1.1. Génová reportérová esej (gene reporter assay) .....	41
5.1.2. Cytotoxicita (cytotoxicity assay).....	42
5.1.3. Časovo rozlíšený fluorescenčný rezonančný prenos energie .....	42
(time-resolved fluorescence resonance transfer of energy, TR-FRET).....	42
5.2. Použitá bunecná línia a práca s bunkami .....	44
5.3. Pomôcky a prístroje.....	45
5.4. Použité chemikálie .....	46
5.5. Skúmané látky (Použité alkaloidy) .....	48
5.6. Štatistická analýza dát .....	54
6. Výsledky.....	56
6.1. Génová reportérová esej.....	56
6.1.1. FXR agonizmus.....	56
6.1.2. FXR antagonizmus .....	58
6.1.3. TGR5 agonizmus.....	59
6.1.4. TGR5 antagonizmus.....	61
6.1.5. Celkové vyhodnotenie dát.....	63
6.2. Cytotoxicita .....	63
6.2.1. Cytotoxicita u všetkých látok.....	64
6.2.2. Vyhodnotenie cytotoxicity u všetkých látok.....	69
6.2.3. Cytotoxicita hippeastrinu .....	69
6.2.4. Vyhodnotenie cytotoxicity hippeastrinu .....	72
6.2.5. Cytotoxicita (-)-kanadinu a (+)-korydalinu.....	72

6.2.6. Vyhodnotenie (-)-kanadinu a (+)-korydalinu.....	73
6.3. Následné génové reportérové eseje u Hippeastrinu .....	74
6.3.1. Vyhodnotenie .....	74
6.4. Časovo rozlišený fluorescenčný rezonančný prenos energie (TR-FRET).....	75
6.4.1. Vyhodnotenie .....	76
6.5. Polovičná inhibičná koncentrácia.....	76
6.5.1. Vyhodnotenie .....	77
7. Diskusia.....	79
8. Záver.....	83
9. Literatúra .....	85



## 1. ZOZNAM SKRATIEK

(-)-canad.	(-)-kanadin
(-)-scouler.	(-)-skoulerin
(-)-stylop.	(-)-stylopin
(+)-canad.	(+)-kanadin
(+)-coryd.	(+)-korydalin
(+)-corypal.	(+)-korypalmin
(+)-tetrah.	(+)-tetrahydropalmin
(+)-thalictr.	(+)-thaiktrikavin
9-O-dem.	9-O-demetylhomolykorin
Ab	amyloid beta
AD	Alzheimerova choroba
Agon	agonizmus, môže sa rozumieť aj agonista, schopnosť viazať sa na receptor a aktivovať ho
AchE	acetylcholínesteráza
Ambe.	ambelin
Antago	antagonizmus, môže sa rozumieť aj antagonista, schopnosť viazať sa na receptor bez jeho aktivácie a brániť účinkom agonistu
BA	žľčové kyseliny (bile acids)
BDNF	neurotrofický faktor pochádzajúci z mozgu (brain derived neurotrophic factor)
BSEP	exportná pumpa žľčových solí
CA	kyselina cholová
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (dôležitý transkripčný prvok potrebný pre pamäť a prežitie neurónov)
Caran.	karanin

CDCA	kyselina chenodeoxycholová
cDNA	komplementárna DNA
CRC	krivka závislá na koncentrácií (concentration response curves)
CREB	proteín viažuci sa na element cAMP, dôležitý transkripčný prvok potrebný pre pamäť a prežitie neurónov
Crin.	krinin
CT	cytotoxicita
Ctrl.	kontrola (z angl. control), rozumie sa kontrolná porovnávacía vzorka
DBD	DNA-viažuca doména receptora
DCA	kyselina deoxycholová
DMEM	médium (z angl. Dulbecco's modified Eagles's medium)
DMSO	dimetylsulfoxid
dNTP	deoxynukleosidtrifofáty
EC <sub>50</sub>	stredná efektívna koncentrácia (polovica maximálnej efektívnej koncentrácie)
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
Epimar.	Epimaritidin
FRET	fluorescenčný rezonančný prenos energie (fluorescence resonance tranfer of energy)
ET-1	angiotenzín 1
FXR	farnezoidný X receptor
Galan.	galantin
Galanta.	galantamin
GDP	guanosindifosfát
GLP-1	glukagónu podobný peptid 1
GTP	guanosintrifosfát

Haema.	hemantamin
HBV	vírus hepatitídy B
HDL	lipoproteíny s vysokou hustotou (antiaterogénne pôsobenie)
HeLa	ľudské epitelové bunky z maligného karcinomu krčka maternice
HepG2	kultivované ľudské hepatocyty
Hippe.	hippeastrin
HNF-4	nukleárny faktor hepatocytov 4, koaktivátor FXR v pečeni (hepatocyte nuclear faktor 4)
Homo.	homolykorin
HSC	pečeňové hviezdicové bunky
IC <sub>50</sub>	stredná inhibičná koncentrácia (polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie)
IL-10	interleukín 10 s protizápalovým účinkom
LBD	ligand viažuca doména receptoru (ligand binding domain)
LCA	kyselina litocholová
LDL	lipoproteíny s nízkou hustotou (uplatňujú sa v rozvoji artériosklerotických zmien)
LESC	limbálne epitelové kmeňové bunky
LRH-1	partner monoméneho jadrového receptora pre FXR, koaktivátor
Lycoren.	lykorenin
Lycori.	Lykorin
Mass.	masonin
MCA	muricholová kyselina
MDR3	P-glykoproteín 3, transporter žlčových kyselín do žlčovodu
Mont.	montanin
mRNA	informačná (messengerová) RNA

MRP2	MRP proteín 2, transporter žlčových kyselín do žlčovodu
MTS	tetrazoliová zlúčenina využívajúca sa na pri teste na cytotoxicitu
MTT test	kolorimetrická metóda určená na meranie cytotoxicity testovaných látok na základe zmien v metabolickej aktivite buniek
NO	oxid dusnatý
NR	nukleárny (hormonálny) receptor (nuclear receptor)
NTCP- Na <sup>+</sup>	taurocholátový kotransportujúci polypeptid
OCA	kyselina obeticholová
Odul.	odulin
Pank.	pankracín
PBS	fosfátový pufor (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PDGF	rastový faktor odvodený od krvných doštičiek
PPAR $\alpha$	receptor aktivovaný proliferátorom peroxizómu alfa (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alfa)
RT	reverzná transkripcia
RT-PCR	polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (real-time PCR)
RXR	retinoidný X receptor
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecyl sulfates)
SHP	transkripčný korepresor indukovaný žlčovými kyselinami (Small Heterodimer Partner)
SHR	steroidné hormonálne receptory (patria tu receptory pre glukokortikoid, progesterón, estrogén, androgén a mineralokortikoidy)
SREBP-1c	kľúčový lipogénny aktivátor FXR
Tazz.	tazetin
TCA	kyselina taurocholová

TGF- $\beta$	transformujúci rastový faktor $\beta$ (TGF- $\beta$ )
TGR 5	receptor žlčových kyselín spojený s G proteínom 1, známy aj ako GPBAR1 (G-protein coupled bile acid receptor/ Takeda G-protein receptor 5)
TLCA	taurolitocholová kyselina
T-NKT	imunoreaktívne prirodzené zabíjačské T bunky (Immunoreactive natural killer)
TR-FRET	fluorescenčný rezonančný prenos energie s rozlíšením času (time-resolved fluorescence resonance transfer of energy)
UDCA	ursodeoxycholová kyselina
Vitt.	vitamin
VLDL	lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou

## 2. ÚVOD

Farnesoidný X receptor (FXR) a receptor žlčových kyselín spojený s G proteínom 1 (TGR5) sú dôležitými článkami v regulácii mnohých metabolických dejov v ľudskom organizme a predstavujú významné ciele pri liečbe metabolických ochorení (*Donkers et al. 2019, Ma et al. 2021*). Nedávno bola tiež objavená úloha FXR pri neuronálnej apoptóze pri Alzheimerovej chorobe (AD) (*Chen et al. 2019*).

V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na štúdium aktivity alkaloidov, izolovaných z rastlín *Corydalis cava* a *Narcissus pseudonarcissus* z čeľadí *Fumariaceae* a *Amaryllidaceae*, na receptory FXR a TGR5. Vychádzali sme z hypotézy širokého uplatnenia týchto rastlín v ľudskej medicíne, nielen pri liečbe AD, ale aj ďalších porúch organizmu. Používali sme izochinolinové alkaloidy, konkrétne protoberberínového typu, ako jedny z hlavných obsahových látok predovšetkým rastliny *Corydalis cava* (*Chlebek et al. 2011*), v dôsledku čoho sme zároveň sme pri výskume vychádzali z možnej štruktúrnej podobnosti protoberberínového kruhu s cyklopentanoperhydrofenantrénovým kruhom, ktorý tvorí základnú štruktúru malých lipofilných (steroidných) zlúčenín, prirodzene sa viažucich na skúmané typy receptorov (*Ma et al. 2021*).

V prípade potvrdenia našej hypotézy a väzbe skúmaných látok na skúmané typy receptorov, či už ako agonisti alebo antagonisti, môžeme predpokladať ovplyvnenie rôznych metabolických dráh regulovaných FXR a TGR5, čo môže predstavovať veľmi významný potenciálny terapeutický cieľ týchto molekúl, využiteľný nielen v liečbe metabolických ochorení, ale aj v terapii AD, nakoľko znížením expresie FXR alebo jeho inhibíciou v mozgu je možné znížiť apoptózu neurónov indukovanú ukladaním amyloidu beta (*Chen et al. 2019*).

### 3. TEORETICKÁ ČASŤ

Receptory sú bunkové makromolekuly, ktoré sú priamo a špecificky spojené s prenosom určitého chemického signálu v bunke alebo s prenosom tohto signálu medzi bunkami. Pri spojení endogénnej látky, čím môžu byť napríklad hormóny, neurotransmitéry či mediátory, alebo exogénnej látky, napr. liečiva, s daným receptorom, dochádza k zmene bunkovej funkcie, v prípade liečiva vedúcej k účinku. Poznáme niekoľko základných typov receptorov, a to sú:

1. Tzv. iónotropné receptory (iónové kanály otvárané ligandom),
2. Tzv. metabotropné receptory (receptory spojené s G proteínom),
3. Tzv. receptory s kinázovou aktivitou,
4. Tzv. nukleárne receptory (jadrové receptory) (*Rang et al. 2007*).

V tejto práci sa zaoberáme práve metabotropnými receptormi, medzi ktoré patrí receptor žľčových kyselín spojený s G proteínom 1 (TGR5) a nukleárnymi receptormi, medzi ktoré patrí farnezoidný X receptor (FXR).

#### 3.1. Nukleárne receptory a ich štruktúra

Farnezoidný X receptor (FXR) patrí do skupiny nukleárnych hormonálnych receptorov (NR), presnejšie do rodiny ligandom indukateľných transkripčných faktorov, ktorých členovia zdieľajú dve štrukturálne konzervované domény:

- a) centrálnu DNA väzbovú doménu, cieľiacu receptor na špecifické sekvencie DNA,
- b) ligand viažucu doménu (LBD), ktorá viaže malé lipofilné hormóny.

LBD funguje ako molekulárny spínač a väzba vhodného ligandu na LBD spôsobuje konformačné zmeny, vedúce k uvoľneniu naviazaných korepresorových proteínov a náboru koaktivátorových proteínov, regulačných proteínov modifikujúcich transkripčnú aktivitu nukleárnych receptorov, na miesto väzby DNA, čo napokon vedie k transkripcii cieľových génov. Regulácia transkripčných faktorov NR malými lipofilnými hormónmi robí z tejto rodiny receptorov ideálne ciele pre výskum potenciálne sa viažucich ligandov s malými molekulami (*Downes et al. 2003*).

Poznáme rôzne typy nukleárnych receptorov. Konkrétne je známych šesť pod-rodín NR 1-6 s rôznymi skupinami a individuálnymi génmi. Väčšina NR má rovnakú základnú štruktúru (*Khan et al. 2003*).

NR sa vo všeobecnosti riadia štandardným plánom s odlišnými funkčnými doménami. N-koniec NR, niekedy nazývaný modulátor alebo hypervariabilná alebo A/B doména, má tzv. aktivačnú funkciu 1 (AF-1), čo je vlastne transaktivačná aktivita. Táto aktivačná doména má kyslý charakter a je konštitutívne funkčná alebo je od ligandu nezávislá. Sekvencia a dĺžka domény A/B majú vysokú variabilitu medzi receptormi a medzi jednotlivými podtypmi receptorov. Táto oblasť obsahuje rôzne rozpoznávacie kinázové sekvencie a je najčastejším miestom alternatívneho zostrihu a sekundárnych štartovacích miest, čím sa predpokladá, že variabilné N-koncové sekvencie môžu byť zodpovedné za receptorovo, bunkovo a druho špecifické účinky, ako aj za vlastnosti transaktivácie NR, ktoré sú závislé od vlastností promótoru (*Khan et al. 2003*).

DNA väzbová doména (DBD) alebo C-doména slúži na sprostredkovanie väzby NR na ich elementy odozvy vo svojich cieľových promótoroch. Táto doména je tvorená z dvoch zinkových prstov a je zároveň najzachovalejšou časťou v rámci nad-rodiny NR (*Khan et al. 2003*).

Prvý zinkový prst obsahuje proximálnu alebo P-boxovú oblasť, alfa helix, ktorý je zodpovedný za rozpoznanie „polovičného miesta jadra“ prvku odpovede s vysokou afinitou. Druhý zinkový prst tvorí distálny alebo D-box, alfa-helix, ktorý leží kolmo na špirálu P-boxu a je miestom, kde prebieha dimerizácia receptora. NR sa môžu viazať na DNA troma spôsobmi. Ako heterodiméry, homodiméry alebo monoméry, čo závisí od triedy receptora. Stručný prehľad podskupín členov rodiny jadrových receptorov rozdelených na základe zdroja a typu ich ligandov môžeme vidieť na Obr. 1b. Receptory steroidných hormónov, receptory pre glukokortikoid, progesterón, estrogén, androgén a mineralokortikoidy (GR, PR, ER, AR, MR), sa viažu na DNA ako homodiméry a rozpoznávajú prvok palindromickej odozvy. Avšak receptory štítnej žľazy, retinoidov, vitamínu D a peroxizómových proliferátorových receptorov (TR, RAR, VDR a PPAR), farnozoidný X receptor, pečeneňový X receptor a jadrový faktor hepatocytov (FXR, LXR a HNF), ako aj väčšina receptorov pre siroty, sa viažu na DNA ako heterodimér s retinoidným X receptorom (RXR) (príklad vid' obr. 1c). Avšak kvôli trojrozmernej štruktúre heterodimérneho komplexu RXR je väzbová afinita k DNA odlišná (*Khan et al. 2003*).

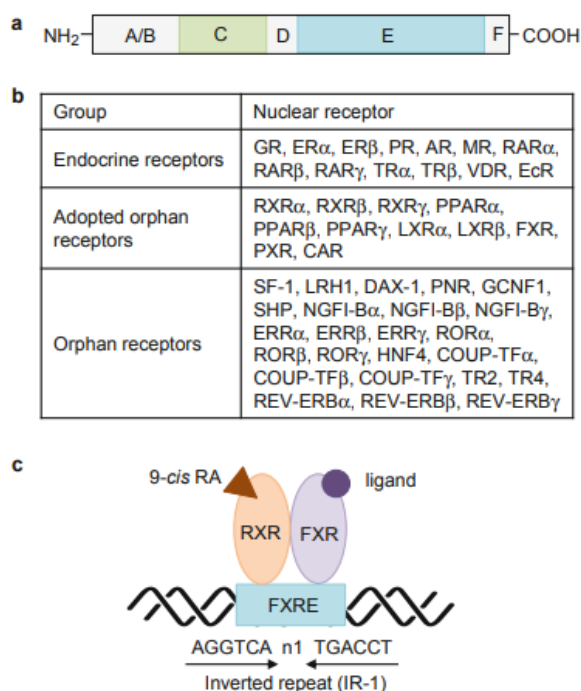
Priamo na DNA viažucu doménu nadväzuje D alebo pántová doména. Pántová doména nemá jasne definovanú funkciu, avšak obsahuje karboxy-terminálne rozšírenie DBD, ktoré sa môže podieľať na rozpoznávaní predĺženého 5' konca elementov odozvy nukleárných receptorov. Zdá sa, že D-doména umožňuje, po väzbe ligandu, konformačné zmeny receptora.



Môže tiež obsahovať znaky lokalizácie jadra a miesta interakcie proteínu s proteínom (*Khan et al. 2003*).

Sekvencia domény viažucej ligand (LBD) alebo E/F domény sa medzi jednotlivými NR výrazne líši, ale všetky majú štruktúru 10 až 13 alfa-helixov umiestnených okolo hydrofóbnej väzbovej kapsy. Zvyšky štruktúry vo väzbovej kapse sú špecifické a určujú, či LBD bude akceptorom steroidných hormónov, retinoidných zlúčenín alebo xenobiotických ligandov, ktoré ovplyvňujú funkciu receptora. Pre aktiváciu receptora, ktorá je závislá od ligandu, je nutná prítomnosť aktivačnej funkcie 2 (AF-2), umiestnenej na C konci NR. Okrem toho LBD tiež môže obsahovať signály jadrovej lokalizácie, proteínovú interakciu s dimerizačnými motívmi pre proteíny tepelného šoku, koregulátory a ďalšie transkripčné faktory (*Khan et al. 2003*).

Jednoduchý schematický prehľad štruktúry nukleárných receptorov môžeme vidieť na obrázku 1a.



Obrázok 1 a- Schematický prehľad štruktúry nukleárných receptorov, b- podskupiny členov rodiny jadrových receptorov rozdelené na základe zdroja a typu ich ligandov, c- väzba heterodiméru FXR/RXR na FXRE, ktorý je uvedený ako príklad

Obrázok prevzatý (*Shin a Wang 2019*).

### 3.2. Princípy regulácie nukleárných receptorov

Mechanizmus účinku nukleárných hormonálnych receptorov sa delí na dve základné formy v závislosti od typu receptorov, steroidné hormonálne receptory (SHR) alebo retinoidné/tyreoidné/vitamínové D receptory (*Khan et al. 2003*).

Prvá skupina SHR v neprítomnosti ligandu sú transkripčne neaktívne a sú sekvestrované vo veľkom komplexe obsahujúcom receptor, proteíny tepelného šoku (napr. HSP 70, HSP 90) a ďalšie proteíny. Tento neaktívny komplex možno pozorovať v bunečnej cytoplazme alebo môže byť lokalizovaný v jadre v závislosti od typu bunky a skúmaných podmienok. Všeobecne známe však je, že SHR sú lokalizované v cytosole, kde sa nachádzajú vo forme bez ligandu. Po väzbe hormónu na receptor možno pozorovať konformačnú zmenu v štruktúre receptoru, čo predstavuje začiatok procesu prenosu signálu. V prípade tejto pod-rodiny SHR väzba hormónov vyvoláva disociáciu proteínov tepelného šoku a uvoľnenie monoméneho receptora z komplexu. Je tiež známe, že konformačné zmeny v štruktúre receptora indukované agonistami sú podobné, ale odlišné od tých, ktoré produkujú antagonisti. Zdá sa však, že obe konformácie sú nekompatibilné s väzbou proteínov tepelného šoku (*Khan et al. 2003*).

Druhá skupina receptorov, retinoidné/tyreoidné/vitamínové D receptory, pod-rodina NR (ktorá zahŕňa FXR), sú v neprítomnosti ligandu lokalizované prevažne v bunečnom jadre a neinteragujú výrazne s proteínmi tepelného šoku. Možným vylúčením z tohto pravidla môže byť PPAR $\alpha$  receptor (receptor aktivovaný proliferátorom peroxizómu alfa, z angl. Peroxisome Proliferator- Activated Receptor  $\alpha$ ) podľa Brunt et al. (2011) regulujúci predovšetkým oxidáciu a transport mastných kyselín, ktorý interaguje s proteínom tepelného šoku 70 a 90 a nachádza sa v cytosole aj v jadre vo svojej neaktívnej forme. Niektoré NR tejto skupiny bez naviazaného ligandu môžu interagovať s DNA a pôsobiť ako transkripčné represory, čo môže byť výsledkom interakcie s korepresorovými proteínmi. Výnimkou je konstitutívne aktívny receptor (CAR), ktorý je transkripčne aktívny v neprítomnosti ligandu. Hormónmi indukované konformačné zmeny tejto skupiny NR ukazujú, že zmena tvaru receptora pomocou ligandu je základným krokom v aktivačnej dráhe (*Khan et al. 2003*).

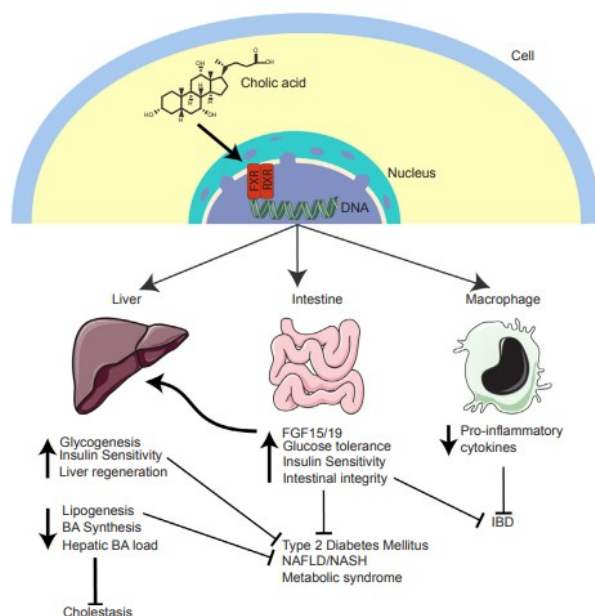
Receptory pod-rodiny glukokortikoidných hormónov (ktorá zahŕňa ER, AR a PR) sa viažu na DNA vo forme homodimérov. TR, RAR, VDR, PPAR a väčšina osamotených receptorov vytvárajú heterodiméry s inými členmi nad-rodiny intracelulárných receptorov a skupina TR, RAR, PPAR a VDR môžu využívať RXR ako partnera na tvorbu heterodimérov (viď. Obr 1c). Miesto kontaktu DNA závisí od určitých sekvencií v rámci C-domény, menovite proximálnych (P-box) a distálnych (D-box) motívov zinkových prstov. P-box určuje rozpoznanú polovičnú

lokalitu, zatiaľ čo úlohou D-boxu je určenie rozostupu medzi polovičnými lokalitami. Po aktivácii SHR receptorov sú tieto receptory schopné interagovať s DNA a obe triedy NR (SHR a TR/RAR) tak môžu získavať koaktivátory. Následne komplex NR naviazaný na DNA je substrátom pre všeobecný transkripčný aparát a iniciuje sa proces transkripcie (*Khan et al. 2003*).

### 3.3. Farnezoidný X receptor (FXR)

Farnezoidný X receptor (FXR), známy aj ako receptor žlčových kyselín, je ligandom aktivovaný transkripčný faktor a člen nad-rodiny jadrových receptorov, ktorý je častým objektom výskumov za posledné roky, kedy boli objasnené mnohé z jeho rolí. Bolo zistené, že tento receptor má rozhodujúcu úlohu pri kontrole homeostázy žlčových kyselín, metabolizmu lipoproteínov a glukózy, regenerácii pečene, raste črevných baktérií a odpovedi na hepatálne toxíny. Agonisti FXR by teda mohli byť užitoční napríklad pri liečbe cukrovky, cholesterolových žlčových kameňov a hepatálnej a črevnej toxicity (*Donkers et al. 2019*).

Abnormálne zvýšené hladiny lipidov a glukózy v dôsledku narušenia metabolickej homeostázy sú hlavným znakom metabolických ochorení. Súhrn týchto metabolických dejov nazývame metabolický syndróm. Medzi hlavné varovné signály metabolického syndrómu patrí dyslipidémia, abdominálna obezita a inzulínová rezistencia. V súčasnej dobe sa výskyt metabolického syndrómu globálne zvyšuje vysokou rýchlosťou. Primárny jadrový receptor žlčových kyselín, FXR, reguluje expresiu cieľových génov v reakcii na signalizáciu žlčových kyselín v enterohepatálnych tkanivách a tým je zodpovedný za kontrolu hladín lipidov a glukózy (vid'. Obr 2). Deregulácia transkripčnej signalizácie jadrových receptorov je dôležitým prostredníkom vo vývoji metabolických ochorení. Preto zacielenie na ovplyvnenie FXR môže predstavovať molekulárnu stratégiu pre vývoj farmakologických činidiel na liečbu metabolického syndrómu (*Kemper 2011*).



Obrázok 2 Signalizačný efekt žľových kyselín prostredníctvom aktivácie FXR receptora

Obrázok prevzatý: (Donkers et al. 2019).

Predmetom najnovších výskumov bol aj predpoklad využitia ovplyvnenia FXR v liečbe Alzheimerovej choroby, nakoľko bolo zistené, že je exprimovaný aj v mozgu, avšak jeho rola v ovplyvnení AD nie je doposiaľ jasne objasnená (Chen et al. 2019).

### 3.3.1. Role FXR v metabolizme žľových kyselín

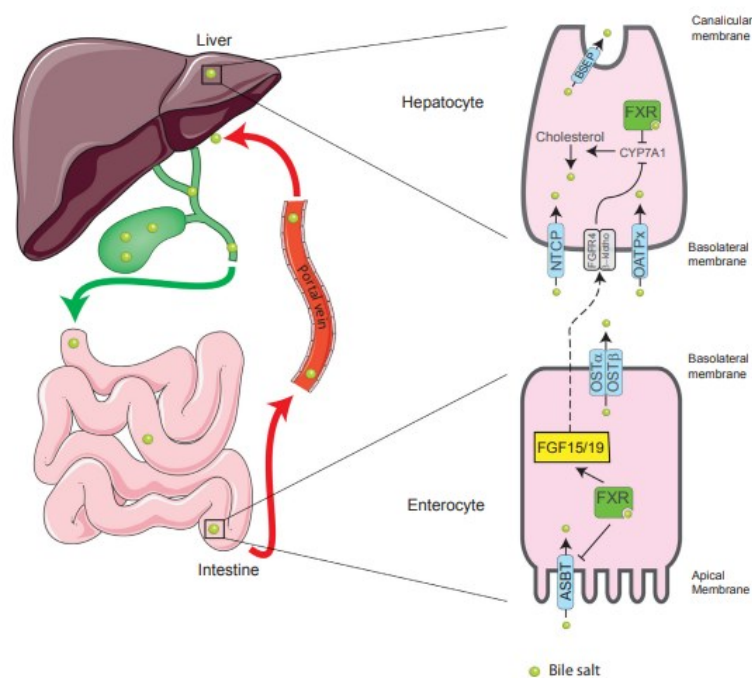
Rola FXR pri udržiavaní homeostázy žľových kyselín tkvie v regulácii každého aspektu metabolizmu žľových kyselín vrátane syntézy, transportu a doplňovania žľníka. Tento receptor sníma hladiny žľových kyselín a pri ich zvýšení v pečeni inhibuje biosyntézu pečňových žľových kyselín z cholesterolu. To vykonáva indukciou „Small Heterodimer Partner“ (SHP), čo je neobvyklý sirotsky nukleárny receptor, ktorý pôsobí ako transkripčný korepresor indukovaný žľovými kyselinami. SHP sa nepriamo viaže na svoje cieľové NR a tvorí nefunkčné heterodiméry s aktivátormi väzby DNA, čím bráni transkripčnej aktivite NR (Kemper 2011).

SHP taktiež inhibuje expresiu cholesterol  $7\alpha$  hydroxylázy (CYP7A1), enzýmu, ktorý obmedzuje rýchlosť biosyntézy žľových kyselín z cholesterolu (prvý krok syntézy žľových kyselín z cholesterolu), blokovaním aktivácie pečňových aktivátorov, LRH-1, čo je partner monoméneho jadrového receptora pre FXR, a HNF-4 $\alpha$ , na promotóre (Kemper 2011).

Okrem toho FXR reguluje expresiu transportérov žľových kyselín, čím chráni pečeň pred zvýšenými hladinami týchto žľových kyselín. Obmedzuje vstup črevných žľových kyselín do hepatocytov znížením expresie  $\text{Na}^+$ -taurocholátového kotransportujúceho polypeptidu (NTCP), transportéra, zodpovedného za import pečenej žľových kyselín (Kemper 2011).

Ďalšia funkcia FXR tkvie v odtoku žľových kyselín z pečene indukciou expresie exportnej pumpy žľových solí (BSEP), proteínu 2 (MRP2) a P-glykoproteínu 3 (MDR3), z ktorých posledné dva sa vyznačujú mnohonásobnou liekovou rezistenciou. Transportéry BSEP, MRP2 a MDR3 sú zodpovedné za transport žľových kyselín do žľovodu cez kanalikulárnu membránu. Žľ sa ukladá v žľčníku a jej hlavnými komponentmi sú žľové kyseliny spolu s cholesterolom a fosfolipidmi. Predošlé výskumy preukázali, že FXR indukuje transportéry žľových kyselín, BSEP a MDR2. To vedie k zvýšeniu hladín žľových kyselín v žľčníku a zabraňuje kryštalizácii cholesterolu v žľči, čím hrá FXR rozhodujúcu úlohu pri prevencii tvorby žľových kameňov (Kemper 2011).

Ako bolo opísané vyššie, schematický prehľad cirkulácie žľových kyselín v enterohepatálnych tkanivách a podrobnejší transport a signalizáciu žľových kyselín v enterocyte a hepatocyte môžeme vidieť na obr. 3.



Obrázok 3 Schematický prehľad enterohepatálnej cirkulácie žľových kyselín, transport a signalizácia žľových kyselín v enterocyte a hepatocyte

Obrázok prevzatý: (Donkers et al. 2019).

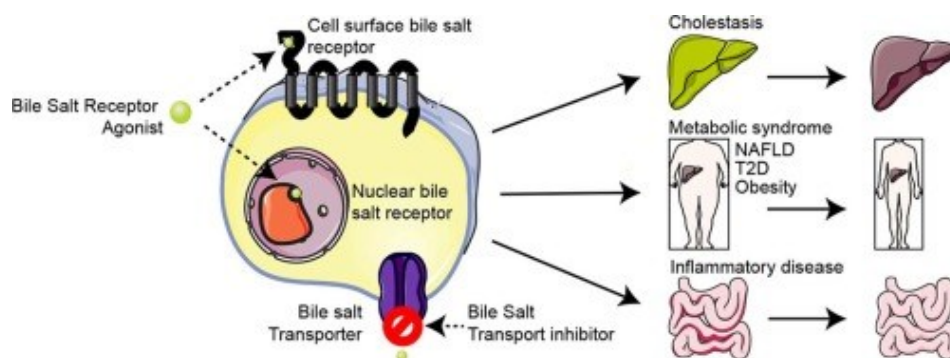
### 3.3.2. Role FXR v metabolizme lipidov

Homeostáza lipidov prebieha v čreve a pečeni. Sú teda hlavnými orgánmi regulujúcimi získavanie, syntézu a metabolizmus cholesterolu. Nadbytočný cholesterol z potravy sa buď premieňa na žľčové kyseliny v pečeni, alebo je exkrétovaný žľčou do čreva. Farnezooidný X receptor jadrového hormónového receptora (NR) hrá rolu v regulácii oboch týchto metabolických dejov. FXR sa nachádza v pečeni a čreve, ako aj v iných tkanivách bohatých na cholesterol, napríklad nadobličky (*Downes et al. 2003*).

Aktivácia FXR znižuje hladinu triglyceridov v pečeni a je možné využiť terapeutické účinky agonistov FXR pri nealkoholickom tukovatení pečene (*Downes et al. 2003*).

FXR v pečeni reguluje metabolizmus mastných kyselín, triglyceridov a lipoproteínov komplexne. Predchádzajúce klinické štúdie dokazujú, že liečba dyslipidemických pacientov živicom viažucou žľčové kyseliny vedie k zníženiu hladín cholesterolu, ale aj k nežiaducim vedľajším účinkom zvýšenými plazmatickými hladinami triglyceridov a VLDL cholesterolu. Naopak, podávanie žľčových kyselín ľuďom alebo zvieratám preukázateľne znižuje hladiny triglyceridov v plazme a zároveň znižuje hladiny HDL, čo je nežiaduce. Bolo dokázané, že aktivácia FXR vedie k zníženiu pečenej expresie SREBP-1c, kľúčového lipogénneho aktivátora, a zvýšenej expresii PPAR $\alpha$ , ktorá podporuje  $\beta$ -oxidáciu mastných kyselín. Liečba agonistami FXR tiež vedie k zvýšenej expresii VLDL receptora, ktorý podporuje klírens triglyceridov a okrem toho aktivácia FXR vedie k zvýšenej expresii apolipoproteínu C II, ktorý koaktivuje lipoproteínovú lipázu, ale k zníženiu expresie apolipoproteínu C III, ktorý pôsobí ako inhibítor lipoproteínovej lipázy (*Kemper 2011*).

Na základe týchto štúdií môžeme povedať, že aktivácia FXR syntetickými alebo prírodnými ligandami má priaznivé metabolické výsledky v niektorých metabolických dráhach (viď Obr. 4), ale nežiaduce účinky v iných, najmä pri biosyntéze HDL (*Kemper 2011*).



Obrázok 4 Účinky agonistov receptorov žľových kyselín v čreve a pečeni

Obrázok prevzatý: (Donkers et al. 2019).

### 3.3.3. Role FXR v metabolizme glukózy

V liečebnom využití antagonisti FXR taktiež preukazujú prospešné úlohy pri regulácii homeostázy glukózy a citlivosti na inzulín, nakoľko FXR hrá dôležitú úlohu pri kontrole hladín glukózy. Bolo zistené, že normálna glukózová homeostáza je bez FXR narušená rozvojom inzulínovej rezistencie a hyperglykémie, čo je pravdepodobne spôsobené zvýšenými hladinami mastných kyselín. Aktivácia FXR, podľa výskumov Zhanga s kolektívom (Zhang et al. 2006), vedie k zlepšeniu citlivosti na inzulín a glukózovej tolerancii (vid'. Obr. 2), čo bolo skúmané u diabetických obéznych myší. Liečba diabetických myší s agonistami FXR alebo hepatálna expresia konštitutívne aktívneho FXR (konkrétne typu FXR-VP16) viedla k významnému zníženiu hladín glukózy v plazme a zlepšeniu citlivosti na inzulín (Kemper 2011).

### 3.3.4. Role FXR v ovplyvnení Alzheimerovej choroby

Alzheimerova choroba (AD) je najčastejšou príčinou demencie. Je charakterizovaná predovšetkým ukladaním amyloidu beta (Ab), v mozgu, čo vedie k apoptóze neurónov v hippocampe. Okrem toho sa v mozgu pacientov s AD taktiež nachádza hyperfosforylovaný tau proteín, čo znamená, že má nadmerné množstvo fosforylovaných aminokyselín a následkom toho sa molekuly tau proteínu v neurónových bunkách zhľukujú do istých helikulárnych vlákien. V tzv. amyloidných plakoch je v typickom prípade jadro z amyloidu beta obalené neurofibrilárnymi vláknami z Tau proteínov. Amyloidné plaky, neurofibrilárne pletence a strata synaptických neurónov sú 3 hlavné neuropatologické charakteristiky AD (Králová 2017).

Je všeobecne známe, že najúčinnším endogénnym agonistom FXR je kyselina chenodeoxycholová (CDCA), nachádzajúca sa v žlči človeka. Najsilnejším semisyntetickým ligandom FXR je kyselina obeticholová (OCA), ktorá má  $EC_{50}$  (strednú efektívnu koncentráciu) rádovo o tri rady nižšie a je tak jedným z najsilnejších ligandov FXR (Downes et al. 2003).

Vzorce oboch kyselín sú znázornené na obr. 5.



Obrázok 5 Chemická štruktúra kyseliny chenodeoxycholovej (vľavo) a kyseliny obeticholovej (vpravo)

Obrázky prevzaté: (Chen et al. 2019, Massafra et al 2018).

V mozgu u pacientov s AD bola odhalená vyššia hladina CDCA ako u zdravých jedincov, čo naznačuje zvýšenú FXR signalizáciu v mozgu počas AD (Chen et al. 2019).

Toxický efekt amyloidu beta (Ab) môže viesť k dysfunkcii v expresii neurotrofných faktorov, najmä neurotrofického faktoru pochádzajúceho z mozgu (BDNF=brain derived neurotoxic factor). Jeho zníženie prostredníctvom Ab môže viesť k stratám synapsií a neurodegenerácii (vid'. Obr 6A). Je teda regulátorom synaptickej plasticity zapojeným do neurónovej apoptózy, regenerácie neurónov a pamäte a kognitívnych funkcií v patologickej kaskáde AD (Chen et al. 2019).

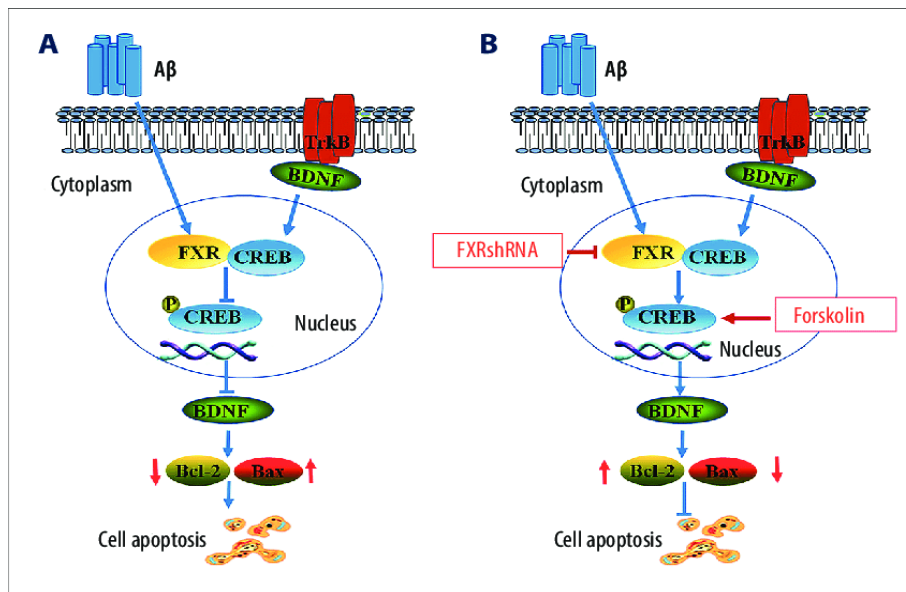
Dysfunkcia tohto neurotrofického faktoru je sprostredkovaná proteínom viažucim sa na element cyklického adenosinmonofosfátu cAMP (CREB), dôležitý transkripčný prvok potrebný pre pamäť a prežitie neurónov (Chen et al. 2019).

Bolo zistené, že v hippocampe pacientov s AD bola znížená expresia CREB (to je proteín viažuci sa na element cAMP, dôležitý transkripčný prvok potrebný pre pamäť a prežitie neurónov). Taktiež je známe, že nízka expresia FXR môže zvrátiť aktiváciu neurónovej apoptózy amyloidom beta (Ab) a zabrániť redukcii CREB a BDNF (vid' Obr. 6B). Z toho vyplýva, že FXR reguluje neurónovú apoptózu indukovanú Ab (Chen et al. 2019).

Zvyšená expresia FXR, naopak, zosilňuje bunkovú apoptózu vyvolanú Ab, čo sa ešte potencieje naviazaním ligandu (napr. CDCA) (Chen et al. 2019).

Tento mechanizmus osi FXR/ CREB/ BDNF naznačuje potenciálny terapeutický cieľ pre liečbu AD. Nové molekuly, ktoré blokujú supresiu exprese (down-reguláciu) CREB spôsobenú Ab, by mohli byť cieľmi pre vývoj liečiv pri liečbe AD (Chen et al. 2019).





Obrázok 6 Mechanizmus ovplyvnenia neurónovej apoptózy spôsobenej amyloidom beta

Obrazok prevzatý: (Chen et al. 2019).

Navyše bolo zistené, že FXR-shRNA inhibuje interakciu FXR a CREB a zvrátila Ab-indukovanú bunkovú apoptózu zvýšením produkcie CREB a BDNF a obnovením mitochondriálnej funkcie. Aktivátor CREB, forskolín, tiež bránil Ab-indukovanej bunkovej apoptóze a mitochondriálnej dysfunkcii zvýšením aktivity CREB a následnou produkciou BDNF (viď. Obr. 6B) (Chen et al. 2019).

### 3.4. Receptory spojené s G proteínom a ich štruktúra

Receptory spojené s G proteínom majú spoločnú kostru štruktúry so siedmimi transmembránovými helixmi. Intracelulárne slučky, ktoré spájajú tieto helixy, tvoria doménu viažucu G proteín. Pri aktivácii receptora väzbou ligandu dochádza k zmenám v relatívnych orientáciách transmembránových helixov 3 a 6 a tieto zmeny následne ovplyvňujú konformáciu intracelulárnych slučiek receptora interagujúcich s G proteínom. Tým môžeme odhaliť miesta viažuce G proteín. Keď aktivovaný receptor po naviazaní ligandu interaguje s heterotrimérom G proteínom, iniciuje uvoľňovanie GDP (guanosindifosfátu) z G proteínu. Predpokladá sa, že kontaktné miesta receptora na G proteíne sú vzdialené od časti viažucej GDP, to znamená, že receptor musí pracovať „na diaľku“ s cieľom zmeniť konformáciu. Po uvoľnení GDP a v neprítomnosti GTP (guanosintrifosfátu) vzniká stabilný komplex aktivovaného receptora a heterotrimérneho G proteínu a táto tzv. konformácia „prázdneho vrečka“ je veľmi zaujímavá, ale jej štruktúra je zatiaľ neznáma (*Hamm 1998*).

N-koncová oblasť  $\alpha$  podjednotky receptora a C-koncová oblasť  $\gamma$  podjednotky sú miestami modifikácie lipidov a tieto lipidované oblasti sú relatívne blízko seba, čo naznačuje miesto, kde sa pripája membrána.

Na podjednotke  $\alpha$  je najjasnejšie vysvetlená receptorová kontaktná oblasť na C konci. Posledných päť aminokyselinových zvyškov významne prispieva k špecificke interakcie G proteínového receptora. C-koniec tretej intracelulárnej slučky receptorov sa viaže na túto C-koncovú oblasť na  $G\alpha$  podjednotkách a väčšia oblasť C-koncovej oblasti podjednotiek  $G\alpha$ , ako aj N-koncovej špirály, sa podieľajú na kontakte s receptorom.

$\beta\gamma$  podjednotky heterotrimérnych G proteínov zvyšujú interakciu receptora s  $\alpha$  podjednotkami.

$\beta$  podjednotka musí držať  $\alpha$  podjednotku pevne na mieste, aby došlo k uvoľneniu GDP. Predpokladajú sa priame väzbové interakcie medzi receptorom a  $\beta\gamma$  podjednotkou.

C-terminálna oblasť  $\gamma$  podjednotky G proteínov je súčasťou na receptorovej väzby a špecificke (*Hamm 1998*).

### 3.5. Princíp regulácie receptorov spojených s G proteínom

Po naviazaní GTP na podjednotku  $\alpha$  sa podjednotky  $\alpha\cdot$ GTP a  $\beta\gamma$  disociujú. V aktívnej konformácii viazanej na GTP sa vytvára nový povrch na podjednotkách  $G\alpha$  a interagujú s efektormi s 20–100-krát vyššou afinitou ako v stave viazanom na GDP. Odlišné  $G\alpha$  interagujú vysoko špecifickým spôsobom s klasickými efektorovými enzýmami.  $G\alpha^s$  aktivuje (a  $G\alpha^i$  inhibuje) adenylylcyklázu,  $G\alpha^q$  aktivuje fosfolipázu C,  $G\alpha^0$  priamo ovplyvňuje iónové

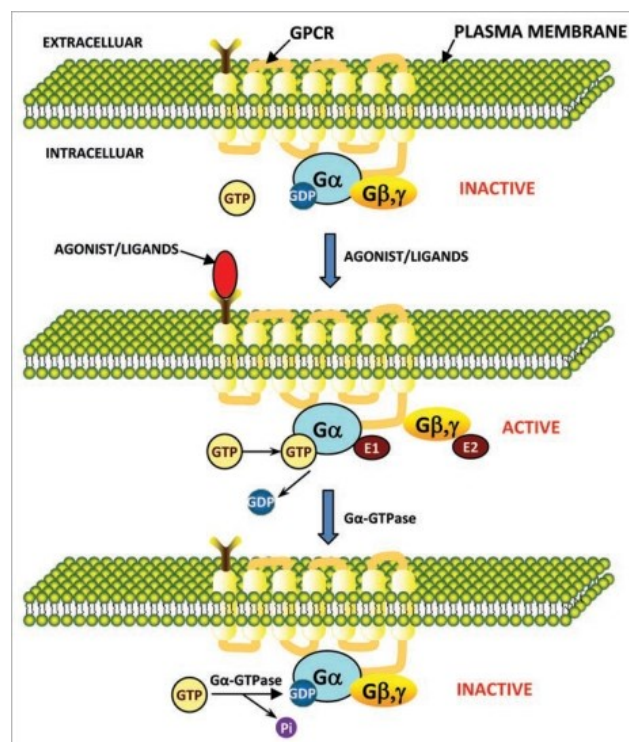
kanály, čím týmito všeobecne známymi mechanizmami následne dochádza k vyvolaniu odpovede (Hamm 1998).

V prvom prípade defosforyláciou adenosintrifosfátu na cyklický adenosinmonofosfát, dochádza z fosforylácií ďalších enzýmov a iónových kanálov, čím sa aktivujú alebo inaktivujú a tým vyvolávajú bunecnú odpoveď (Rang et al. 2007).

V druhom prípade aktiváciou  $G\alpha^q$  receptoru dochádza k aktivácii fosfolipázy C, čím dochádza k štiepeniu membránového fosfolipidu fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu na diacylglycerol a inositoltrifosfát. Inositoltrifosfát spôsobí mobilizáciu vápenatých iónov z endoplazmatického retikula, čo iniciuje mnoho bunecných krokov, čím dosahujeme požadovaný efekt. Diacylglycerol aktivuje proteinovú kinázu C, ktorá ďalej fosforyluje mnoho intracelulárnych proteínov s vyvolaním bunecnej odpovede (Rang et al. 2007).

V treťom prípade  $G\alpha_0$  podjednotka priamo ovplyvňuje iónové kanály, čím dochádza ovplyvnením polarizácie membrány k rôznym cieľovým efektom (Rang et al. 2007).

Základný prehľad aktivácie receptorov spojených s G-proteínom môžeme vidieť na obr.7.



Obrázok 7 Princíp aktivácie receptorov spojených s G- proteínom

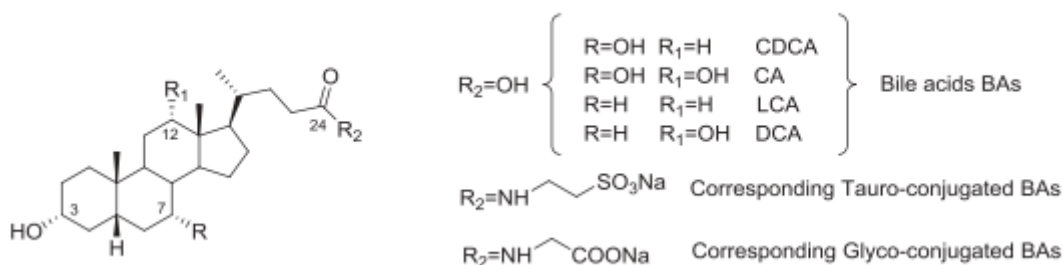
V neaktívnom stave je  $G\alpha$  viazaný na  $G\beta\gamma$  dimér a GDP, signalizácia sprostredkovaná G-proteínom začína väzbou agonistu a vedie k aktivácii GPCR. GPCR je výmenný faktor guanínových nukleotidov, ktorý podporuje výmenu guanozindifosfátu (GDP)/guanozíntrifosfátu (GTP), ktoré sú spojené s podjednotkou  $G\alpha$ . Aktivovaný GPCR teda katalyzuje výmenu GTP za GDP

na podjednotke  $G\alpha$ , v GPCR dochádza ku zmenám v konformácii, ktoré vedú k disociácii  $G\beta\gamma$  diméru z  $G\alpha$  a tým aj k aktivácii viacerých molekúl  $G$  proteínov. Takto aktivované  $G$  proteíny tvoria amplifikovanú reprezentáciu aktivovaného GPCR. Aktivované proteíny  $G\alpha$  a  $G\beta\gamma$  sa zase viažu na rôzne efekторы a tým ich zapínajú alebo vypínajú v rôznych systémoch. Efekторы pokračujú v odovzdávaní signálu rôznym druhom druhých poslov a tu následne vstupuje do hry vnútorná GTPázová aktivita  $G\alpha$ , ktorá vedie ku konverzii viazaného GTP na GDP a tým k inaktivácii kaskády  $G$  proteínov. Aktivita GTPázy podjednotiek  $G\alpha$  môže byť regulovaná regulátormi signalizácie  $G$  proteínov (proteíny RGS), ako aj efektormi. Navyše, efektorové enzýmy, ako napríklad adenyllyclázy, môžu tiež regulovať aktiváciu  $G$  proteínov receptormi. (Tuteja 2009)

Obrázok prevzatý: (Tuteja 2009).

### 3.6. Receptor žľových kyselín spojený G proteínom (GPBAR1/TGR5)

Receptor žľových kyselín spojený s G proteínom 1 (G-protein coupled bile acid receptor 1, GPBAR1), tiež známy ako TGR5 receptor (Takeda G-protein coupled receptor), patrí medzi transmembránové receptory spojené s G proteínom a má sedem transmembránových domén. Je aktivovaný endogénnymi žľovými kyselinami, ako je kyselina cholová (CA), kyselina deoxycholová (DCA), kyselina taurocholová (TCA), kyselina chenodeoxycholová (CDCA) a pod. (základné chemické štruktúry vid'. Obr. 8). TGR5 sa bohato vyskytuje v ľudských tkanivách, vrátane sleziny, pankreasu, pečene, kože, mozgu a gastrointestinálneho traktu (Qian et al. 2022).



Obrázok 8 Chemické vzorce endogénnych žľových kyselín

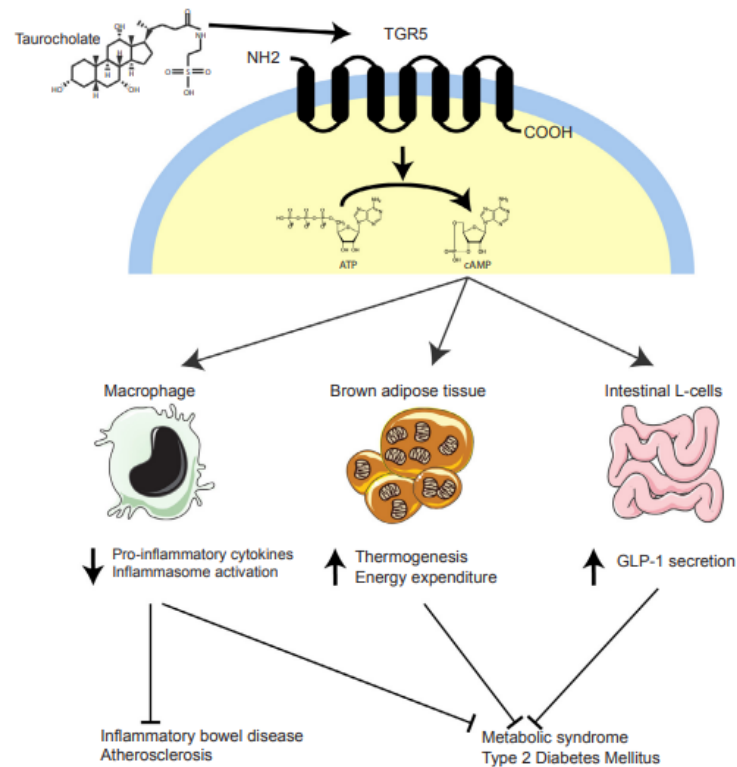
Obrázok prevzatý: (Sepe et al. 2018).

Žľová kyselina je vo vode rozpustná steroidná zlúčenina, syntetizovaná v pečňových bunkách katabolizmom cholesterolu. Hrá rolu pri podpore vstrebávania lipidov a regulácii metabolizmu glukózy a energie za fyziologických podmienok; avšak pri preťažení je toxická voči pečňovým hepatocytom. Ako bolo vyššie spomenuté, expresia génov súvisiacich s udržiavaním homeostázy žľových kyselín je prísne regulovaná jadrovými receptormi (NR), predovšetkým farnozoidným X receptorom (FXR). NR snímajú intracelulárnu koncentráciu žľových kyselín a menia expresiu a aktivitu transportérov žľových kyselín na plazmatickej

membráne skrze posttranskripčnú reguláciu. FXR reguluje génovú expresiu priamo, zatiaľ čo TGR5 nepriamo, iniciovaním špecifických „downstream“ signálnych dráh (*Ma et al. 2021*).

Rola TGR5 sa uplatňuje hlavne pri regulácii metabolizmu žlčových kyselín, pri udržiavaní energetickej rovnováhy, inhibícii zápalu, udržiavaní krvno-žlčovej bariéry, zabránení apoptózy a podpore bunkovej proliferácie (vid' Obr.9). Okrem toho, komplexne reguluje ochorenia pečene a s nimi súvisiace komplikácie. Strata, nadmerná expresia alebo funkčné zmeny v TGR5 ovplyvňujú výskyt a rozvoj chorôb, vrátane diabetu 2. typu, cholestatických ochorení pečene, stukovatena pečene a dyslipidémie. Vysoká expresia TGR5 receptora je taktiež významným rizikovým faktorom pre polycystické ochorenie pečene alebo hepatobiliárnu rakovinu (*Ma et al. 2021*).

V súčasnosti je už známe, že protizápalový účinok receptora TGR5 a jeho regulačný účinok na hydrofóbnu žlčovú kyselinu poskytujú ciele v liečbe väčšiny ochorení pečene. Podľa novodobých štúdií, aktiváciou receptora TGR5 môžeme zmierniť rozvoj diabetickej pečenevej fibrózy, regulovať diferenciáciu prirodzených zabíjačských T buniek na bunky NKT10, zvýšiť sekréciu protizápalových faktorov, inhibovať šírenie vírusu hepatitídy B v ľudskom tele a taktiež podporovať zhnednutie bieleho tukové tkaniva, zlepšiť arteriálnu vaskulárnu dynamiku, podporiť udržiavanie tesných spojení medzi bunkami žlčových ciest a umožniť ochranu pred apoptózou (vid'. Obr 9). Pri portálnej hypertenzii môžeme aktiváciou tohto receptora znížiť kontrakciu pečeneových hviezdicových buniek a zlepšiť vnútro-hepatálnu mikrocirkuláciu (*Ma et al. 2021*).

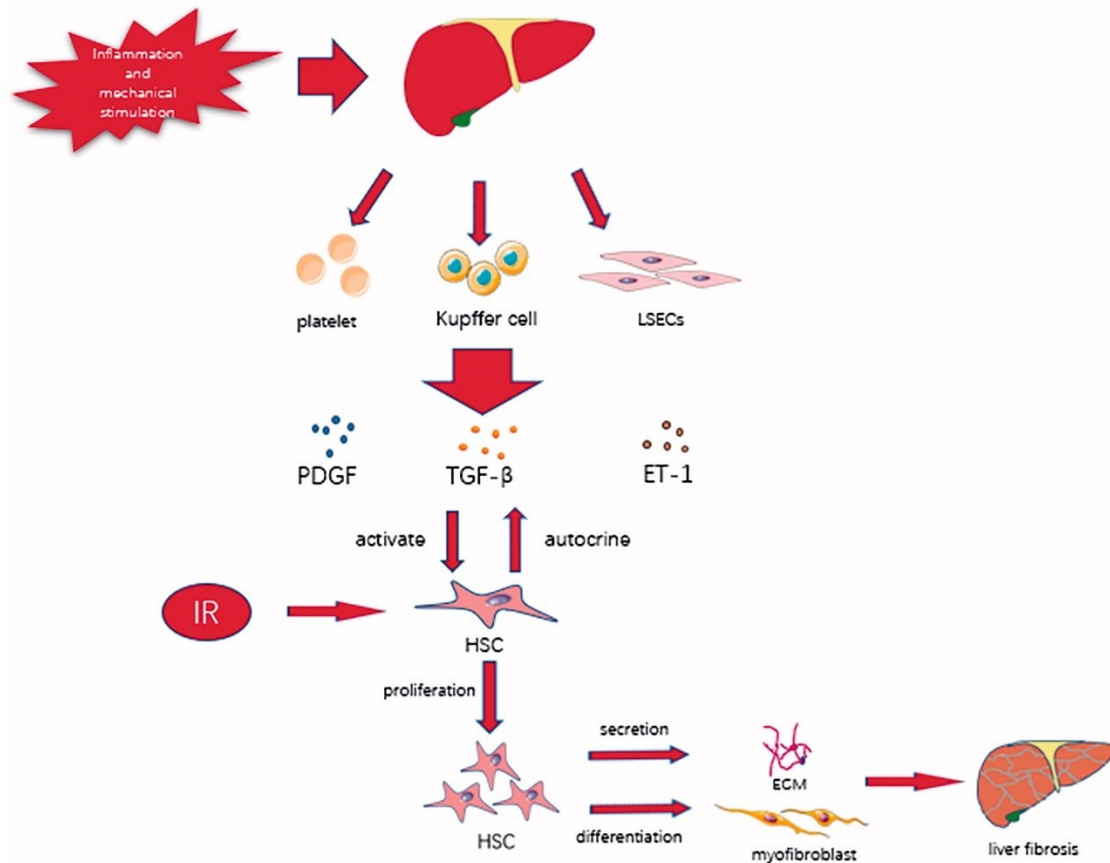


Obrázok 9 Signalizačné účinky žlčových kyselín prostredníctvom aktivácie receptora TGR5

Obrázok prevzatý: (Donkers et al. 2019).

### 3.6.1. Role TGR5 v ovplyvnení pečenej fibrózy

Fibróza pečene je prevládajúci patologický proces pri rôznych chronických ochoreniach pečene (napr. vírusovej hepatitídy, imunitnej hepatitídy, nealkoholického tukovatenia pečene, cholestatickej hepatitídy a rakoviny pečene), ktorého primárnym prejavom je ukladanie extracelulárnej matrix. Poškodenie pečene spôsobuje zmeny v pečenej sínusových endotelových bunkách a pečenej hviezdnicových bunkách (HSC) (viď. obr. 10), čo nakoniec vedie k progresii hepatálnej fibrózy a mikrovaskulárnej dysfunkcii, a najmä aktivácia HSC je hlavným bunkovým mechanizmom, ktorý tvorí základ fibrózy pečene. V minulosti bola fibróza pečene považovaná za ireverzibilnú, pretože bola sprevádzaná deštrukciou pečenej parenchýmu a akumuláciou extracelulárnej matrix, neskôr však bolo potvrdené, že aj neskorú fibrózu pečene možno zvrátiť a preto je cieľom mnohých novodobých výskumov (Ma et al. 2021).



Obrázok 10 Úloha HSC pri fibróze pečene

1. Poškodenie pečňových buniek spôsobené rôznymi patogénnymi spúšťačmi spôsobuje, že blízke sinusové endotelové bunky pečene, Kupfferove bunky a krvné doštičky vylučujú rastový faktor odvodený od krvných doštičiek (PDGF), angiotenzín 1 (ET-1), transformujúci rastový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a iné cytokíny.
2. Tieto cytokíny aktivujú proliferáciu pečňových hviezdicových buniek, podporujú premenu na myofibroblastový fenotyp a zvyšujú syntézu extracelulárnej matrix.
3. Aktivované pečňové hviezdicové bunky môžu vylučovať PDGF, AT-1, TGF- $\beta$  a ďalšie cytokíny, s cieľom pokračovať v aktivácii.

Obrázok prevzatý: (Ma et al. 2021).

Pri inzulínovej rezistencii môžu vysoké hladiny glukózy a inzulínu výrazne zvýšiť proliferáciu aktivovaných pečňových hviezdicových buniek. Bolo dokázané, že aktivácia TGR5 receptorov stimuluje sekréciu glukagónu podobného peptidu 1 (GLP-1), ktorý podporuje sekréciu inzulínu, reguluje homeostázu glukózy a má antidiabetické účinky, čím hrá v týchto dejoch, rovnako ako aj v regulácii iných metabolických ochorení, významnú úlohu a využíva sa predovšetkým v ovplyvnení diabetickej pečňovej fibrózy (Ma et al. 2021).

Pri mnohých chronických ochoreniach pečene vedie kontinuálna aktivácia HSC k prebytočnému ukladaniu extracelulárnej matrix, čím sa nahrádzajú normálne pečňové bunky a dochádza k deštrukcii vlastnej štruktúry a funkcie pečene, čo ďalej progreduje do fibrózy,

prípadne do cirhózy pečene a dokonca môže viesť k zlyhaniu. Inhibícia kontinuálnej aktivácie HSC je teda jedným zo základných cieľov vedúcich k prevencii a liečbe fibrózy pečene (*Ma et al. 2021*).

Avšak na druhej strane, pri akútnom poškodení pečene sa HSC aktivujú a diferencujú na bunky produkujúce rastový faktor, myofibroblasty a extracelulárnu matrix, ktoré opravujú pečeň podporou proliferácie hepatocytov a nahrádzaním nekrotických buniek pečeňového parenchymatického tkaniva (*Ma et al. 2021*).

Hlavnými terapeutickými stratégiami na liečbu fibrózy pečene sú samotné ovplyvnenie fibrózy a inhibícia zápalu, ochrana hepatocytov a antioxidácia. V stratégií inhibície zápalu, TGR5 významne inhibuje zápal sprostredkovaný nukleárnym faktorom  $\kappa$ B. Na základe výskumov predošlých rokov bolo zistené, že liečba agonistom TGR5 významne inhibovala zápalové gény sprostredkované nukleárnym faktorom  $\kappa$ B. Aj napriek tomu, že mechanizmus účinku TGR5 v HSC, je nejasný, už len samotné využitie jeho silného protizápalového účinku je významným predpokladom v prevencii a liečbe fibrózy pečene (*Ma et al. 2021*).

Vďaka svojmu protizápalovému účinku predstavuje agonizmus TGR5 atraktívne využitie v liečbe autoimunitných ochorení pečene, čo bolo dokázané v predchádzajúcich štúdiách Bertoliniho s kolektívom a naopak, antagonizmus TGR5 je možné využiť pri polycystickom ochorení pečene na zníženie rastu cysty a pri cholangiokarcinóme na zníženie bunkovej proliferácie a rezistencie na apoptózu. Avšak problémom reálneho klinického využitia liečiv cielených na TGR5 bránia potenciálne systémové vedľajšie účinky, ktoré pramenia z jeho všadeprítomnej expisie v organizme (*Bertolini et al. 2022*).

### **3.6.2. Role TGR5 v ovplyvnení autoimunitnej hepatitídy a hepatitídy B**

Imunoreaktívne prirodzené zabíjačské T bunky (Immunoreactive natural killer T, NKT) sú patogénne bunky pri autoimunitnom ochorení pečene. Aj napriek tomu, že imunitné reakcie sú obranné reakcie na patogény alebo mutantné bunky, nadmerná imunitná odpoveď organizmu je nežiadúca a môže viesť k sebapoškodeniu (*Ma et al. 2021*).

U pacientov s hepatocelulárnym karcinómom spojeným s vírusom hepatitídy B bola preukázaná zvýšená metylácia génu TGR5, čo môžeme považovať za biomarker tohto stavu, ktorého výskyt sa zvyšuje starnutím (*Han et al. 2014*).

Nakoľko bola detekovaná expresia TGR5 v NKT bunkách, v objasnení jeho role sa predpokladá, že TGR5 reguluje fenotypovú diferenciáciu buniek NKT typu I a typu II v imunitnom systéme pečene a pomáha regulovať fenotypovú diferenciáciu na fenotypy



vyučujúce interleukín 10, ktorý má protizápalovú aktivitu. Aktivácia TGR5 taktiež podporuje diferenciáciu buniek NKT typu I na bunky NKT10, čo nielen významne zvyšuje sekréciu protizápalového IL-10, ale aj znižuje produkciu prozápalových faktorov. Preto tento mechanizmus vykazuje sľubný nový základ na liečbu autoimunitných ochorení pečene (*Ma et al. 2021*).

Nedávny výskum podľa Itoa so spolupracovníkmi (*Ito et al. 2021*) ukázal, že TGR5- špecifický agonista (INT-777) môže inhibovať infekciu vírusom hepatitídy B (HBV) v hepatocytoch, nakoľko táto infekcia predstavuje závažný globálny problém verejného zdravia. Metylácia promótoru TGR5 je spojená s výrazne zvýšenou mierou úmrtnosti, najmä pri akútnom chronickom zlyhaní pečene spôsobenom HBV. Preto má receptor TGR5 potenciálnu hodnotu pre prevenciu infekcie HBV a ďalšie štúdie jeho mechanizmov účinku môžu poskytnúť nový prístup k liečbe hepatitídy B (*Ma et al. 2021*).

### **3.6.3. Role TGR5 v ovplyvnení nealkoholickej steatohepatitídy**

Nealkoholické stukovatenie pečene je progresívne ochorenie, v rozsahu od jednoduchej steatózy po nealkoholickú steatohepatitídu. Ako steatóza sa rozumie prítomnosť lipidových kvapôčok vo viac ako 5 % hepatocytov, ale superponovaný lobulárny zápal a zväčšenie hepatocytov s variabilnou fibrózou definujú už nealkoholické stukovatenie pečene (*Younossi et al. 2016*).

K vzniku nealkoholickej steatohepatitídy, ochoreniu vyvolanému lipotoxickým účinkom na bunky pečene, vedie nadmerný príjem tuku, fruktózy a metabolické ochorenia. Preto sa silne spája s obezitou, inzulínovou rezistenciou a diabetom 2. typu (*Younossi et al. 2016*). Patologické zmeny pri tomto ochorení zahŕňajú predovšetkým hromadenie tuku, hromadenie zápalových buniek v pečňovom parenchýme, aktiváciu makrofágov a aktiváciu HSC, čo predstavujú hlavné rizikové faktory pre vznik závažnej fibrózy pečene, cirhózy a hepatocelulárneho karcinómu. Ako už bolo spomenuté, aktivácia TGR5 podporuje sekréciu GLP-1 črevnými bunkami, čo pôsobí antidiabeticky a tento GLP-1 znižuje steatózu, zápal a taktiež fibrózu pečene (*Ma et al. 2021*).

Vzhľadom k rastúcej miere obezity sa nealkoholická steatohepatitída stáva čoraz rozšírenejšia s celosvetovou prevalenciou až 25 % u dospelých. Napriek tomu jej patogenéza stále nie je úplne vysvetlená a na trhu nie je účinná farmakologická liečba (*Younossi et al. 2016*).

Predchádzajúce výskumy podľa Carina s kolektívom (*Carino et al. 2019*) naznačujú použitie agonistov TGR5 na ovplyvnenie nealkoholickej steatohepatitídy a jej kardiovaskulárnych komplikácií, napr. zvrátením ukladania tuku v pečeni, inhibíciou zvyšovania hrúbky aortálnej intimy a expresiou zápalových génov, taktiež aj zvýšením produkcie vazodilatátora oxidu dusnatého a sírovodíka, čím je možné zvrátiť cievne poškodenie (*Ma et al. 2021*).

#### **3.6.4. Role TGR5 v ovplyvnení portálnej hypertenzie**

Portálna hypertenzia je jednou z najvýznamnejších komplikácií chronického ochorenia pečene. Je charakterizovaná zvýšenou vaskulárnou rezistenciou v pečeni pri hepatálnej fibróze, mikrovaskulárnej trombóze, dysfunkcií endotelových buniek sínusoidy pečene, aktivácii HSC a dysfunkcií krvných doštičiek (*Ma et al. 2021*).

Portálna hypertenzia môže vznikáť taktiež ako následok nealkoholického stuhnutia pečene alebo pečenej cirhózy a je výsledkom, už spomenutej, zvýšenej vaskulárnej rezistencie a zmenenej splachnickej cirkulácie. Aj zloženie črevnej mikroflóry môže prispieť k stúpajúcemu tlaku na portálnu venu, avšak význam týchto zmien nebol doposiaľ objasnený (*Baffy 2019*).

Znížená permeabilita a znížená sekrécia oxidu dusnatého (NO) patrí medzi základné prejavy dysfunkcie limbálnych epitelových kmeňových buniek (LESC). Vo fyziologickom stave majú LESK vysokú permeabilitu, zatiaľ čo pri chronickej fibróze pečene LESK strácajú fenestráciu a vytvárajú bazálnu membránu, čo spôsobuje zníženie permeability. Dôležitý vazodilatátor je oxid dusnatý a zníženie jeho sekrécie výrazne zvyšuje intravaskulárny tlak (*Ma et al. 2021*).

Práve TGR5 receptor je vysoko exprimovaný v LESK a keď je aktivovaný, indukuje expresiu a aktiváciu endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS) v bunkách endotelu a sekrécia NO závisí hlavne od aktivity a expresie eNOS. Zároveň aktivácia TGR5 môže iniciovať expresiu cystationín-gama-lyázy a serínovú fosforyláciu eNOS, čo vedie k produkcii sírovodíka (H<sub>2</sub>S) a NO, v dôsledku čoho je inhibovaná expresia a sekrécia silného vazokonstriktora endotelínu 1 (ET-1) v LESK (*Ma et al. 2021*).

### 3.7. *Corydalis cava* (L.) Schweigg. a Koerte ako zástupca čeľade

#### *Fumariaceae*

Hlavným obsahom tejto diplomovej práce bol skrining aktivity alkaloidov, ktoré boli izolované z *Corydalis cava* z čeľade *Fumariaceae* a *Narcissus pseudonarcissus* z čeľade *Amaryllidaceae*.

#### 3.7.1. Morfológický popis

Rastlina *Corydalis cava*, ktorej český názov je Dymnivka dutá, slovenský názov Chocholačka dutá (viď. Obr. 11). „Vytrvalá, 15-35 cm vysoká bylina s dutou hľuzou. Lodyha priama. Lodyžné listy 2, dlho stopkaté, 2x trojpočetné, modravo zelené. Kvetenstvo koncový stravec s 8-20 kvetmi. Kvety purpurové, biele alebo žltobiele, s dvoma pyskami a ostrohou, vyrastajú z paží celokrajných listeňov. Listene v kvetenstve kopijovité až široko vajcovité, celokrajné. Plod kapsuly. Semená s mäsičkami.“ (Kocian 2003)



Obrázok 11 *Corydalis cava*

Obrázok prevzatý: ([Obrázek - Corydalis cava \(dymnivka dutá\) | BioLib.cz](#), autor: Petr Kocna).

#### 3.7.2. Taxonomické zaradenie

Chocholačka dutá, *Corydalis cava*, patrí medzi:

„Oddelenie: *Magnoliophyta*

Trieda: *Magnoliopsida*

Podtrieda: *Ranunculidae*

Rad: *Papaverales*

Čeľad': *Fumariaceae*

Rod: *Corydalis* DC.

Druh: *Corydalis cava* (L.)“

(podľa Schweigg. a Koerte uznané z Wiersema a Taxonomy, G. R. I. N. 2019).

### 3.7.3. Obsahové látky a použitie

Rod *Corydalis* je prírodný zdroj rôznych účinných látok využívaných vo farmácii. Členovia druhov *Corydalis* sa už dlhé tisícročia používajú v tradičnej medicíne v juhovýchodnej Ázii, najmä v Číne na liečbu bežnej nádchy, hypertenzie, hepatitídy, krvácania, edému, gastritídy, kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych chorôb a neurologických porúch. Isté druhy *Corydalis* sú bohaté na alkaloidy, ktoré majú silnú biologickú aktivitu a okrem alkaloidov tiež obsahujú kumaríny, flavonoidy, steroidy, organické kyseliny a ďalšie látky. Tieto látky majú farmakologický efekt pri liečbe chorôb nervového, kardiovaskulárneho a tráviaceho systému (Deng et al. 2021).

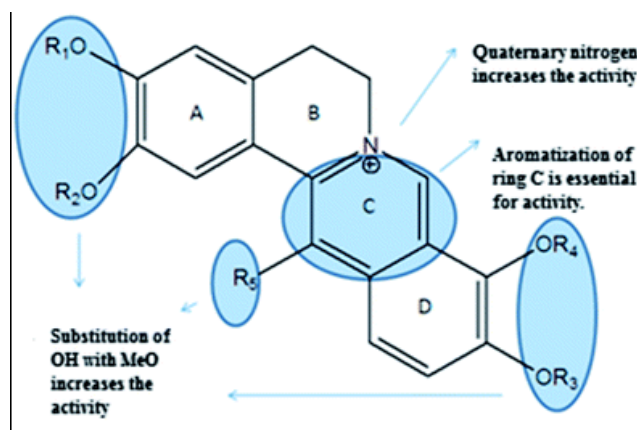
„*Corydalis cava* (Schweigg et Koerte), dymnivka dutá, je rastlina s dutou, jedovatou koreňovou hľuzou obsahujúcou až 6 % alkaloidov. Základným je bulbocapnin“ (Jahodár 2011).

Používa sa hlavne na liečbu dysfunkcie pamäte v ľudovej medicíne. V minulosti, už v časoch stredoveku, sa hľuzy z *Corydalis cava* používali pri bolestiach hlavy, neurózach, trémoroch, bolestiach a paralýze končatín. Hľuzy tejto rastliny sú veľmi bohatým zdrojom izochinolínových alkaloidov rôznych konštrukčných typov, ktoré tvoria hlavné obsahové látky tejto rastliny (Chlebek et al. 2011).

Acetylcholín (ACh) je dôležitý neurotransmiser v periférnom a centrálnom nervovom systéme a podľa cholinergnej hypotézy je Alzheimerova choroba (AD) ako najčastejšia príčina demencie u starších ľudí spôsobená práve znížením hladín ACh v mozgovej kôre. Inhibícia acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BChE), čo sú enzýmy podieľajúce sa na rozklade acetylcholínu, je doteraz najbežnejším prístupom k liečbe AD. Prírodné produkty sú jedným z najcennejších zdrojov liečby AD a nakoľko sa v ľudovej medicíne mnoho druhov *Corydalis* používalo na zlepšenie pamäte, moderné farmakologické experimenty tento účinok potvrdili (Iranshahy et al. 2014).

Podľa výskumu, ktorý publikoval Chlebek s kolektívom (Chlebek et al. 2011) alkaloidy (+)-kanadalín, kanadín, bulbokapnín a korydalín z *Corydalis cava* vykazovali miernu aktivitu proti AChE, zatiaľ čo tetrahydropalmatín a protopín z *Corydalis yanhusuo* boli neaktívne.

Vzťah medzi chemickou štruktúrou alkaloidov protoberberínového typu z druhov *Corydalis*, čo je konštitučným podtypom izochinolínových alkaloidov, a ich inhibičnou aktivitou na AchE je znázornený v Obr. 12. Práve protoberberínový typ alkaloidov je najsilnejším inhibítorom AchE (Iranshahy et al. 2014).



Obrázok 12 Vzťah medzi chemickou štruktúrou alkaloidov protoberberínového typu z druhov *Corydalis* a ich inhibičnou aktivitou na AchE

Substitúcia OH skupín v kruhu A a D za O-Methyl zvyšuje aktivitu, rovnako ako metylový substituent v kruhu C a prítomnosť kvartérneho dusíka. Aromatizácia C kruhu je esenciálna pre aktivitu.

Obrázok prevzatý (Iranshahy et al. 2014).

Okrem tohto výrazného inhibičného účinku na AchE vykazujú alkaloidy z *Corydalis* ďalšie preukázané vlastnosti, ku ktorým patria antiagregačné účinky na krvné doštičky, protizápalové, antivirotické, antihypertenzívne, taktiež inhibujú oxidáciu lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL), kardioprotektívne vlastnosti, antiplazmoidálne a iné (Iranshahy et al. 2014).

### 3.8. *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master ako zástupca čeľade *Amaryllidaceae*

#### 3.8.1. Morfológický popis

Rastliny čeľade *Amaryllidaceae* majú široké rozšírenie v tropických aj a subtropických oblastiach na celom svete. *Narcissus* L. je rod široko sa vyskytujúci v oblasti Stredozemného mora a severnej Afriky. Rod *Narcissus* L. sa tradične delí do sekcií, pričom rod *Pseudonarcissi* DC (viď. obr. 13) sa vyznačuje elipticky zúženými listami s lichobežníkovým prierezom; valcovitou korunou; priamymi podrovnanými staminovými kvetmi; prašníky nie sú všestranné; semená zvyčajne so strofilom. V uvedenej sekcii počet taxónov zaradených v rámci rodu *Pseudonarcissus* je podľa rôznych autorov veľmi rôznorodý (Hulcová et al. 2019 a Murillo et al. 2021).



Obrázok 13 *Narcissus pseudonarcissus*

Obrázok prevzatý: (Fraser et al. 2021)

### 3.8.2. Taxonomické zaradenie

*Narcissus pseudonarcissus*, narcis žltý, patri medzi:

„Oddelenie: *Tracheophyta*

Trieda: *Liliopsida*

Podtrieda: *Amaryllidoidae*

Rad: *Asparagales*

Čeľaď: *Amaryllidaceae*

Rod: *Narcissus* L.

Druh: *Narcissus pseudonarcissus* (L.)“ (Wiersema a *Taxonomy*, G. R. I. N. 2019).

### 3.8.3. Obsahové látky a použitie

Rastliny rodu *Narcissus* L. boli taktiež využívané v ľudovej medicíne. Využitie narcisového oleja na liečbu rakoviny bolo zaznamenané už v stredoveku v krajinách ako je Čína, severná Afrika, Stredná Amerika a v arabských krajinách (Hartwell 1967).

Doteraz bolo z rastlín narcisov izolovaných viac ako 100 alkaloidov rôznej štruktúry. Tieto alkaloidy majú široké spektrum farmakologických účinkov, ako napríklad protinádorové, antivírusové, antimalarické a bola preukázaná taktiež inhibičná aktivita na acetylcholinesterázu (AChE). Dokonca známy alkaloid, galantamin, z čeľade *Amaryllidaceae*, s ktorým sme pracovali aj v rámci tejto práce, sa predáva ako liek na terapiu AD pod komerčným názvom

Reminyl© (galantamín hydrobromid), kde sú využívané práve jeho inhibičné účinky na AchE. Alkaloidy izolované z rastlín narcisu ako napríklad narciklazin, hemantamin a lykorin preukázali zaujímavé protinádorové a apoptotické účinky (*Hulcová et al. 2019*).

Práve alkaloidy z *Corydalis cava* a *Narcissus pseudonarcissus* sme skúšali v experimentálnej časti tejto práce z hľadiska aktivity na FXR a TGR5.

#### 4. CIELE PRÁCE

Cieľom tejto experimentálnej práce bol skríning aktivity vybraných alkaloidov izolovaných z čeľadí *Fumariaceae* a *Amaryllidaceae* na farnezoidný X receptor (FXR) a receptor žľových kyselín spojený s G proteínom 1 (TGR5) za použitia ľudskej hepatocytárnej bunecnej línie HepG2. V rámci toho bolo nutné:

- Vykonať génové reportérove testy (Gene reporter test) na určenie kapacity skúmaných alkaloidov interagovať s FXR a TGR5 receptormi v bunkovej línii HepG2 s využitím reportérového luciferázového DNA vektora s rezponzívnym elementom pre FXR receptor- FXRE a TGR5- cAMP rezponzívnym element CRE.
- Vykonať test na cytotoxicitu, aby sme určili schopnosť prežitia (viability) buniek exponovaných skúmanými látkami a tým vylúčili toxické vlastnosti skúmaných látok na živé bunky.
- Previesť test TR-FRET (fluorescenčného rezonančného prenosu energie s rozlíšením času) na určenie schopnosti alkaloidov viazať sa priamo na doménu viažucu ligand FXR bez použitia bunecnej línie.
- Podľa potreby vykonať doplňujúce génové receptorové testy.
- Nakoniec nakresliť CRC krivky, krivky závislé na koncentrácií (concentration response curves), a vyhodnotiť z nich polovičnú inhibičnú alebo efektívnu koncentráciu ( $IC_{50}$  alebo  $EC_{50}$ ), podľa potreby, u alkaloidov, ktoré budú vykazovať potenciálne využiteľné schopnosti.

Pozitívne výsledky tejto práce by mohli naznačiť potenciálnu aktivitu alkaloidov z čeľadí *Fumariaceae* a *Amaryllidaceae* a tým aj existenciu nových ligandov FXR a TGR5, čím by mohli poskytnúť užitočný pohľad pri vývoji nových liečiv cielených na FXR a TGR5 receptor.



## 5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 5.1. Experimentálne metódy

#### 5.1.1. Génová reportérová esej (gene reporter assay)

Metóda „gene reporter assay“ sa používa na štúdium génovej expície a bunkových dejov spojených s génovou expíciou u eukaryotických buniek. Túto metódu môžeme využívať na výskum aktivity receptorov (tak, ako v našom prípade), transkripčných faktorov, bunkovej signalizácie, úprav mRNA (informačná alebo mediátorova RNA, z angl. messenger RNA) či skladby proteínov (*Allard a Kopish 2008*).

Princíp tejto eseje tkvie v transfekcii expresného vektora, ktorý zaistí expíciu génu pre študovaný receptor do hostiteľských buniek, a transfekcii reportérovho plazmidu, ktorý obsahuje vo svojej štruktúre špecifickú väzobnú promótorovu sekvenciu pre študovaný receptor, ktorá je zaklónovaná tesne pred reportérovým génom. Miera expície reportérového génu koreluje s transkripčnou aktivitou skúmaného receptora a expíciu reportérového génu je možné kvantifikovať, a tým vyjadriť aktivitu daného receptora. Ako hostiteľské bunky sa najčastejšie používajú nádorové bunkové línie, ktoré sú prechodne či trvalo transfekované reportérovým plazmidom (*Kameníčková 2012*).

Vyhodnocovanie miery aktivity skúmaných látok viazať sa na dané receptory po 24 hodinách expície sme vykonávali prostredníctvom luminiscenčnej reakcie katalizovanej svetluškovou luciferázou a Renilla luciferázou, nakoľko intenzita vyžiareného svetla je priamo úmerná koncentrácií enzýmu luciferázy. Jedná sa o chemiluminiscenciu a meranie tejto chemiluminiscencie sme vykonávali na doštičkovom spektrofotometri- luminometri (BioTek Synergy 2) (*Dual-Luciferase® Reporter Assay and Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay Systems 2009*).

Najprv sme merali luminiscenčnú aktivitu svetluškovej luciferázy, stabilizovaný signál však vznikol po pridaní „Luciferase Assay Reagentu II“, čo je substrát pre svetluškovú luciferázu. Po kvantifikácii sme tento signál „zhasli“ a pridali substrát pre Renilla luciferázu pomocou „Stop & Glo® reagentu“, čím vznikol druhý signál luminiscencie, ktorý sme znova zmerali. Kvantifikáciou reportérového génu sme vyjadрили aktivitu FXR receptora s naviazanými ligandmi (*Dual-Luciferase® Reporter Assay and Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay Systems 2009*).

### 5.1.2. Cytotoxicita (cytotoxicity assay)

Vplyv toxickej aktivity na bunky v použitej bunecnej línii HepG2 sme vyhodnocovali prostredníctvom komerčného MTT testu (test na cytotoxicitu, respektive na určenie viability buniek), čo je kolorimetrická metóda určená na meranie cytotoxicity testovaných látok na základe zmien v metabolickej aktivite buniek (respektive ich mitochondrií) (Cell Titer 96® AQueous One solution, Cell proliferation assay, 1996-2012, Promega Corporation). Tento test patrí medzi často využívané metódy na určenie *in vitro* toxicity. Účinok testovaných látok na metabolickú aktivitu buniek HepG2 sme stanovovali MTT-testom. Tento test je založený na schopnosti živých buniek a ich mitochondrií redukovať žltý solubilný MTS- tetrazoliovú zlúčeninu na nerozpustný modrý formazán vo forme modrých kryštálov hviezdovitého tvaru. Tento proces prebieha na mitochondriálnej membráne živých buniek. Kryštály sa rozpustia pridaním DMSO (dimetylsulfoxidu), esej je vykonávaná pridaním malého množstva „Cell Titer 96® AQueous One solution“ a výsledky sa vyhodnocujú meraním absorbanie prostredníctvom spektrofotometra (Technical bulletin Cell Titer 96® AQueous One solution, Cell proliferation assay, 1996-2012, Promega Corporation). Nameraná absorbanca roztoku odpovedá množstvu živých buniek (čím je tmavšia farba, tým je viac živých buniek) (Stockert et al. 2018).

### 5.1.3. Časovo rozlíšený fluorescenčný rezonančný prenos energie

#### (time-resolved fluorescence resonance transfer of energy, TR-FRET)

TR-FRET (časovo rozlíšený fluorescenčný rezonančný prenos energie) LanthaScreen™ farnesoidná X receptorová koaktivátorová esej bola získaná od firmy Thermo Fisher.

#### 1. Princíp fungovania FRET (fluorescenčného prenosu energie)

Keď sa vhodný pár fluorofórov dostane do tesnej blízkosti, excitácia prvého z nich (donoru) môže spôsobiť prenos energie na druhého (akceptora). Tento transfer energie je dektekovaný zvýšením fluorescenčnej emisie akceptora a znížením fluorescenčnej emisie u donoru. FRET je často vyjadrovaná ako pomer intenzít akceptora a donoru fluoroforov. Pomerový charakter takýchto hodnôt koriguje rozdiely u analyzovaných objemov medzi jamkami a zároveň schopnosť zhasínania spôsobenú zafarbením zlúčenín (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).

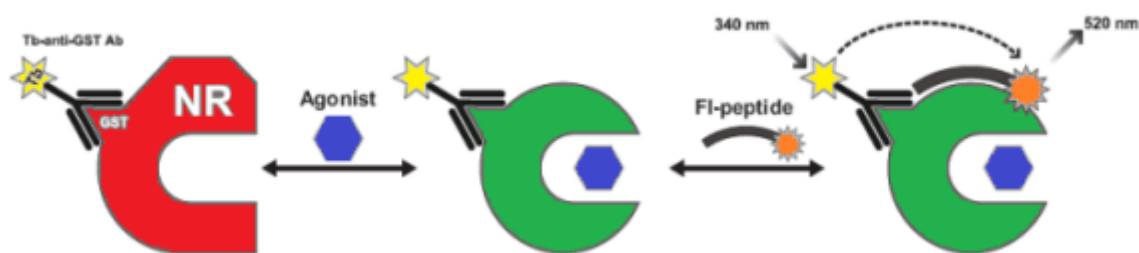
#### 2. Princíp fungovania TR-FRET (časovo rozlíšeného fluorescenčného prenosu energie)

Na rozdiel od klasickej FRET analýzy, využíva TR-FRET analýza ako donorové druhy lanthanoidové cheláty s dlhým polčasom. Tieto cheláty sú výnimočné tým, že doba ich

životnosti v excitovanom stave (priemerná doba, po ktorú molekula zostáva v excitovanom stave po prijatí fotónu) môže byť v ráde milisekúnd a viac. Toto je hlavný rozdiel oproti životnosti bežných flouoroforov využívaných u štandardnej FRET analýzy, ktorá sa typicky pohybuje v oblasti nanosekúnd. Pretože interferencie z autoflouescencie zlúčenín alebo rozptýleného svetla sa tiež pohybujú rádovo v nanosekundách, tieto faktory môžu negatívne ovplyvniť štandardnú FRET analýzu a výsledky tým môžu byť menej presné. Na to, aby sme sa vyhli týmto interferenciám je TR-FRET analýza vykonávaná meraním FRET s príslušným oneskorením, obvykle 50 - 100 mikrosekúnd po excitácii vyvolanej zdrojom svetla mikrotitračnej doštičkovej čítačky. Toto oneskorenie prekoná interferencia fluorescenčného pozadia a svetelný rozptyl a tiež zabráni interferenciám z priamej excitácie, čím robí túto analýzu, v zrovnaní s klasickou FRET analýzou, presnejšou. Medzi najčastejšie používané lanthanoidy u TR-FRET analýzy je terbium a europium (*LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007*).

### 3. Väzba agonistu

Väzba agonistu na nukleárny receptor zapríčiní konformačnú zmenu v okolí helixu 12 ligand viažúcej domény (LBD) a to vedie k vyššej afinite koaktivátorového peptidu. Pri excitácii terbiovej väzby anti-GST protilátky pri 340 nm je energia odovzdaná fluoresceínovej väzbe na koaktivátorovom peptíde a detegovaná ako emisia pri vlnovej dĺžke 520nm (vid'. obr. 14). V priebehu *LanthaScreen™* koaktivátorovej analýzy je FXR-LBD ako ligand k testovanej zlúčenine nasledovaný pridaním zmesi fluoresceín-koaktivátorového peptidu a terbium-anti-GST protilátky a po inkubačnej perióde pri izbovej teplote, je zaistený TR FRET pomer 520:495 a môže byť použitý k determinácii  $EC_{50}$  (stredná efektívna koncentrácia) látky z krivky závislé na dávke. V súvislosti s biológiou interakciou FXR a koaktivátorového peptidu, je hodnota ligandu  $EC_{50}$  zloženou hodnotou reprezentujúcou množstvo ligandu potrebného na naviazanie receptora, efektu konformačných zmien a na väzbe koaktivátorového peptidu (*LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007*).



Obrázok 14 Princíp analýzy koaktivátorovej peptidovej väzby

Tb-anti-GST protilátky nepriamo viažu nukleárny receptor väzbou na GST značku na receptore. Väzba agonistov na NR spôsobí konformačné zmeny vedúce k zvýšeniu afinity NR pre koaktivátorový peptid. Tesná blízkosť fluorescenčne viazaného koaktivátorového peptidu na terbium s naviazanou protilátkou spôsobuje zvýšenie TR-FRET signálu.

*Obrázok prevzatý: (LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007).*

Experimenty boli prevedené presne podľa firemného protokolu na 386-jamkových čiernych doštičkách (Corning) a fluorescencia bola meraná na spektrometri-luminometri Synergy I od firmy BioTek (*LanthaScreen™ TR-FRET Farnesoid X Receptor Coactivator Assay 2007*).

## 5.2. Použitá bunecná línia a práca s bunkami

Ako modelovú bunkovú líniu sme pre náš experiment použili líniu HepG2, ktorá bola získaná z karcinómu ľudských hepatocytov. Táto línia je odvodená z pečeneového tkaniva 15 ročného adolescenta, ktorý mal dobre diferencovaný hepatocelulárny karcinóm. Morfológia HepG2 buniek je epiteliálne bunky, tieto bunky majú 55 párov chromozómov a scenerujú mnoho plazmatických proteínov, ako je napr. transferín, fibrinogén, plazminogén alebo albumín. Môžu byť stimulované ľudským rastovým hormónom, sú adherentné a rastú v jednej vrstve v malých agregátoch (*HepG2 cell culture, ATCC stable transfection protocol 2018, [HEPG2] ATCC® HB-8065™*).

Bunkovú líniu sme kultivovali v tzv. plnom médiu – DMEM obsahujúcom 2 mM glutamínu, 10 % fetálneho bovinného séra a 1 % neesenciálnych aminokyselín. Bunky sme inkubovali v bunkovom inkubátore temperovanom na teplotu 37 °C v atmosfére 5 % CO<sub>2</sub> (oxidu uhličitého). HepG2 bunky boli pasážované pri 80-100 % konfluencii za použitia 0,25 % trypsínu. Na kultivačné doštičky sme HepG2 líniu nasadzovali v koncentrácii 12 000 – 30 000 buniek na 1 cm<sup>2</sup> plochy kultivačného pláta v závislosti na experimente a konfluencii.

Najčastejšie, pre luciferázovú génovú reportérovú esej sme použili 48-jamkové doštičky, na ktoré boli nasadené bunky 24 hodín pred transfekciou Lipofektamínom 2000 v Opti-MEM® I Reduced-Serum médiu. Transfekovali sme 150 ng/jamku reportérového plasmidu (pFXRE-luc alebo pCRE-luc) a 100 ng/jamku expresných plazmidov (p-FXR, p-RXRα alebo GPBAR1). Pre testovanie interakcií s FXR sme použili pFXRE-luc, p-FXR a p-RXRα vektory; pre testovanie s TGR5 receptorom sme použili vektory CRE-luc a GPBAR1. Vo všetkých transfekčných zmesiach bol taktiež vektor pRL-TK pre Metridia luciferázu pre normalizáciu transfekcie. Bunky boli exponované testovaným látkam alebo

známym agonistom týchto receptorov počas 24 h. Potom boli bunky opláchnuté PBS, do každej jamky sme pridali 100  $\mu$ l Passive lysis bufferu (Promega) a zamrazili. Zamrazením bunky šetrne lyzovali. Potom sme zviechali 40  $\mu$ l lyzátu s detekčným reagentom pre svetluškovú luciferázu a merali luminiscenciu na doštičkovom spektrofotometri-luminometri (BioTek Synergy 2). Po analýze sme pridali reagent Stop & Glo® Buffer z kitu Dual Luciferase Assays kit (Promega) a merali aktivity Renilla luciferázy.

Po nameraní sme urobili pomer aktivít svetluškovej luciferázy a Renilla luciferázy. Testovanie látok bolo robene v triplikátoch z ktorých sme počítali priemer so smerodajnou odchýlkou. Aktivita kontrolného vzorku potom bola prepočítaná na hodnotu 1 a ostatné vzorky na násobnú aktivitu kontroly.

Cytotoxicita na bunkách HepG2 línie bola robená kitom Cell Titer 96® AQueous One solution kit (Promega) na 96-jamkových doštičkách. Bunky boli exponované testovaným látkam počas 24 hodín. Následne bol pridaný reagent a po inkubácii meraná absorbancia pre 490 nM na doštičkovom spektrometri Synergy BioTek. Výsledky sme vyjadrili ako % prežitia oproti kontrole (vehikulum DMSO v objeme 0,1 % v/v, v ktorom sú 100 % živé bunky). Ako negatívnu kontrolu sme k DMSO (0,1 %) prikvapávali SDS (10 % roztok), ktorý je 100 % cytotoxický. Ako cytotoxické hodnotíme látky, ktoré spôsobili pod 80 % bunečnej viability.

### 5.3. Pomôcky a prístroje

12, 24, 48 a 96 jamkové doštičky (TPP®- Techno Plastic Products AG),

automatická pipeta (FastPette™),

doštičkový spektrofotometer-luminometer (BioTek Synergy 2),

inkubátor (New Brunswick an Eppendorf Company Galaxy 170 S),

kahan (Fuego SCS basic),

kultivačná fľaša (TPP®),

laminárny box (Telstar Bio II Advance, Telstar Clean Air® EF/S),

mikropipety (Eppendorf Research),

mikroskop (DHM),

odsávačka (Knf Lab Laboport),

plastové mikroskúmvavky (BIOplastics BV),

plastové skúmavky (TPP®),  
sklenené Pasteurove pipety (Hirschmann®),  
trepačka (MS2 Minishaker IKA®),  
vodná kúpeľ (Mettler),  
plastová vanička (BioTech).

#### 5.4. Použité chemikálie

Cell Titer 96® AQueous One solution (Promega),  
CDCA (chenodeoxycholová kyselina) (Generi BioTech),  
DMEM (z angl. Dulbecco's modified Eagles's medium) (Gibco),  
DMSO (dimethylsulfoxid) (Sigma Aldrich),  
fetálne bovinné sérum (PAA),  
glutamin (Sigma Aldrich) GW4064 (Generi BioTech),  
Dual Luciferase Assays kit (Promega),

- Luciferase Assay Reagent II – obsahuje: Luciferase Assay Buffer II (Promega),
- Luciferase Assay Substrate (Promega),
- Stop-Glow (Promega),

MTT labeling reagent (Sigma Aldrich),  
Lipofectamin 2000, Lipofectamin 3000 (ThermoFischer Scientific),  
Neesenciálne aminokyseliny (Sigma Aldrich),  
Opti-MEM® I Reduced-Serum,  
Medium (Gibco),  
Passive lysis buffor (Promega),  
PBS (fosfátový pufor, z angl. phosphate buffered saline) (Sigma Aldrich),

plasmidy:

- pFXRE-luc (plazmid bol pripravený v laboratóriu prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D.), jedná sa o plazmid so 4 responzívnymi oblasťami interferujúcimi s FXR receptorom pred kódujúcou sekvenciou pre svetluškovú luciferázu,
- pRL-TK (Promega), je kontrolný expresný plazmid pre Renilla luciferázu,
- p-FXR (komerčný plazmid od firmy Genscript), je expresný vektor pre ľudskú formu farnezooidného X receptoru. Expressia je riadená silným CMV promotorom v tomto vektore.
- p-RXR $\alpha$  (Addgene) je expresný vektor pre ľudskú formu retinoidného X receptoru  $\alpha$ . Expressia je riadená silným CMV promotorom v tomto vektore.
- pCRE-luc (hygro) (Promega), je komerčný reportérový plazmid so svetluškovou (Firefly) luciferázou, ktorá je exprimovaná na podmet aktivácie sekvencie CRE (cAMP responzívný element). Ten je aktivovaný napr. cez TGR5 receptor.
- GPBAR1 (Origene), je expresný vektor pre ľudský TGR5 (GPBAR1) receptor. Vo vektore je expressia riadená CMV promotorom.

SDS (dodecylsulfát sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate) (Serva),

Solubilization solution (Sigma Aldrich) Stop & Glo® Reagent – obsahuje:

- Stop & Glo® Buffer (Promega),
- Stop & Glo® Substrate (Promega).

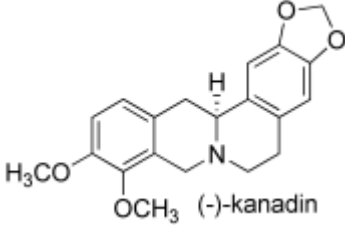
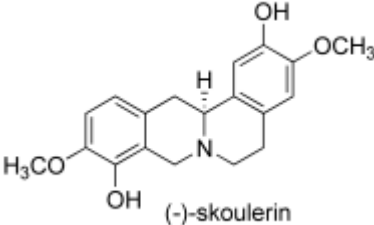
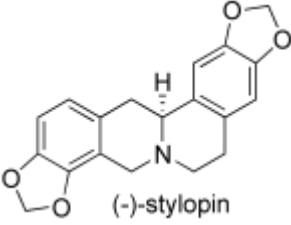
0,25 % trypsin (Sigma Aldrich),

Skúmané alkaloidy (poskytnuté Katedrou farmakognózie a farmaceutickej botaniky Faf UK v HK).

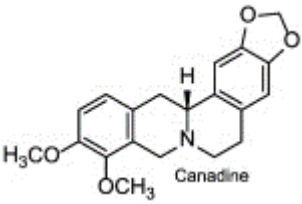
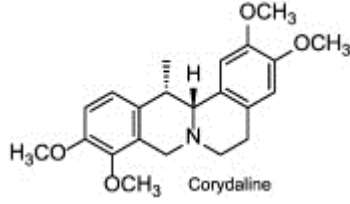
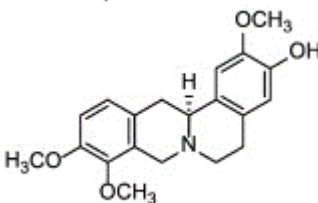
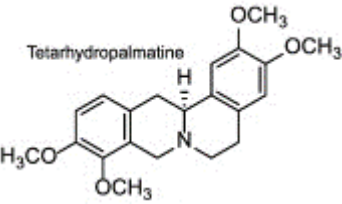
### 5.5. Skúmané látky (Použité alkaloidy)

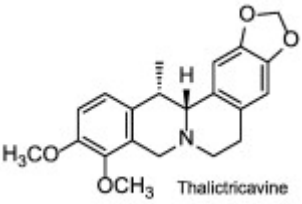
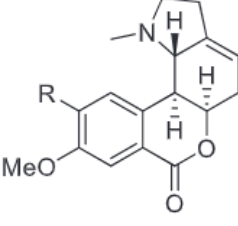
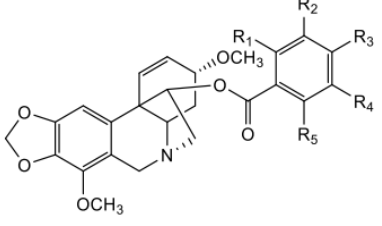
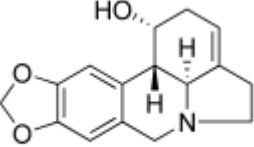
V rámci nášho experimentu sme testovali sadu dvadsiatich šiestich alkaloidov z *Corydalis cava* a *Narcissus pseudonarcissus*.

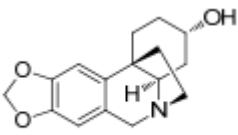
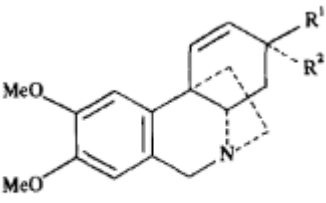
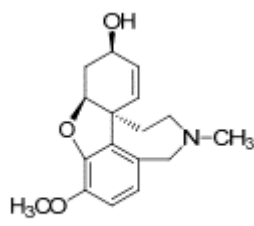
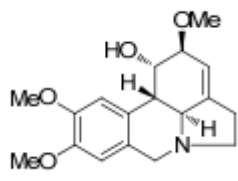
Tabuľka 1 Prehľad skúmaných alkaloidov a ich chemických štruktúr

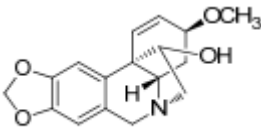
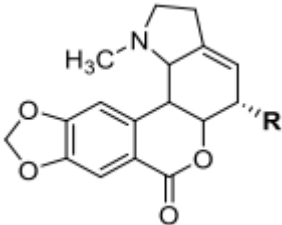
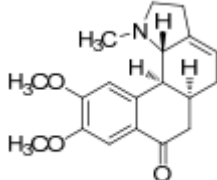
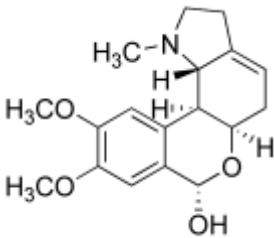
Názov slovenský(latinský)	Chemický vzorec	Skratka
(-)-kanadin ((-)-canadine)	 <p style="text-align: center;">(-)-kanadin <i>(-)-kanadin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Chlebek 2021).</i></p>	(-)-canad.
(-)-skoulerin ((-)-scoulerine)	 <p style="text-align: center;">(-)-skoulerin <i>(-)-skoulerin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Cahliková et al. 2015).</i></p>	(-)-scouler.
(-)-stylopin ((-)-stylophine)	 <p style="text-align: center;">(-)-stylopin <i>(-)-stylopin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Chlebek 2021).</i></p>	(-)-stylop.

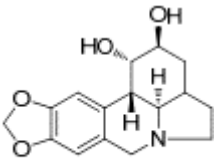
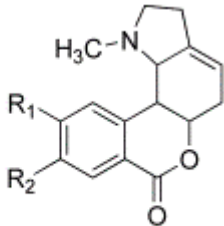
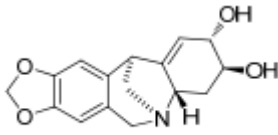
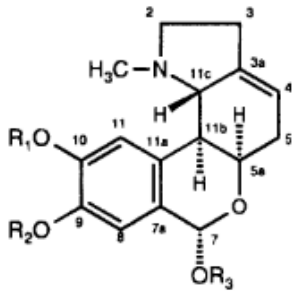


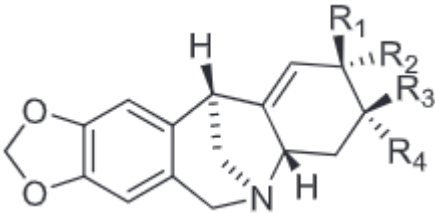
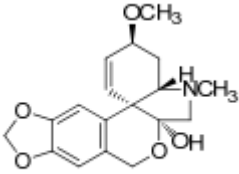
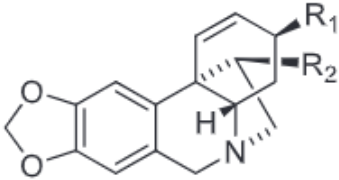
(+) -kanadin ((+) -canadine)	 <p style="text-align: center;">Canadine</p> <p style="text-align: center;">(+)-kanadin</p> <p style="text-align: center;">Obrázok prevzatý: (Cahliková et al. 2015).</p>	(+) -canad.
(+) -korydalin ((+) -corydaline)	 <p style="text-align: center;">Corydaline</p> <p style="text-align: center;">(+)-korydalin</p> <p style="text-align: center;">Obrázok prevzatý: (Cahliková et al. 2015).</p>	(+) -coryd.
(+) -korypalmin ((+) -corypalmine)	 <p style="text-align: center;">Corypalmine</p> <p style="text-align: center;">(+)-korypalmin</p> <p style="text-align: center;">Obrázok prevzatý: (Cahliková et al. 2015).</p>	(+) -corypal.
(+) -tetrahydropalmin ((+) -tetrahydropalmatine)	 <p style="text-align: center;">Tetrahydropalmatine</p> <p style="text-align: center;">(+)-tetrahydropalmin</p> <p style="text-align: center;">Obrázok prevzatý: (Cahliková et al. 2015).</p>	(+) -tetrah.

<p>(+)-taliktrikavin ((+)-thalictricavine)</p>	 <p>Thalictricavine</p> <p>(+)-taliktrikavin</p> <p>Obrázok prevzatý: (Cahliková et al. 2015).</p>	<p>(+)-thalictr.</p>
<p>9-O-demetylhomolykorin (9-O-demethylhomolycorine)</p>	 <p>9-O-demetylhomolykorin</p> <p><b>R=OH</b></p> <p>Obrázok prevzatý: (Shammari et al. 2021).</p>	<p>9-O-dem.</p>
<p>Ambelin (Ambelline)</p>	 <p>Všeobecný vzorec derivátov ambelinu</p> <p>Obrázok prevzatý: (Breiterova 2019).</p>	<p>Ambe.</p>
<p>Karanin (Caranine)</p>	 <p>karanin</p> <p>Karanin</p> <p>Obrázok prevzatý: (Chlebek 2021).</p>	<p>Caran.</p>

Krinin (Crinine)	 <p style="text-align: center;">krinin</p> <p style="text-align: center;"><i>Krinin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Dalecka et al 2013).</i></p>	Crin.
Epimaritidin (Epimaritidine)	 <p style="text-align: center;"><b>I</b> <math>R^1 = H, R^2 = OH</math></p> <p style="text-align: center;"><i>(+)-epimaritidin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Ghosal et al. 1985).</i></p>	Epimar.
Galantamin (Galanthamine)	 <p style="text-align: center;">galanthamin</p> <p style="text-align: center;"><i>Galantamin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Dalecka et al 2013).</i></p>	Galanta.
Galantin (Galanthine)	 <p style="text-align: center;"><i>Galantin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Dalecka et al 2013).</i></p>	Galan.

Hemantamin (Haemanthamine)	 <p>haemanthamin <i>Hemantamin</i></p> <p>Obrázok prevzatý: (Dalecka et al 2013).</p>	Haema.
Hipeastrin (Hipeastrine)	 <p><i>Hipeastrin</i></p> <p><b>R=OH</b></p> <p>Obrázok prevzatý: (Breiterova 2019).</p>	Hippe.
Homolykorin (Homolycorine)	 <p>homolykorin <i>Homolykorin</i></p> <p>Obrázok prevzatý: (Dalecka et al 2013).</p>	Homo.
Lykorenin (Lycorenine)	 <p>lykorenin <i>Lykorenin</i></p> <p>Obrázok prevzatý: (Chlebek 2021).</p>	Lycoren.

Lykorin (Lycorine)	 <p style="text-align: center;">lykorin</p> <p style="text-align: center;"><i>Lykorin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Dalecka et al 2013).</i></p>	Lycori.
Masonin (Massonine)	 <p style="text-align: center;"><math>R^1 = R^2 = -O-CH_2-O-</math> masonin</p> <p style="text-align: center;"><i>Masonin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý z habilitačnej práce (Chlebek 2021).</i></p>	Mass.
Montanin (Montanine)	 <p style="text-align: center;">montanin</p> <p style="text-align: center;"><i>Montanin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Dalecka et al 2013).</i></p>	Mont.
Odulin (Oduleine)	 <p style="text-align: center;"><i>Odulein</i></p> <p style="text-align: center;"><b><math>R_1, R_2 = -CH_2-</math>, <math>R_3 = H</math></b></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Kreh a Matusch 1995).</i></p>	Odul.

Pankracin (Pankracine)	 <p style="text-align: center;"><i>Pankracin</i></p> <p style="text-align: center;"><math>R_1=H, R_2=OH, R_3=OH, R_4=H</math></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Shammari et al. 2021).</i></p>	Pank.
Tazetin (Tazettine)	 <p style="text-align: center;"><i>tazettin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Tazetin</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Dalecka et al 2013).</i></p>	Tazz.
Vitatin (Vittatine)	 <p style="text-align: center;"><i>Vitatin</i></p> <p style="text-align: center;"><math>R_1=OH, R_2=H</math></p> <p style="text-align: center;"><i>Obrázok prevzatý: (Shammari et al. 2021).</i></p>	Vitt.

## 5.6. Štatistická analýza dát

Časť našich experimentov bola prevedená dva razy (dva nezávislé experimenty,  $n=2$ ) v triplikátoch z časových dôvodov, časť experimentov sa podarilo opakovať tri razy. Pre štatistickú analýzu sme použili test ANOVA s Dunnettovým post hoc testom pre vyhodnotenie agonistickej aj antagonistickej aktivity testovaných látok. V prípade agonistickej aktivity alebo vyhodnotenia cytotoxického efektu sme porovnávali kontrolné vzorky so vzorkami buniek, ktoré boli vystavené testovaným alkaloidom. V prípade antagonistického efektu sme porovnávali Dunnettovým testom hodnoty agonistov (napr. OCA alebo LCA) a vzorku

s kombináciou tohto agonistu a testovaného alkaloidu. Software GraphPad Prism verzia 9.3. bola využitá pre tieto kalkulácie.  $p < 0.05$  je považované ako medze štatistickej významnosti vo všetkých experimentoch (značené \*). GrapPad Prism software bol tiež použitý pre fitovanie a výpočet hodnôt  $IC_{50}$  (koncentrácie, ktorá vyvolá 50 % inhibíciu).

## 6. VÝSLEDKY

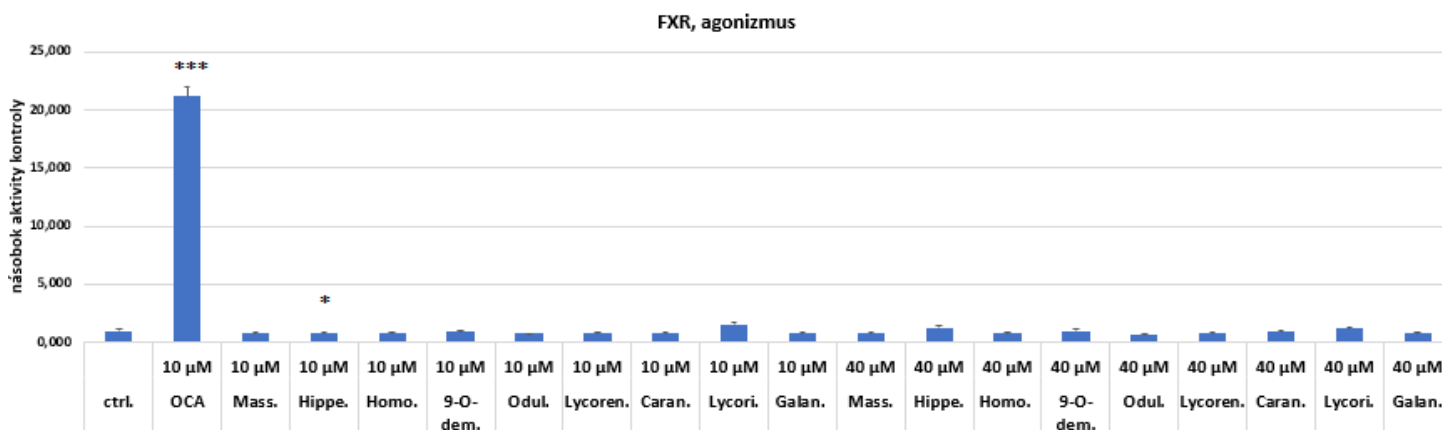
### 6.1. Génová reportérová esej

Túto esej sme prevádzali na základe princípu vysvetleného v kapitole 5.1.1.. Overovali sme agonistické a antagonistické vlastnosti dvadsiatich šiestich alkaloidov z *Corydalis cava* a *Narcissus pseudonarcissus* na FXR a TGR5 receptory, tzn. schopnosť týchto alkaloidov interagovať s danými receptormi.

Látky sme v experimentoch rozdelili do troch skupín podľa dizajnu experimentu na jednotlivých titračných doštičkách. Pracovali sme s dvoma rozdielnymi koncentraciami látok a to 10  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$  pre prevedenie presnejšej analýzy a u poslednej série skúmaných alkaloidov sme pracovali so 40  $\mu\text{M}$  koncentráciou.

#### 6.1.1. FXR agonizmus

Cieľom tohto experimentu bolo overiť schopnosť skúšaných alkaloidov pôsobiť ako agonisti FXR, to znamená aktivovať dané receptory. Ako negatívnu kontrolu, čo znamená, že neaktivuje dané receptory, sme použili vehikulum dimetylsulfoxid (DMSO) (v koncentracii 0.1 % v/v) a ako pozitívnu kontrolu, o ktorej je známe, že pôsobí ako agonista FXR, sme používali OCA. Agonistickú aktivitu prvej skupiny látok môžeme vidieť na obr. 15, druhej skupiny látok na obr. 16 a tretej skupiny skúmaných alkaloidov na obr. 17.

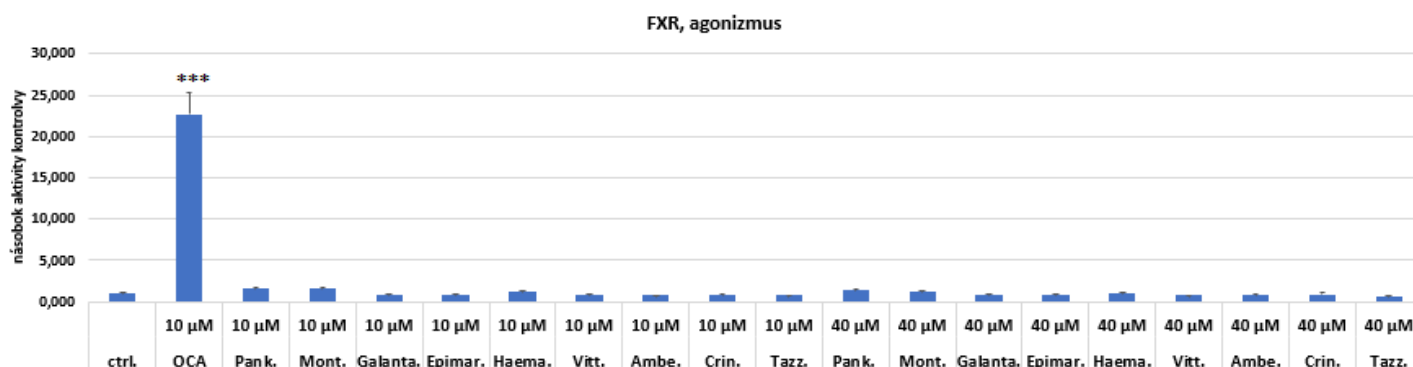


Obrázok 15 Agonistické vlastnosti 1. skupiny skúšaných alkaloidov. Žiaden z alkaloidov nevykazoval výrazný agonizmus oproti kontrole. Látky boli testované génovou reportérovou esejou (gene reporter assay) s DNA vektorom pFXRE-luc na bunkovej línii HepG2. Bunky boli exponované testovaným látkam počas 24 h. Tak nasledovala analýza svetluškovvej a Renilla luciferázovej aktivity. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl (kontrola).

Ctrl.- 0,1 % DMSO (dimetylsulfoxid, negatívna kontrola), OCA- obeticholová kyselina (pozitívna kontrola aktivujúca FXR v tejto esej), Mass.- masonin, Hippe.-hipeastrin, Homo.-homolykorin, 9-O-dem.- 9-O-demetylhomolykorin, Odul.- Odulin,

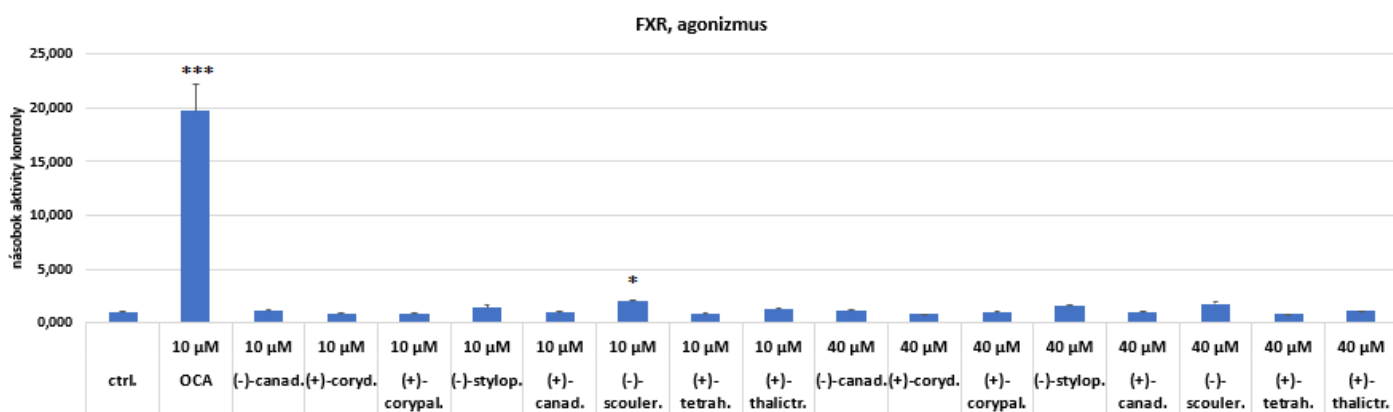


Lycoren.- lykorenin, Caran.- karanin, Lycori.- lykorin, Galan.- galantin. (popis metódy a skratky sú platné aj v nasledujúcich grafoch).



Obrázok 16 Agonistické vlastnosti 2. skupiny skúšaných alkaloidov. Žiaden z alkaloidov nevykazoval výrazný agonizmus oproti kontrole. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

Ctrl.- 0,1 % DMSO (dimetylsulfoxid, negatívna kontrola), OCA- obeticholová kyselina (pozitívna kontrola aktivujúca FXR v tejto eseji), Pank.- pankracin, Mont.- montanin, Galanta.- galantamin, Epimar.- epimaritidin, Haema.- hemantamin, Vitt.- vitatin, Ambe.- ambelin, Crin.- krinin, Tazz.- tazetin. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát.



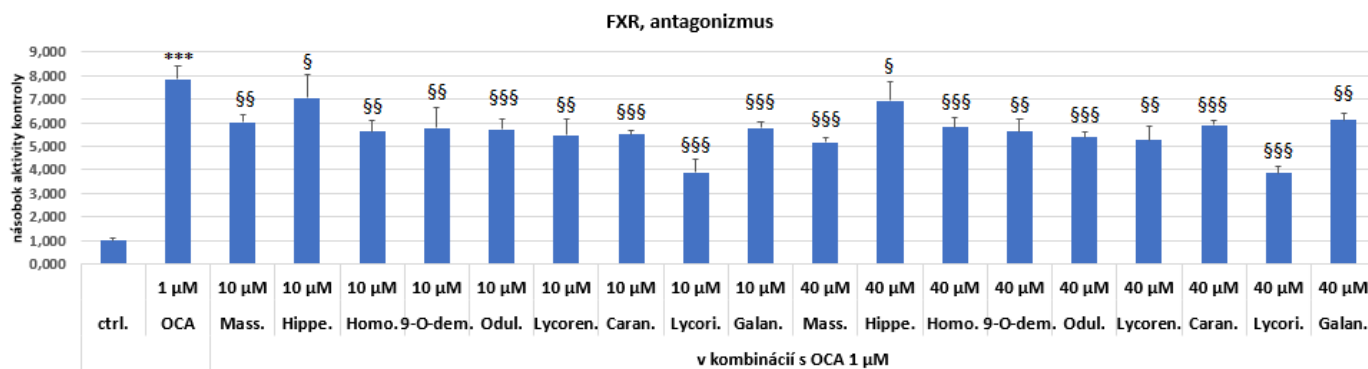
Obrázok 17 Agonistické vlastnosti 3. skupiny skúšaných alkaloidov. Žiaden z alkaloidov nevykazoval výrazný agonizmus oproti kontrole. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

OCA- obeticholová kyselina (pozitívna kontrola aktivujúca FXR v tejto eseji), (-)-canad.- (-)-kanadin, (+)-coryd.- (+)-korydalin, (+)-corypal.- (+)-korypalmin, (-)-stylop.- (-)-stylopin, (+)-canad.- (+)-kanadin, (-)-scouler.- (-)-skoulerin, (+)-tetrah.- (+)-tetrahydropalmin, (+)-thalictr.- (+)-taliktrikavin. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát.

Žiaden zo skúmaných alkaloidov nevykazoval štatisticky významnú agonistickú aktivitu ( $p < 0,5$ ) k FXR okrem (-)-skoulerinu. Ten však aktivoval FXR len veľmi slabou, čo pre náš výskum nie je atraktívne, vzhľadom na to, že sú známe oveľa silnejšie ligandy vykazujúce agonistické schopnosti k FXR. Hipeastrin mierne inhiboval aktivitu FXR dependentnej eseje, čo však môže byť skôr vplyv na cytotoxicitu. Ďalšie experimenty by mali tieto dáta potvrdiť.

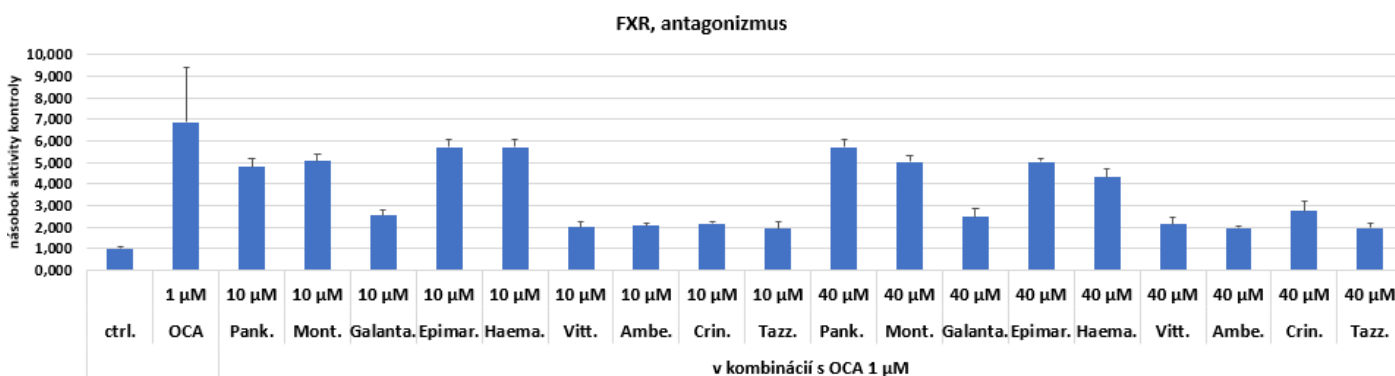
### 6.1.2. FXR antagonizmus

V rámci tohto experimentu sme hodnotili schopnosti daných alkaloidov pôsobiť ako antagonisti FXR, čo znamená, schopnosť viazať sa na receptor bez jeho aktivácie a brániť naviazaniu agonistu. Tým sme hodnotili, v akej miere bola znížená aktivita OCA (čo je modelový agonista) po aplikovaní skúšaných látok, oproti kontrole (OCA), t.j. čistému agonistovi v koncentrácii 1  $\mu\text{M}$ . Výsledky prvej skupiny látok môžeme vidieť na obr. 18, druhej skupiny látok na obr. 19 a tretej skupiny skúmaných alkaloidov na obr. 20.



Obrázok 18 Antagonistické vlastnosti 1. skupiny skúšaných alkaloidov. Látky boli testované génovou reportérovou esejou (gene reporter assay) s DNA vektorom pFXRE-luc na bunkovej línii HepG2. Bunky boli exponované testovaným látkam počas 24 h v kombinácii s kyselinou obeticholovou v koncentrácii 1  $\mu\text{M}$ . Potom nasledovala analýza svätluškovej a Renilla luciferázovej aktivity. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. (popis metódy je platný aj v nasledujúcich dvoch grafoch). Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.; §§§ $p < 0,001$ , §§ $p < 0,01$ , § $p < 0,05$  vs. 1  $\mu\text{M}$  OCA.

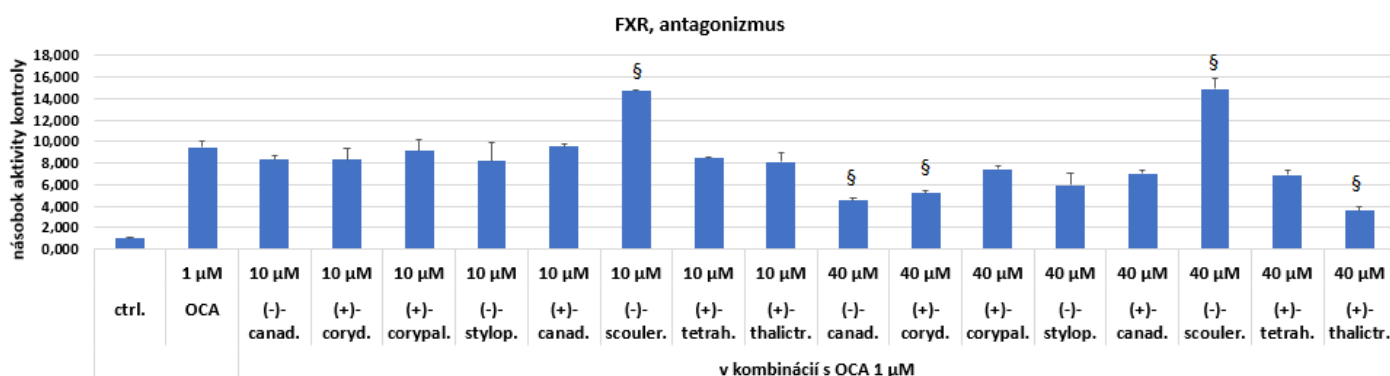
Všetky zo skúmaných látok vykazovali štatisticky významné antagonistické vlastnosti k TGR, najsilnejšie však lykordin. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Dáta boli porovnávané k účinku OCA (1  $\mu\text{M}$ ).



Obrázok 19 Antagonistické vlastnosti 2. skupiny skúšaných alkaloidov. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Dáta boli porovnávané k účinku OCA (1  $\mu\text{M}$ ). Hodnoty sú prezentované ako priemer

$\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.; §§§ $p < 0,001$ , §§ $p < 0,01$ , § $p < 0,05$  vs. 1  $\mu$ M OCA.

Žiadna látka z tejto skupiny nevykazovala štatisticky významnú antagonistickú aktivitu v dôsledku veľkej štatistickej chyby u vzorky OCA. Látky však evidentne mali inhibičnú aktivitu na FXR.



Obrázok 20 Antagonistické vlastnosti 3. skupiny skúšaných alkaloidov. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Dáta boli porovnávané k účinku OCA (1  $\mu$ M). Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.; §§§ $p < 0,001$ , §§ $p < 0,01$ , § $p < 0,05$  vs. 1  $\mu$ M OCA.

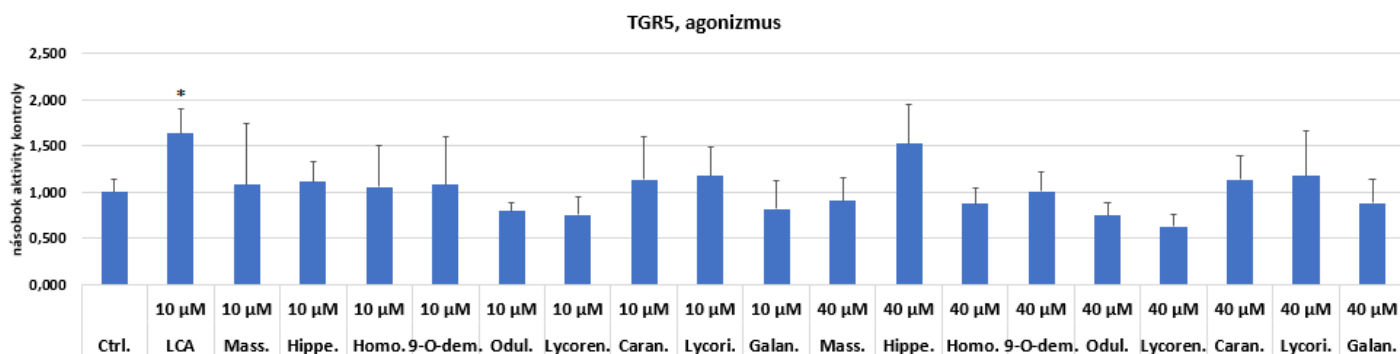
Ako antagonisti FXR pôsobili v týchto experimentoch (-)-kanadin, (+)-korydalin a (+)-taliktrikavin v 40  $\mu$ M koncentráciách. (-)-skoulerin preukázal schopnosť potenciovat', teda zvyšovať účinok OCA v 10  $\mu$ M aj 40  $\mu$ M koncentráciách.

Z nameraných výsledkov vyplýva, že látky masonin, homolykorin, 9-O-demetylhomolykorin, odulin, lykorenin, karanin, lykorin a galantin by mohli byť antagonistami FXR receptora v 10  $\mu$ M aj 40  $\mu$ M koncentráciách (viď. obr. 17) a tiež (-)-kanadin, (+)-korydalin a (+)-taliktrikavin v 40  $\mu$ M koncentráciách (viď. obr. 19). Zároveň (-)-skoulerin v oboch koncentráciách by mohol potenciovat' agonistickú aktivitu OCA (viď. obr. 19).

### 6.1.3. TGR5 agonizmus

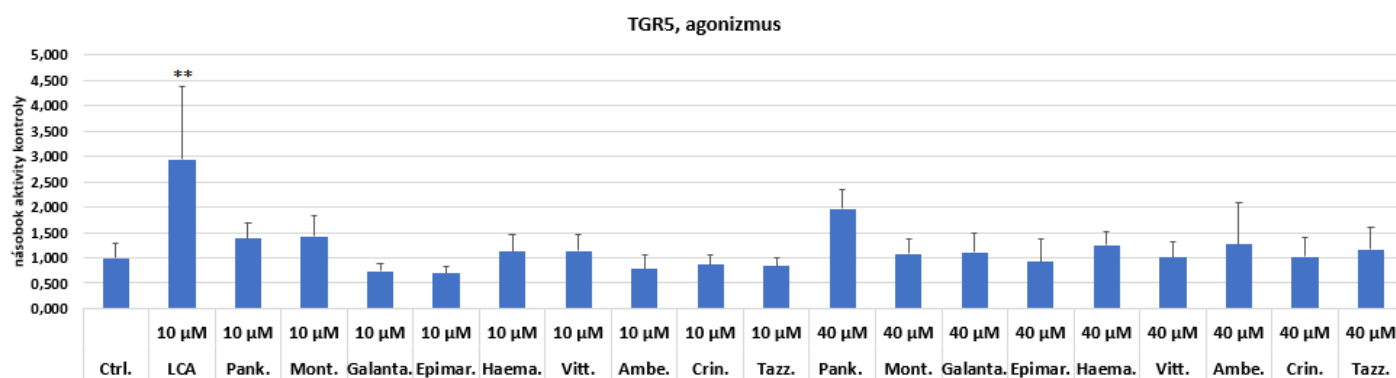
Cieľom tohto experimentu bolo overiť schopnosť skúšaných alkaloidov pôsobiť ako agonisti TGR5, to znamená naviazať sa na receptor a aktivovať ho. Ako negatívnu kontrolu, čo znamená, že neaktivuje dané receptory, sme použili vehikulum dimetylsulfoxid (DMSO) 0,1 % (v/v) a ako pozitívnu kontrolu, o ktorej je známe, že pôsobí ako agonista TGR5, sme používali

LCA (10  $\mu$ M). Agonistickú aktivitu prvej skupiny látok môžeme vidieť na obr. 21, druhej skupiny látok na obr. 22 a tretej skupiny skúmaných alkaloidov na obr. 23.



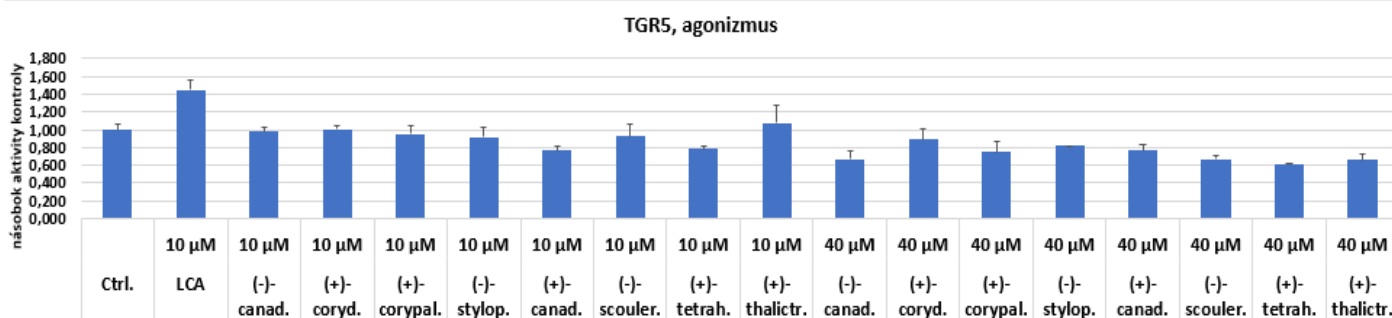
Obrázok 21 Agonistické vlastnosti 1. skupiny skúšaných alkaloidov. Látky boli testované génovou reportérovou esejou (gene reporter assay) s DNA vektormi pCRE-luc a GPBAR1 na bunkovej línii HepG2. Bunky boli exponované testovaným látkam počas 24 h. Potom nasledovala analýza svetluškovej a Renilla luciferázovej aktivity. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. (popis metódy je platný aj v nasledujúcich dvoch grafoch). Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

Žiaden z týchto alkaloidov nepôsobil ako agonista TGR5.



Obrázok 22 Agonistické vlastnosti 2. skupiny skúšaných alkaloidov. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

V tomto experimente sme opäť pozorovali, že žiaden z testovaných alkaloidov nepôsobil ako agonista TGR5.

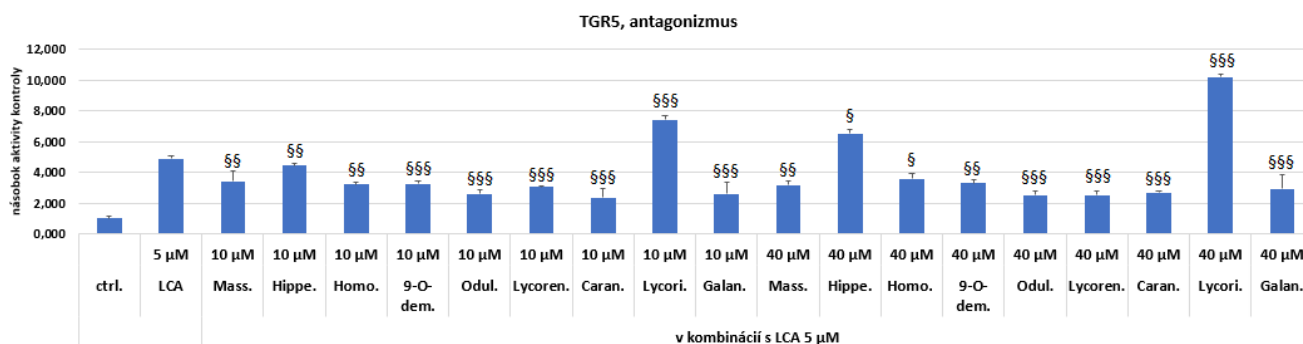


Obrázok 23 Agonistické vlastnosti 3. skupiny skúšaných alkaloidov. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl..

Tieto experimenty je možné zhrnúť tak, že žiadna z testovaných látok nepreukázala štatisticky signifikantné účinky v týchto experimentoch.

#### 6.1.4. TGR5 antagonizmus

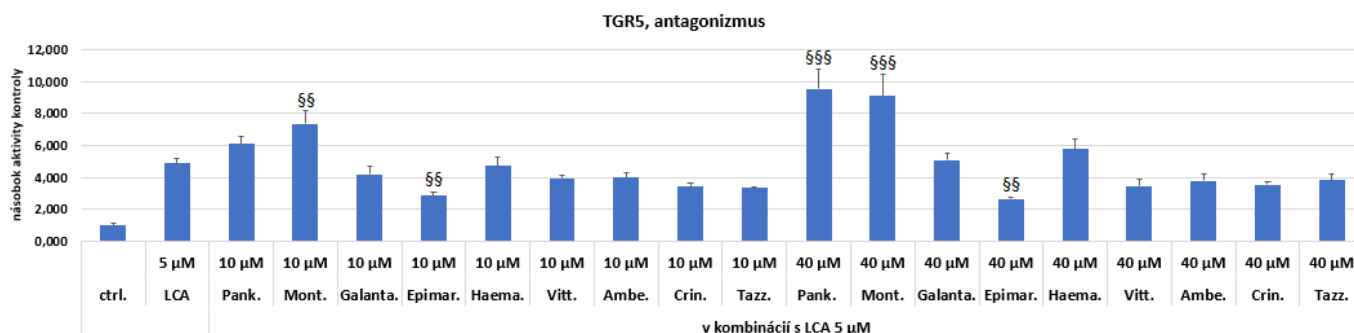
V rámci tohto experimentu sme hodnotili schopnosti daných alkaloidov pôsobiť ako antagonisti TGR5, čo znamená, schopnosť viazať sa na receptor bez jeho aktivácie a brániť naviazaniu agonistu. Tým sme hodnotili, o koľko bola znížená aktivita LCA (agonistu) po aplikovaní skúšaných látok, oproti kontrole (LCA), t.j. čistému agonistovi. Látky sme skúšali v 10  $\mu$ M a 40  $\mu$ M koncentráciách riedené 5  $\mu$ M LCA v zrovnaní s LCA v 5  $\mu$ M alebo 10  $\mu$ M koncentráciách (pozitívnej kontrole, o ktorej je známe, že pôsobí ako agonista TGR5). Ako negatívnu kontrolu, rovnako ako v predošlých experimentoch, sme používali 0,1 % DMSO. Výsledky prvej skupiny látok môžeme vidieť na obr. 24, druhej skupiny látok na obr. 25 a tretej skupiny skúmaných alkaloidov na obr. 26.



Obrázok 24 Antagonistické vlastnosti 1. skupiny skúšaných alkaloidov. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.; §§§ $p < 0,001$ , §§ $p < 0,01$ , § $p < 0,05$  vs. 10  $\mu$ M LCA.

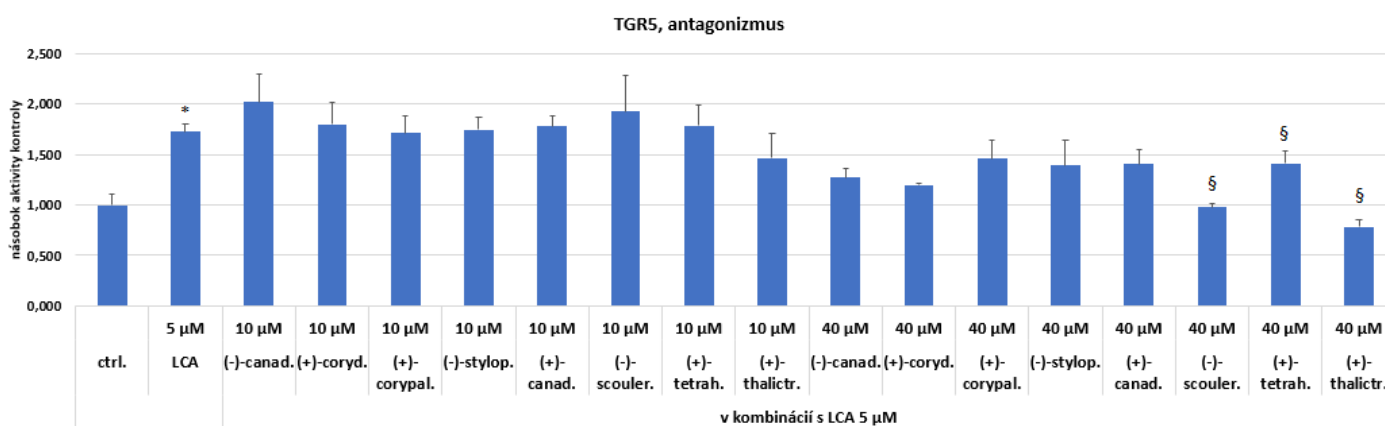
Všetky látky z tejto hodnotenej skupiny, okrem lykorinu v 10  $\mu$ M aj 40  $\mu$ M koncentráciách a hipeastrinu v 40  $\mu$ M koncentráciách, pôsobili ako antagonisti TGR5 v 10  $\mu$ M aj 40  $\mu$ M

koncentrácií. Lykorin mal schopnosť potencovať agonistické účinky LCA v oboch koncentráciách.



Obrázok 25 Antagonistické vlastnosti 2. skupiny skúšaných alkaloidov. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.; §§§ $p < 0,001$ , §§ $p < 0,01$ , § $p < 0,05$  vs. 5  $\mu$ M LCA.

Ako antagonista pôsobil epimaritidin v 10  $\mu$ M aj 40  $\mu$ M koncentrácií. Potenciačné účinky na agonizmus LCA vykazovali: montanin v 10  $\mu$ M aj 40  $\mu$ M koncentrácií a pankracin v 40  $\mu$ M koncentrácií.



Obrázok 26 Antagonistické vlastnosti 3. skupiny skúšaných alkaloidov. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.; §§§ $p < 0,001$ , §§ $p < 0,01$ , § $p < 0,05$  vs. 5  $\mu$ M LCA.

Štatisticky významnú antagonistickú aktivitu k TGR5 z alkaloidov tejto skupiny vykazovali: (-)-skoulerin, (+)-tetrahydropalmin a (+)-taliktrikavin v 40 mikromolárnej koncentrácií.

Výsledky týchto experimentov ide zhrnúť, že sme objavili niekoľko látok, ktoré javia antagonistickú aktivitu voči aktivovanému TGR5 receptoru.

### 6.1.5. Celkové vyhodnotenie dát

Na základe génových reportérových testov sme zhodnotili základné predpokladané agonistické a antagonistické účinky skúšaných alkaloidov na FXR a TGR5 receptory.

Ako významný agonista FXR nepôsobila žiadna zo skúmaných látok, slabé agonistické účinky na FXR však vykazoval 10  $\mu\text{M}$  (-)-skoulerin. (-)-skoulerin však výraznejšie potencioval účinky agonistu OCA v 10  $\mu\text{M}$  aj 40  $\mu\text{M}$  koncentrácií, čo sme zistili pri jeho použití v zmesi s OCA, ktorú sme primárne využívali k vyhodnocovaniu jeho antagonistických účinkov.

Rada látok vykazovala antagonistické účinky na FXR, a to: masonin, homolykorin, 9- O-demetylhomolykorin, odulin, lykorenin, karandin, lykorin a galantin v 10  $\mu\text{M}$  aj 40  $\mu\text{M}$  koncentráciách a tiež (-)-kanadin, (+)-korydalin a (+)-taliktrikavin v 40  $\mu\text{M}$  koncentrácií.

Žiadna zo skúmaných látok nepôsobila ako agonista TGR5. Potenciačné účinky na agonizmus LCA však mali lykorin a montanin v oboch koncentráciách a hipeastrin a pankracin v 40  $\mu\text{M}$  koncentrácií.

Ako antagonisti TGR5 v našich testoch pôsobili: masonin, homolykorin, 9- O- demetylhomolykorin, odulin, lykorenin, karandin, epimaritidin a galantin v 10  $\mu\text{M}$  aj 40  $\mu\text{M}$  a (-)-skoulerin, (+)-tetrahydropalmin a (+)-taliktrikavin v 40 mikromolárnej koncentrácií.

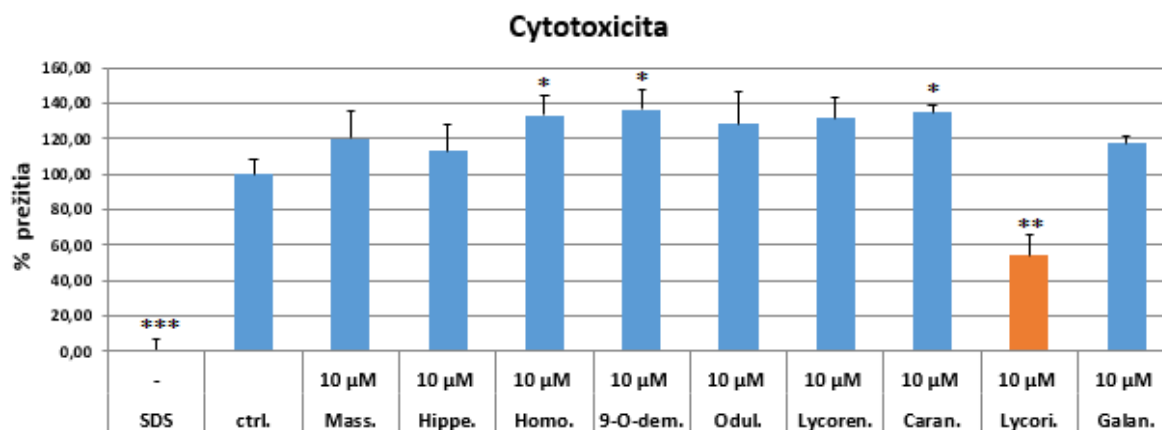
Všetky látky sme ďalej otestovali na cytotoxicitu, aby sme mohli zhodnotiť, či má význam s nimi pracovať ďalej a na základe výsledkov sme navrhli ďalšie experimenty. U najsilnejších z FXR antagonistov sme vykonali TR-FRET analýzu, na potvrdenie ich účinkov.

## 6.2. Cytotoxicita

Túto esej sme vykonávali podľa princípu popísaného v kapitole 5.1.2.. Určovali schopnosť prežitia (viability) živých kultivovaných buniek po aplikácii skúmaných látok na tieto bunky po 24 hodinách. Cytotoxicitu sme najprv vyhodnotili mikroskopicky a následne sme výsledky vyhodnocovali spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 490 nm. Hodnota absorpcie roztoku odpovedá množstvu živých buniek (čím tmavšia farba, tým viac živých buniek). Látky sme hodnotili najmenej v dvoch rôznych koncentráciách. Výsledky sme

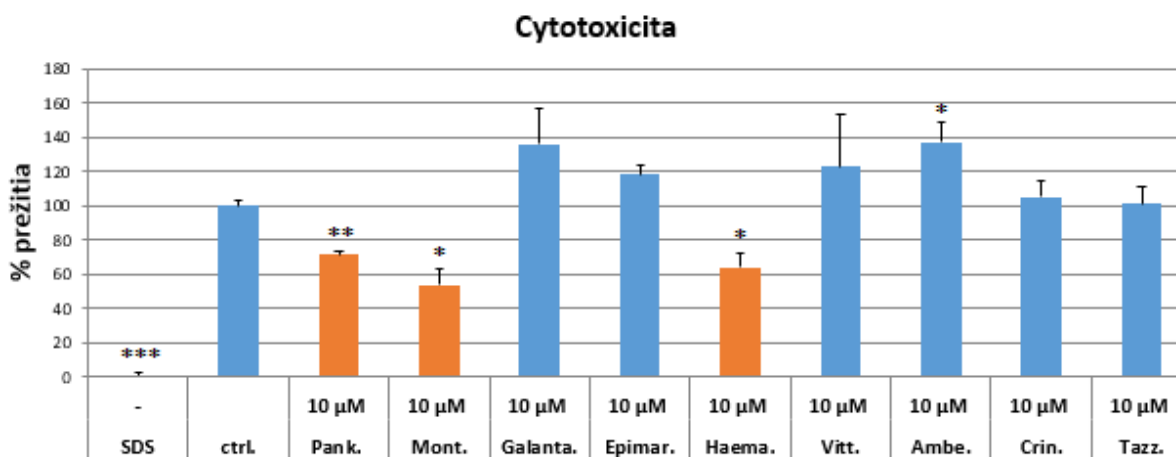
vyjadrili ako % prežitia oproti kontrole (vehikulum DMSO v objeme 0,1 % v/v, v ktorom sú 100 % živé bunky). Ako negatívnu kontrolu sme k DMSO (0,1 %) prikvapávali SDS (10 % roztok), ktorý je 100 % cytotoxický. Ako cytotoxické hodnotíme látky, ktoré spôsobili pod 80 % bunečnej viability. Výsledky prvej skupiny látok môžeme vidieť na obr. 27 a 29, druhej skupiny látok na obr. 28 a 30 a tretej skupiny skúmaných alkaloidov na obr. 33.

### 6.2.1. Cytotoxicita u všetkých látok



Obrázok 27 Skúška cytotoxicity u 1. skupiny látok v 10 µM koncentrácii. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

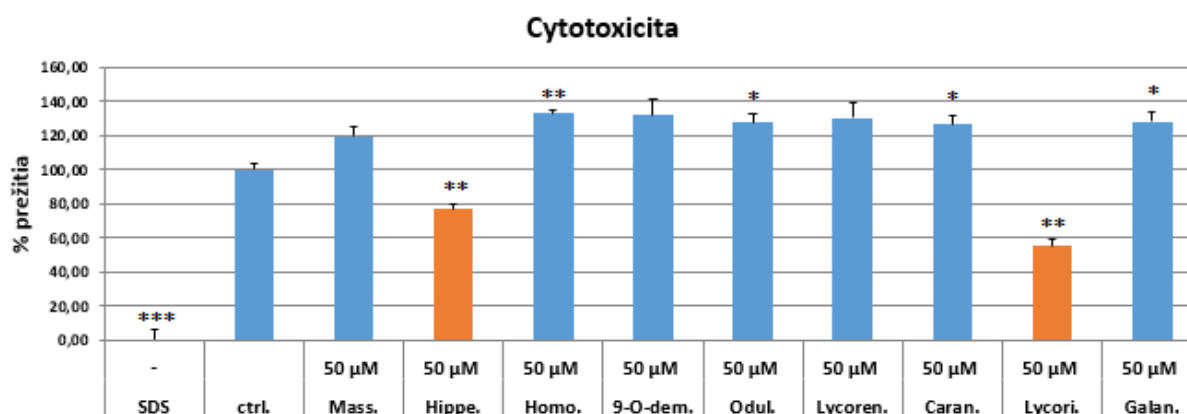
V týchto úvodných experimentoch bol iba lykorin toxický na bunky HepG2.



Obrázok 28 Skúška cytotoxicity u 2. skupiny látok v 10 µM koncentrácii. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

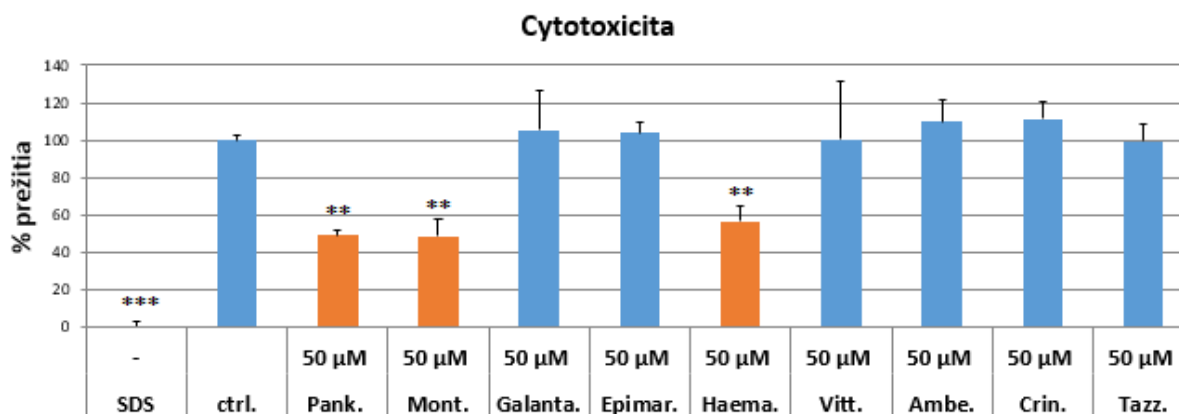


U druhej skupiny látok pankracin, montanin a hemantamin boli toxické na bunky HepG2.



Obrázok 29 Skúška cytotoxicity u 3. skupiny látok v 50 µM koncentrácií. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

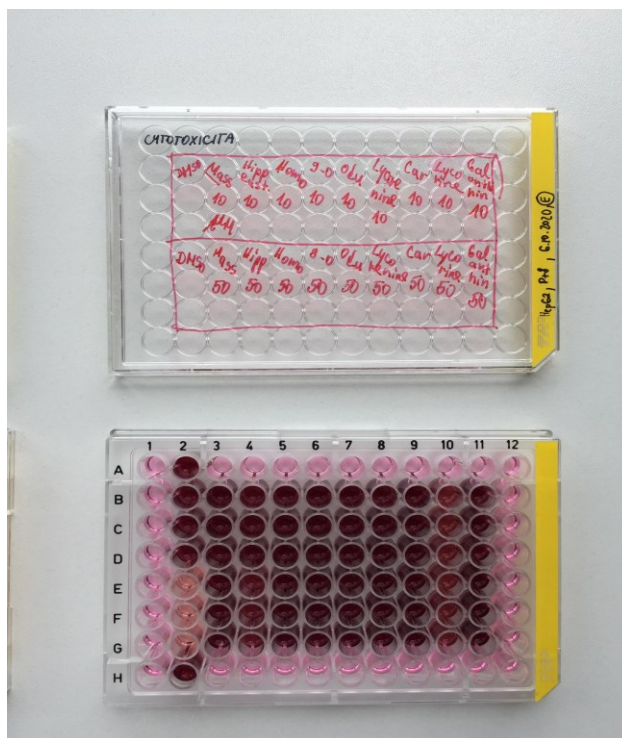
Toxický na bunky HepG2 bol v posledných cytotoxických experimentoch lykorin a hipeastrin.



Obrázok 30 Skúška cytotoxicity u 2. skupiny látok v 50 µM koncentrácií. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

Toxický na bunky HepG2 bol pankracin, montanin a hemantamin.

Na obrázkoch 31 a 32 môžeme vidieť vizuálne znázornenie cytotoxicity, kde najtmavšie jamky sú najviac metabolicky aktívne, s vyšším výskytom svetlejšej farby klesá ich schopnosť prežitia.

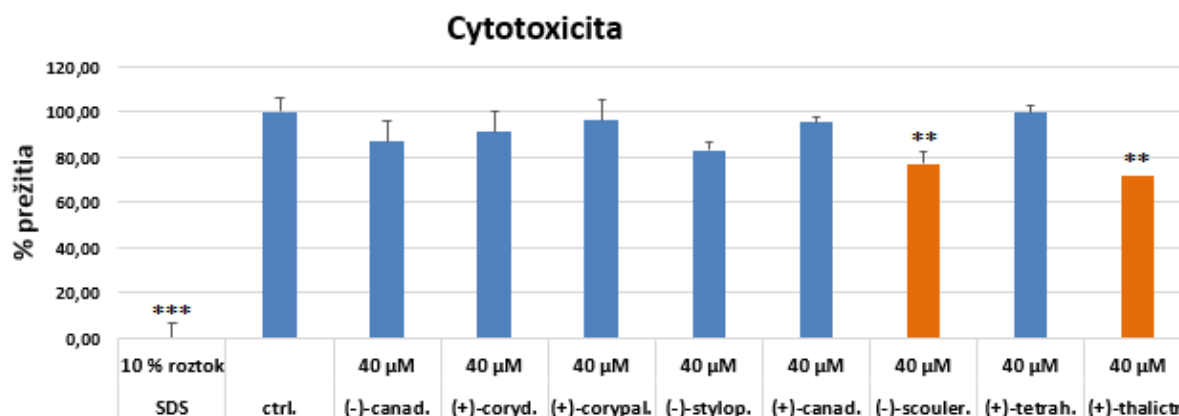


Obrázok 31 Obrázok experimentu 1. skupiny. Vizuálne znázornenie cytotoxicity- najtmavšie bunky sú najviac metabolicky aktívne, vid' DMSO. 2B-D a najsvetlejšie sú mŕtve, vid' DMSO s prikvapnutým SDS 10 % 2E-G.



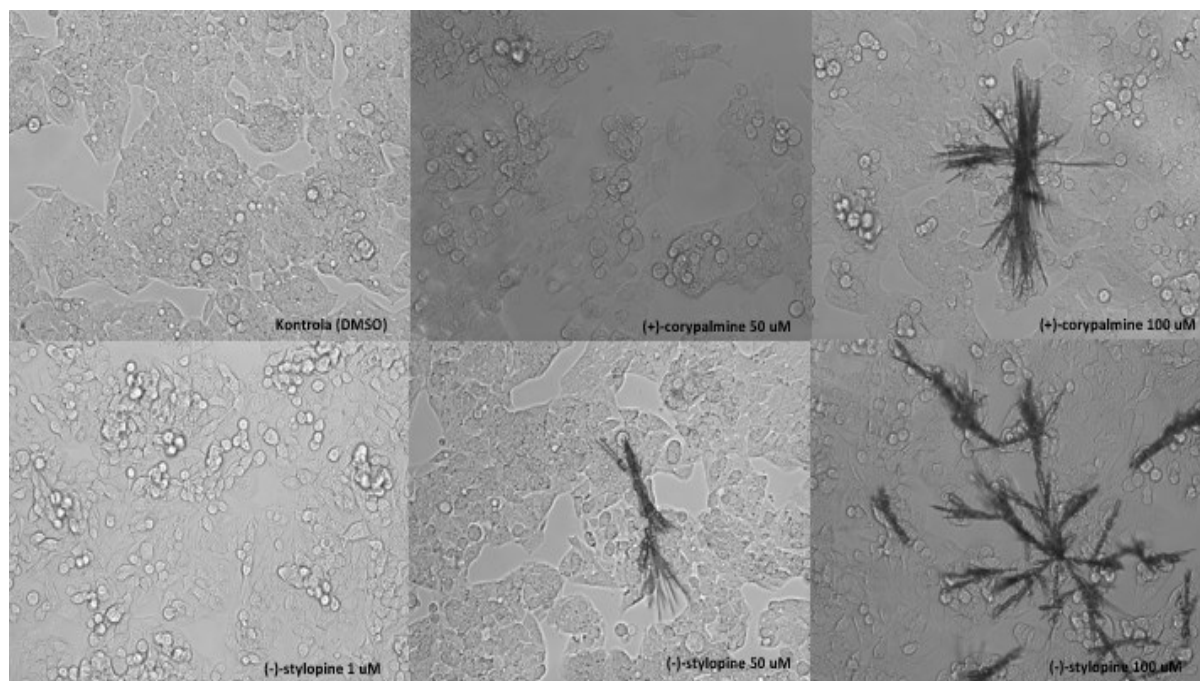
Obrázok 32 Obrázok experimentu 2. skupiny. . Vizuálne znázornenie cytotoxicity- najtmavšie bunky sú najviac metabolicky aktívne, vid' DMSO: 2B-D, a najsvetlejšie sú mŕtve, vid' DMSO s prikvapnutým SDS: 2E-G.

Všetky z predchádzajúcich skúmaných skupín vykazovali zodpovedajúce výsledky aj v mikroskopickej kontrole.

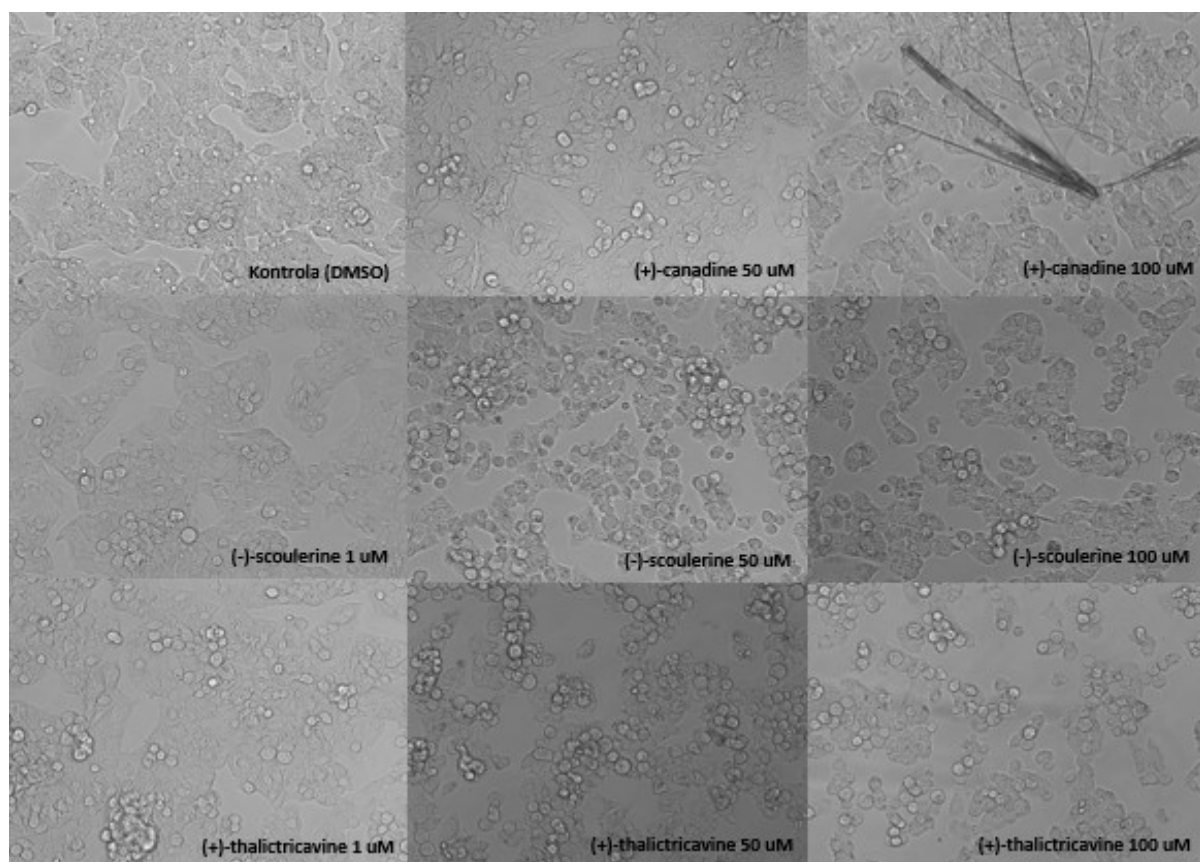


Obrázok 33 Skúška cytotoxicity u 3. skupiny látok v 40 µM koncentrácií. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

Túto skupinu látok sme následne hodnotili v troch rôznych koncentráciách pre spresnenie výsledkov. Avšak už pri mikroskopickej analýze vykazovala väčšina z nich cytotoxický efekt, čo môžeme vidieť na nasledujúcich obrázkoch 34 a 35. Preto sme ich, okrem (-)-kanadinu a (+)-korydalínu, z ďalších experimentov vylúčili. (-)-kanadin a (+)-korydalín sme hodnotili v podkapitole 6.3.5., nakoľko v génovej reporterovej eseji vykazovali značné antagonistické pôsobenie na FXR aj TGR5 a v mikroskopickej analýze sme nepozorovali ich toxický efekt na bunky.



Obrázok 34 Mikroskopický obraz analyzovaných alkaloidov po 24 h. Už u 50  $\mu\text{M}$  (+)-korypalminu a 1  $\mu\text{M}$  (-)-stylopinu môžeme pozorovať vyšší podiel mŕtvych buniek oproti kontrole. Tieto dve látky vo vyšších koncentráciách kryštalizovali. Zväčšenie 40x.



Obrázok 35 Mikroskopický obraz analyzovaných alkaloidov po 24 h. U 50 a 100  $\mu\text{M}$  (+)-kanadinu a u 1, 50 a 100  $\mu\text{M}$  (-)-skoulerinu a (+)-taliktrikavinu môžeme pozorovať vysoký, so zvyšujúcou sa koncentráciou stúpajúci, podiel mŕtvych buniek. Navyše 100  $\mu\text{M}$  (+)-kanadin kryštalizoval. Zväčšenie 40x.

### 6.2.2. Vyhodnotenie cytotoxicity u všetkých látok

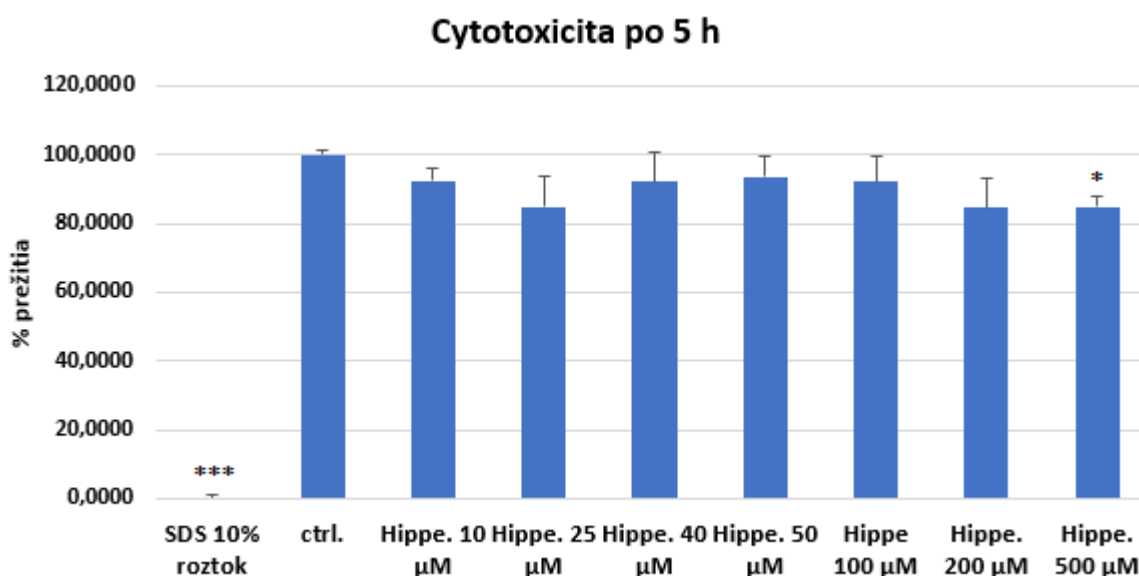
Cytotoxické z našich skúmaných alkaloidov boli: lykorin, pankracin, montanin a haemantamin v 10  $\mu\text{M}$  aj 50  $\mu\text{M}$  koncentrácií, (-)-skoulerin a (+)-thaliktrikavin v skúmanej 40  $\mu\text{M}$  koncentrácií a hippeastrin bol toxický iba v 50  $\mu\text{M}$ . Viditeľne cytotoxické už po mikroskopickej analýze boli aj: (-)-korypalmin, (-)-stylopin, (+)-kanadin, (-)-skoulerin, (+)- tetrahydropalmatin.

Nakoľko sa toxicita hippeastrinu v 10  $\mu\text{M}$  koncentrácií nepotvrdila a zároveň sme zistili, že v 50  $\mu\text{M}$  už toxicky bol a v génovej reporterovej eseji vykazoval potenciačné účinky na aktivitu LCA u TGR5, v nasledujúcich experimentoch sme skúšali jeho toxicitu v rôznych koncentráciách, aby sme zistili, jeho maximálnu netoxickú koncentráciu.

Ostatné cytotoxické látky sme z experimentov vylúčili a následne sme pracovali s látkami, ktoré v predošlých testoch vykazovali najslubnejšie výsledky. Boli to: (-)-kanadin, (+)-korydalin pre ich antagonistické účinky na FXR aj TGR5.

### 6.2.3. Cytotoxicita hippeastrinu

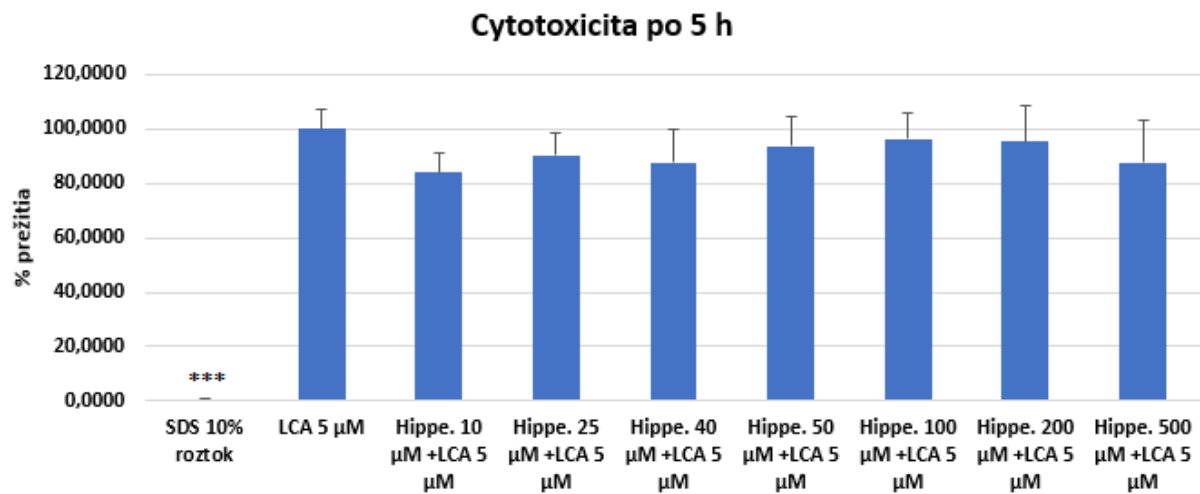
V nasledujúcich testoch sme vyhodnocovali cytotoxicitu u hippeastrinu a hippeastrinu riedeného s 5  $\mu\text{M}$  LCA. Hippeastrin sme používali v 10, 25, 40, 50, 100, 200 a 500  $\mu\text{M}$  koncentrácií a cytotoxicitu sme vyhodnocovali po 5, 24 a 48 hodinách (vid' obr. 36-41).



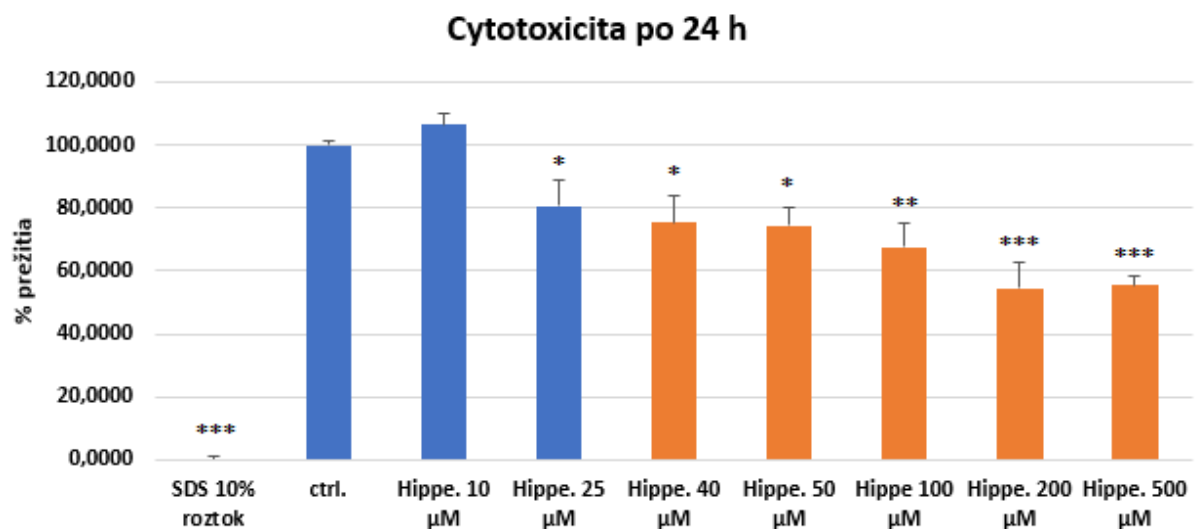
Obrázok 36 Cytotoxicita hippeastrinu po 5 h: v žiadnej koncentrácii nebol toxický. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Dáta boli porovnávané k účinku kontroly (ctrl). SDS 10 %



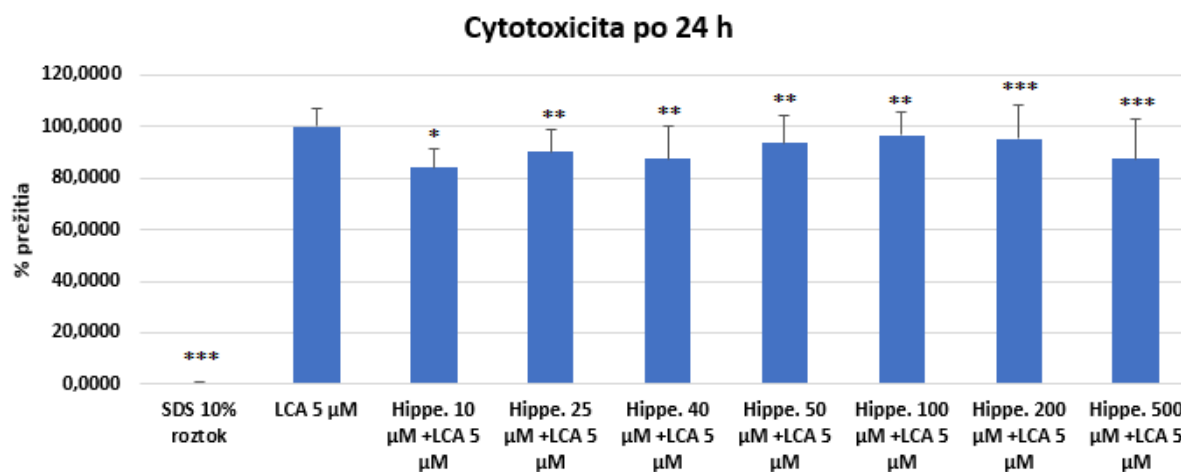
je pozitívna kontrola cytotoxickej látky. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ).  $***p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$ ,  $*p < 0,05$  vs. ctrl.



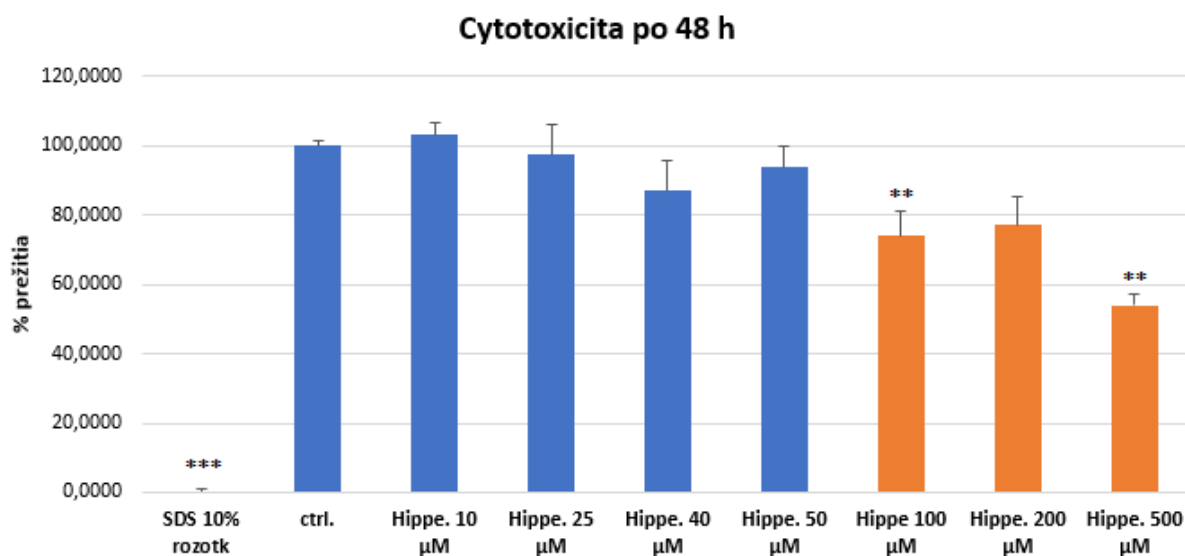
Obrázok 37 Cytotoxicita hippeastrinu po 5 h v riedení s LCA 5  $\mu$ M: v žiadnej koncentrácii nebol toxický. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. SDS 10 % je pozitívna kontrola cytotoxickej látky. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ).  $***p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$ ,  $*p < 0,05$  vs. ctrl.



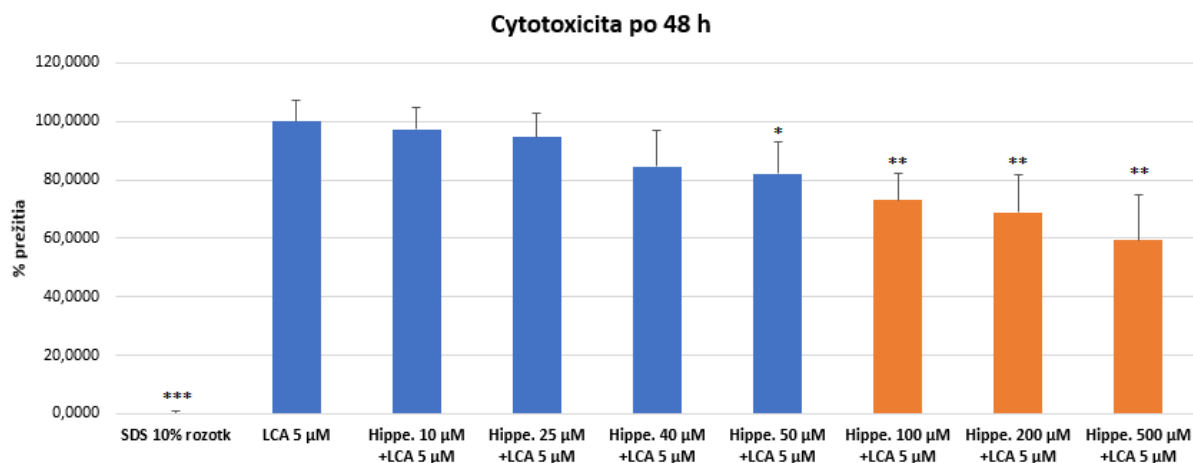
Obrázok 38 Cytotoxicita hippeastrinu po 24 h: v koncentrácií od 40  $\mu$ M vyššie, bol cytotoxický. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ).  $***p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$ ,  $*p < 0,05$  vs. ctrl.



Obrázok 39 Cytotoxicita hippeastrinu po 24 h v riedení s LCA 5 µM: v žiadnej koncentrácii nebol toxický. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.



Obrázok 40 Cytotoxicita hippeastrinu po 48 h: v koncentrácií 100 µM a 500 µM bol štatisticky významne cytotoxický, avšak v rámci odychliek je možné, že toxicky pôsobí už od 40 µM koncentrácie, ako to bolo už po 24 h. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.



Obrázok 41 Cytotoxicita hippeastrinu po 48 h v riedení s LCA 5 μM: v koncentráciách od 100 μM a vyššie bol toxický. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.

#### 6.2.4. Vyhodnotenie cytotoxicity hippeastrinu

Hippeastrin po 5 h pôsobení nebol cytotoxický v žiadnej, ani najvyššej, koncentrácií a ani v kombinácií s LCA.

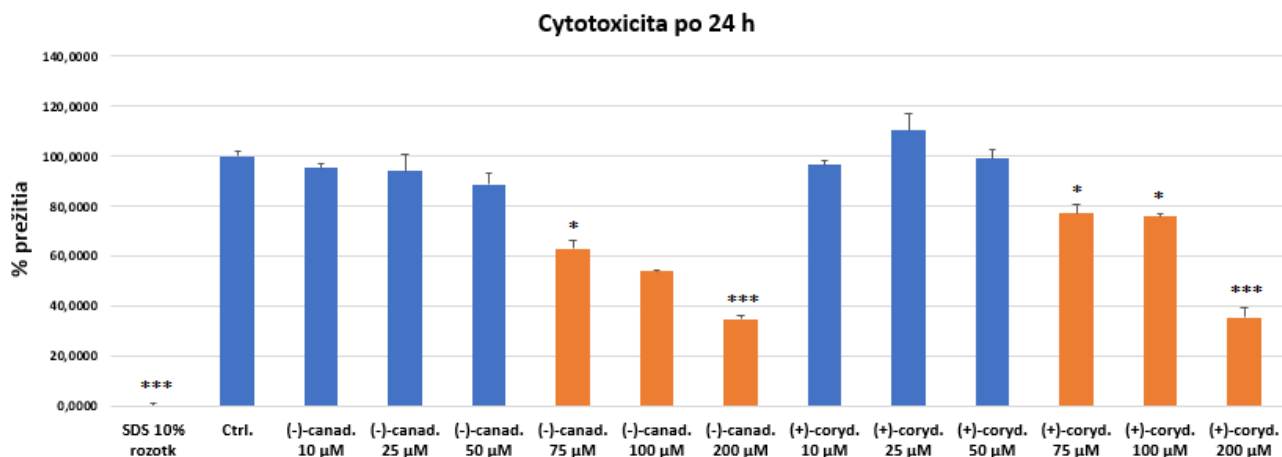
Po 24 h pôsobení bol hippeastrin toxický v koncentráciách od 40 μM. Jeho kombinácia s LCA po 24 h nebola toxická v žiadnej zo skúmaných koncentrácií.

Po 48 h pôsobení v našich testoch vychádzal hippeastrin toxický v koncentráciách 100 μM a 500 μM. V kombinácií s LCA bol po 48 h pôsobení na bunky toxický od koncentrácie 100 μM a viac.

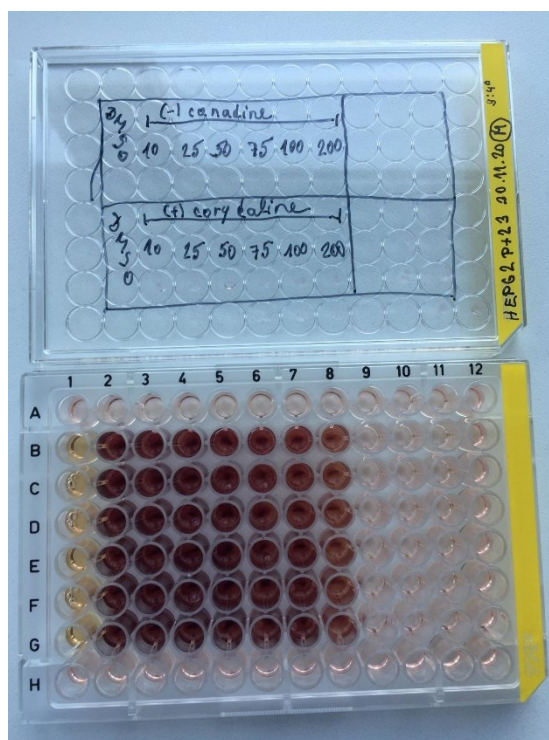
#### 6.2.5. Cytotoxicita (-)-kanadinu a (+)-korydalinu

Nakoľko (-)-kanadin a (+)-korydalin vykazovali antagonistické účinky v gémovej reportérovej eseji a zároveň v predchádzajúcom teste cytotoxicity v 40 μM koncentrácií nevykazovali cytotoxickú aktivitu na FXR aj TGR5, skúšali sme ďalej ich cytotoxicitu v rôznych koncentráciách, a to: 10, 25, 50, 75, 100 a 200 μM (vid'. obr. 42), zároveň vizuálne znázornenie experimentu môžeme vidieť na obr. 43.





Obrázok 42 Cytotoxicita (-)-kanadinu a (+)-korydalínu po 24 h. Obe boli toxické v koncentráciách 75 a 200  $\mu\text{M}$  a (+)-korydalin aj v 100  $\mu\text{M}$  so štatistickou významnosťou dát. Analýza ANOVA s Dunnettovým testom bola použitá pre štatistickú analýzu nameraných dát. Hodnoty sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD viacerých nezávislých experimentov uskutočnených v biologických triplikátoch ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. ctrl.



Obrázok 43 Vizuálne zobrazenie cytotoxicity (-)-kanadinu a (+)-korydalínu. Najtmavšie bunky sú najviac metabolicky aktívne, vid' DMSO: 2B-G, a najsvetlejšie sú mŕtve, vid' DMSO s prikvapnutým SDS: 2B-G.

### 6.2.6. Vyhodnotenie (-)-kanadinu a (+)-korydalínu

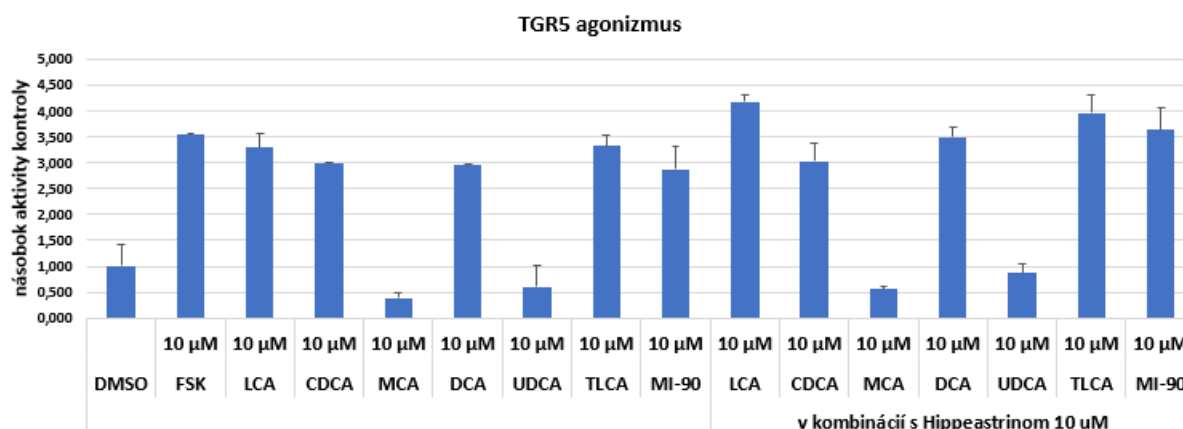
(-)-kanadin, rovnako ako aj (+)-korydalin boli cytotoxické v koncentráciách 75  $\mu\text{M}$  a viac, avšak štatistickú významnosť preukázali všetky látky okrem 100  $\mu\text{M}$  (-)-kanadinu, z čoho vyplýva, že jeho cytotoxicitu v tejto koncentrácií nevieme s presnosťou určiť. V nižších

koncentráciách toxické účinky na bunky nevykazovali, preto môžeme s týmito koncentraciami pracovať v rámci ďalších skúšok.

### 6.3. Následné génové reportérové eseje u Hippeastrinu

Nakoľko, ako už bolo spomenuté, hipeastrin vykazoval známky potenciačnej aktivity na agonizmus LCA u TGR5 a zároveň v koncentrácií do 40  $\mu\text{M}$  nebol cytotoxický, navyše v kombinácií s LCA bol po 48 h pôsobení cytotoxický až od koncentrácie 100  $\mu\text{M}$  a viac, vykonali sme ďalšie experimenty s cieľom bližšieho objasnenia jeho aktivity.

V nasledujúcom experimente sme overili schopnosť hipeastrinu potencovať účinky aj iných TGR agonistov, a to okrem LCA aj CDCA, MCA, DCA, UDCA, TLCA a špecifického agonistu MI-90 oproti agonistickým vlastnostiam týchto látok v „čistom stave“ (teda bez hipeastrinu), vid'. obr. 44.



Obrázok 44 Schopnosť hipeastrinu potencovať účinky iných agonistov. Táto schopnosť sa prejavila u všetkých zo skúmaných agonistov, okrem CDCA. Najvyššie však u LCA, kedy LCA s Hipeastrinom v 10  $\mu\text{M}$  koncentrácií pôsobili až 4,19-násobne v zrovnaní s kontrolou (DMSO 0,1 % v/v), nakoľko čistá LCA pôsobila iba 3,30-násobne oproti kontrole. Druhý agonista s touto najvyššou schopnosťou bol MI-90.

#### 6.3.1. Vyhodnotenie

Na základe tohto experimentu sme potvrdili najvyššie potenciačné účinky hipeastrinu práve na LCA. Aj keď hipeastrin preukázal schopnosť potencovať účinky všetkých skúmaných agonistov, okrem CDCA, na ostatné pôsobil nižšou aktivitou.

Tento experiment bol robený iba jeden raz, preto sme dáta neanalyzoval štatistickou metódou.

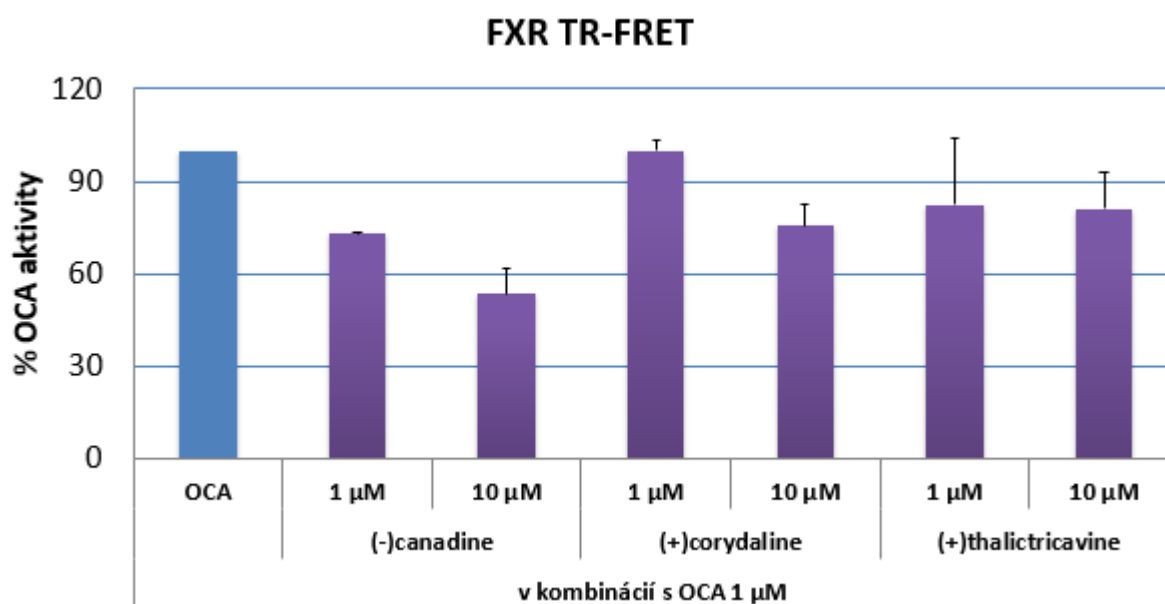
V rámci ďalších experimentov sme skúmali aktivitu v stúpajúcich koncentračných radách hipeastrinu a taktiež v stúpajúcich koncentračných radách LCA. Taktiež sme

prevádzali experimenty s modifikovanými receptormi. Kvôli značnej rozsiahlosti experimentálnej práce sme tieto experimenty do mojej diplomovej práce nezahrnuli, avšak zistili sme, že hippeastrin sa javí byť zaujímavým cieľom ďalších výskumov.

V ďalších kapitolách sme sa zamerali na hodnotenie antagonistickej aktivity (-)-kanadinu, (+)-korydalínu a (-)-thaliktrikavínu na FXR, čo sme pre ďalšie smerovanie tejto práce zhodnotili na základe predošlých výrazne antagonistických výsledkov ako hlavný cieľ.

#### 6.4. Časovo rozlíšený fluorescenčný rezonančný prenos energie (TR-FRET)

Na určenie schopnosti skúmaných alkaloidov viazať sa priamo na rekombinantnú proteínovú doménu viažucu ligand FXR bez použitia bunecnej línie, sme vykonali TR-FRET esej, bližšie popísanú v kapitole 5.1.3., u alkaloidov, ktoré v gémovej reportérovej eseji vykazovali najvýraznejšiu potenciálnu antagonistickú aktivitu k FXR, t.j. (-)-kanadin, (+)-korydalín a (-)-thaliktrikavín. Pracovali sme v dvoch riedeniach, a to 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ . Výsledky sme vyjadrili ako percento aktivity OCA po aplikácii daných látok. Táto esej slúži na potvrdenie antagonistickej aktivity skúmaných alkaloidov k FXR (vid'. obr. 45).



Obrázok 45 Percentuálne vyjadrená aktivácia TGR5 prostredníctvom OCA v zmesi so skúmanými látkami v zrovnaní s OCA 1  $\mu\text{M}$ .

Najsilnejší antagonista bol (-)-kanadin v 10  $\mu\text{M}$  koncentracii, ktorý znižoval aktiváciu receptora sprostredkovanú OCA o 47 % v zrovnaní s plnou OCA aktiváciou, to znamená, že OCA 1  $\mu\text{M}$  v zmesi s 10  $\mu\text{M}$  (-)-kanadínom aktivovala FXR len na 53 %. Druhým najsilnejším

antagonistom bol (-)-kanadin v 1  $\mu\text{M}$  koncentrácií. Ďalšie látky, okrem (+)-korydalínu (100 % aktivita) v 1  $\mu\text{M}$  koncentrácií, taktiež pôsobili ako antagonisti FXR, čím sme ich antagonistickú aktivitu potvrdili.

Tento experiment bol robený iba jeden raz v triplikáte, preto sme dáta neanalyzovali štatistickou metódou.

#### **6.4.1. Vyhodnotenie**

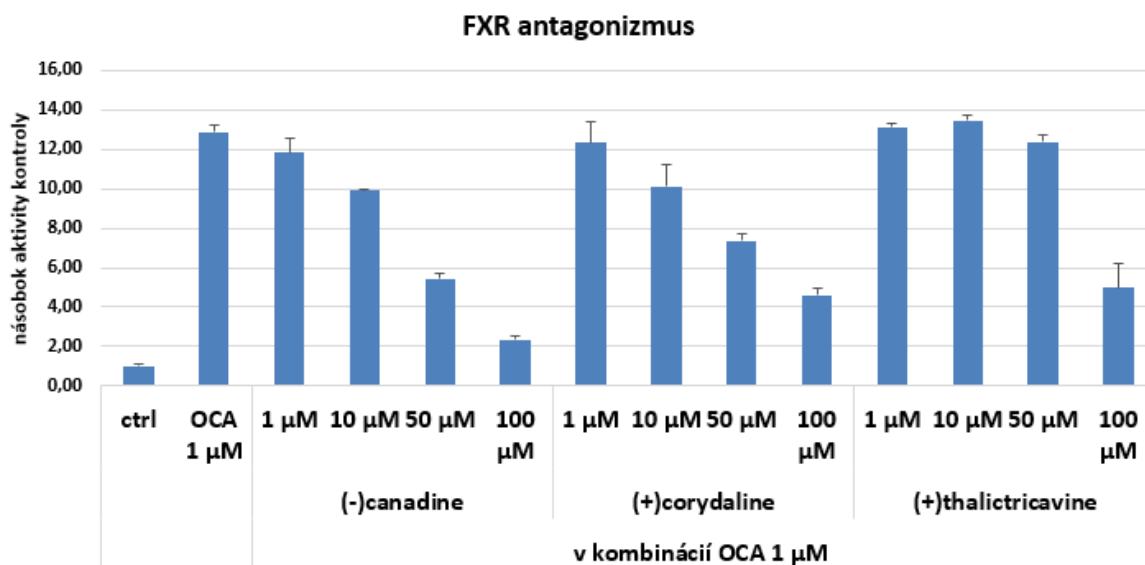
Na základe testu TR-FRET sme určili schopnosť alkaloidov, ktoré v predošlej eseji vykazovali najsilnejšie antagonistické pôsobenie na FXR, viazať sa priamo na ligand viažucu doménu FXR a zhodnotili sme, v akej percentuálnej miere sú schopné brániť naviazaniu agonistu, čím sme potvrdili ich antagonistické účinky.

U všetkých zo skúmaných alkaloidov sa potvrdilo antagonistické pôsobenie na FXR, avšak (+)-korydalín vyžadoval vyššiu koncentráciu, nakoľko u 1  $\mu\text{M}$  sa antagonisticky účinok neosvedčil, avšak u 10  $\mu\text{M}$  dokázal znížiť účinok OCA (agonistu) o 24 % oproti plnému účinku.

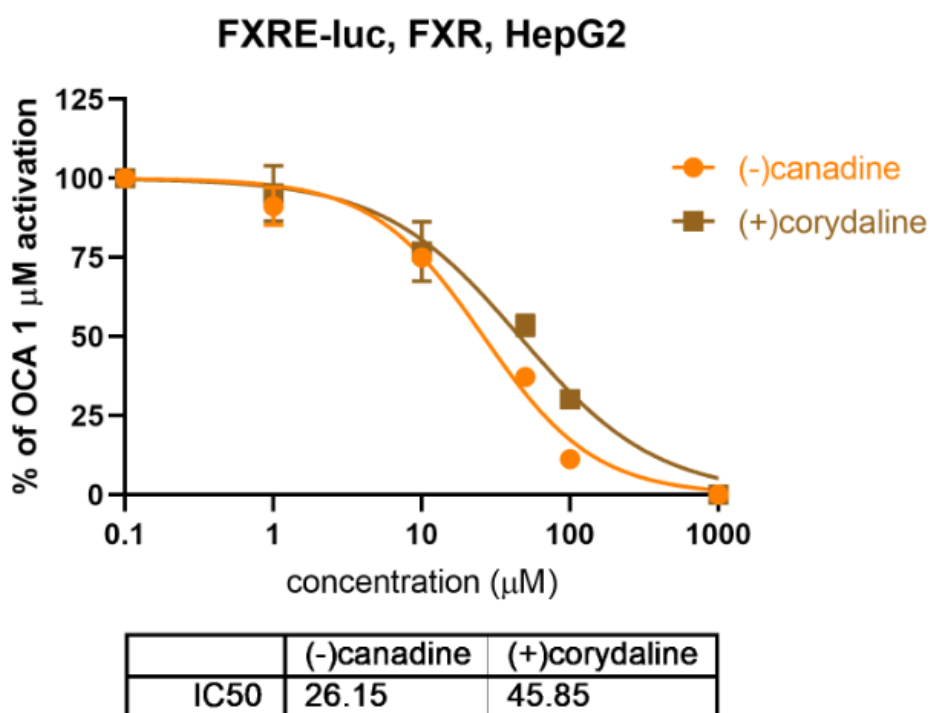
Najsilnejší antagonista však bol (-)-kanadin v 10  $\mu\text{M}$  koncentrácií, ktorý znížil účinok OCA až o 47 % oproti situácií, kedy by sa na FXR naviazala iba OCA.

#### **6.5. Polovičná inhibičná koncentrácia**

Pre zistenie  $\text{IC}_{50}$  sme najprv vykonali antagonistickú génovú reportérovú esej v stúpajúcich koncentračných radách skúmaných látok (viď. obr. 46). Pracovali sme aj s (+)-thaliktrikavínom, avšak nakoľko v predchádzajúcich experimentoch vykazoval cytotoxické účinky, z konečného hodnotenia sme ho vylúčili. U (-)-kanadínu a (+)-korydalínu sme nakreslili CRC a vyhodnotili  $\text{IC}_{50}$  (viď. obr. 47).



Obrázok 46 Stúpajúca FXR antagonistická aktivita (-)-kanadinu, (+)-korydalinu a (+)-taliktrikavinu v stúpajúcej koncentračnej rade týchto látok. Dáta boli získané pomocou FXR dependentnej luciferázovej reportérovej eseje na HepG2 bunkách po 24 h expozícií.



Obrázok 47 IC<sub>50</sub> (-)-kanadinu a (+)-korydalinu v luciferázovej FXR dependenej eseji na bunkách HepG2.

### 6.5.1. Vyhodnotenie

Na základe prevedenia génovej reportérovej eseje sme potvrdili zvyšujúcu schopnosť skúmaných látok znižovať aktivitu OCA v rastúcich koncentráciách týchto látok. Z toho vyplýva ich zvyšujúca sa antagonistická aktivita v rade so stúpajúcou koncentráciou (vid'. obr. 46).

Následne sme pomocou CRC a analytického softwaru GrapPad Prism sme vyhodnotili  $IC_{50}$ , čo predstavuje dávku, ktorá vyvoláva polovičný inhibičný účinok (vid'. obr. 47).

## 7. DISKÚZIA

Vo svojej diplomovej práci som testovala sadu dvadsiatich šiestich alkaloidov z hľadiska aktivity na dva typy receptorov, a to FXR a TGR5.

Najprv bola vykonaná génová reportérová esej na zhodnotenie kapacity skúmaných alkaloidov interagovať s FXR a TGR5 receptormi v bunkovej línii HepG2 a pôsobiť ako agonisti alebo antagonisti.

Žiaden zo skúmaných alkaloidov neprejavil výraznejšie schopnosti pôsobiť ako agonista týchto receptorov. (-)-skoulerin však vykazoval zjavnú aktivitu potenciovateľ účinky agonistu FXR v 10  $\mu\text{M}$  aj 40  $\mu\text{M}$  koncentrácií (vid'. obr. 20). U TGR5 mali podobné schopnosti lykorin a montanin v oboch koncentráciách, t.j. 10  $\mu\text{M}$  aj 40  $\mu\text{M}$ , a pankracin v 40  $\mu\text{M}$  (vid'. obr. 24 a 25).

Ako antagonisti FXR sa javila rada látok, a to masonin, homolykorin, 9-O-demetylhomolykorin, odulin, lykorenin, karanin, lykorin a galantin v 10  $\mu\text{M}$  aj 40  $\mu\text{M}$  koncentráciách (vid'. obr. 18). Avšak ako jedny z najsilnejších antagonistov FXR sa javili 40  $\mu\text{M}$  (-)-kanadin, (+)-korydalin a (+)-thaliktrikavin (vid'. obr. 20), ktoré sme následne široko využívali v ďalších experimentálnych metódach. Ako antagonisti sa u TGR5 javili masonin, homolykorin, 9-O-demetylhomolykorin, odulin, lykorenin, karanin, epimaritidin a galantin v 10  $\mu\text{M}$  aj 40  $\mu\text{M}$  a (-)-skoulerin, (+)-tetrahydropalmatin a (+)-taliktrikavin v 40  $\mu\text{M}$  (vid'. obr. 24 a 25), avšak rovnako ako u FXR, ako jedny najsilnejších antagonistov TGR5 v týchto testoch pôsobili (-)-kanadin, (+)-korydalin a (+)-thaliktrikavin (vid'. obr. 26).

Následne sme vykonali esej cytotoxicity na určenie toxických účinkov týchto látok na živé bunky v bunkovej línii HepG2. Testy sme vykonávali u všetkých látok po 24 h inkubácií s bunkami zároveň s mikroskopickou kontrolou.

Cytotoxickú aktivitu vykazovali lykorin, pankracin, montanin a hemantamin v 10  $\mu\text{M}$  aj 50  $\mu\text{M}$  koncentrácií, (-)-skoulerin a (+)-thaliktrikavin v skúmanej 40  $\mu\text{M}$  koncentrácií a hippeastrin bol toxický iba v 50  $\mu\text{M}$  (vid'. obr. 27-33). Viditeľne cytotoxické už po mikroskopickej analýze boli aj: (-)-korypalmin, (-)-stylopin, (+)-kanadin, (-)-skoulerin, (+)-tetrahydropalmatin (vid'. obr. 34 a 35).

Následne sme vylúčili cytotoxické látky z ďalších experimentov, a po ich vylúčení sme ďalej pracovali s hippeastrinom. Nakoľko sa jeho toxicita v 10  $\mu\text{M}$  koncentrácií nepotvrdila a zároveň sme zistili, že v 50  $\mu\text{M}$  už toxicky bol a v génovej reporterovej eseji vykazoval

potenciačné účiny na agonizmus LCA u TGR5, rozhodli sme sa priblížiť bližšie jeho vlastnosti. Zároveň sme v ďalších experimentoch pracovali aj s (-)-kanadinom, (+)-korydalinom a (+)-taliktrikavinom, keďže mali najsilnejšie antagonistické účinky, hlavne na FXR, ale zároveň aj na TGR5. (+)-taliktrikavin sme z konečných experimentov taktiež vylúčili z dôvodu, že v predošlom teste taktiež pôsobil cytotoxicky (viď. obr. 33).

V nasledujúcich experimentoch sme skúšali toxicitu hipeastrinu v rôznych koncentráciách po 5 h, 24 h a 48 h, aby sme zistili, jeho maximálnu netoxickú koncentráciu. Hipeastrin po 5 h pôsobení nebol cytotoxický v žiadnej, ani najvyššej, koncentrácií. Po 24 h pôsobení bol hipeastrin toxický v koncentrácií od 40  $\mu\text{M}$  vyššie. Jeho kombinácia s LCA po 24 h nebola toxická v žiadnej zo skúmaných koncentrácií. Po 48 h pôsobení v našich testoch bol hipeastrin toxický v koncentrácií 100  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$ , avšak kvôli možným odchýlkam a predošlým výsledkom po 24 h, môžeme predpokladať jeho toxicitu už od 40  $\mu\text{M}$  koncentracie vyššie. V kombinácií s LCA bol po 48 h pôsobení na bunky toxický od koncentracie 100  $\mu\text{M}$  a viac. V žiadnom z prevedených experimentov hipeastrin nepôsobil cytotoxicky v koncentrácií 10  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ , čo môžeme predbežne považovať za bezpečnú koncentráciu (viď. obr. 36-41).

V rámci doplnujúcej génovej reportérovej eseje sme skúšali schopnosť hipeastrinu potenciovat' účinky aj ďalších žľových kyselín, čo sme v tomto teste potvrdili, najvyššia schopnosť však bola preukázaná práve na LCA (viď. obr. 44).

Hipeastrin vykazuje schopnosť zvyšovať účinky LCA u TGR5, avšak až v koncentrácií nad 40  $\mu\text{M}$  a zároveň toxicita jeho samotného sa prejavila až v koncentrácií nad 40  $\mu\text{M}$  po 24 a 48 h, ale v kombinácií s LCA bol toxický až od 100  $\mu\text{M}$  koncentracie po 48 h. Je možné napríklad navrhnúť drobné obmeny v jeho chemickej štruktúre s cieľom zníženia jeho toxicity, navrhnúť deriváty s podobnou štruktúrou a zároveň vyšším účinkom už v nižších koncentráciách, zároveň je možné experiment zopakovať pre spresnenie jeho účinkov a cytotoxických účinkov alebo zvoliť podobnú alternatívu zvýšenia jeho účinnosti a zníženia toxicity.

My sme s touto látkou však pracovali ďalej aj v rámci ďalších experimentov, kde bola skúšaná jeho aktivita v stúpajúcej koncentračnej rade hipeastrinu v zmesi s jednotnou koncentráciou LCA a obrátene, v stúpajúcej koncentračnej rade LCA v zmesi s nemennou koncentráciou hipeastrinu. Tieto testy boli prevedené k bližšiemu objasneniu jeho aktivity. Zároveň sme prevádzali rovnaké génové receptorové testy s FXR a TGR5 s obmenenou štruktúrou na otestovanie schopnosti potenciačných účinkov hipeastrinu už v nižších



koncentráciách na prispôsobené typy receptorov. Tieto experimenty však z kapacitných dôvodov nie sú použité v rámci tejto práce a k zhodnoteniu výsledkov potrebujú podrobnejšiu analýzu a ďalší výskum.

Nakoľko sa (-)-kanadin, (+)-korydalin a (+)-taliktrikavin osvedčili v génovej reportérovej eseji ako výrazní antagonisti FXR a TGR5, skúmali sme ich aktivitu ďalej. (+)-taliktrikavin bol však cytotoxický, takže sme sa zamerali hlavne na aktivitu (-)-kanadinu a (+)-korydalinu. Tie sme najprv otestovali v teste cytotoxicity v širokej rade koncentrácií, a to 10, 25, 50, 75, 100 a 200  $\mu\text{M}$ . (-)-kanadin, rovnako ako aj (+)-korydalin boli cytotoxické v koncentrácií 75  $\mu\text{M}$  a viac, avšak štatistickú významnosť preukázali všetky látky okrem 100  $\mu\text{M}$  (-)-kanadinu, z čoho vyplýva, že jeho cytotoxicitu v tejto koncentrácií nevieme s presnosťou určiť (vid'. obr. 42). V nižších koncentráciách toxické účinky na bunky nevykazovali, preto bolo možné s týmito koncentráciami pracovať v rámci ďalších skúšok.

TR-FRET Lanta screen FXR koaktivátorovú eseju sme využili pre overenie možnej interakcie s FXR. Výhodou tejto metódy bolo prekonanie možných nejasností vyvolaných autofluorescenciou alebo rozptylom svetla týchto zlúčenín.

U všetkých zo skúmaných alkaloidov sa potvrdilo antagonistické pôsobenie na FXR, avšak (+)-korydalin vyžadoval vyššiu koncentráciu, nakoľko u 1  $\mu\text{M}$  sa antagonisticky účinok neosvedčil, avšak u 10  $\mu\text{M}$  dokázal znížiť účinok OCA o 24 % oproti plnému účinku. Najsilnejší antagonistista však bol (-)-kanadin v 10  $\mu\text{M}$  koncentrácií, ktorý znížil účinok OCA až o 47 % oproti situácií, kedy by sa na FXR naviazala iba OCA (vid'. obr. 45).

Nakoniec sme previedli doplňujúcu génovú reportérovú eseju v rastúcej koncentračnej rade (-)-kanadinu a (+)-korydalinu od 1  $\mu\text{M}$ , cez 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  po 100  $\mu\text{M}$ . Z tejto eseje vyplynula ich zvyšujúca sa antagonistická aktivita v rade so stúpajúcou koncentráciou (vid'. obr. 46).

Následne sme pomocou CRC vyhodnotili  $\text{IC}_{50}$ , čo môže predstavovať optimálnu dávku, ktorá vyvoláva požadovaný účinok a nie je toxická.  $\text{IC}_{50}$  u (-)-kanadinu bola 26,15  $\mu\text{M}$  a u (+)-korydalinu 45,85  $\mu\text{M}$  (vid'. obr. 47).

V rámci ďalších experimentov sme vykonali RT-PCR reakciu na potvrdenie účinkov (-)-kanadinu a (+)-korydalinu prostredníctvom určenia miery ovplyvnenia konkrétnych génov regulovaných týmito receptormi, ktorej výsledky boli pozitívne. To však nie je predmetom tejto práce z dôvodu jej značnej rozsiahlosti. Aj keď (-)-kanadin a (+)-korydalin vykazovali vo všetkých testoch potenciálne využiteľnú antagonistickú aktivitu na FXR a TGR5, tieto štúdie

vyžadujú ďalšie podrobnejšie experimenty, napríklad v prostredí skutočného živého organizmu či bunky, aby sa ukázali presnejšie účinky.

## 8. ZÁVER

V rámci skúšania aktivity dvadsiatich šiestich alkaloidov, izolovaných z *Corydalis cava* z čeľade *Fumariaceae* a *Narcissus pseudonarcissus* z čeľade *Amaryllidaceae*, na FXR a TGR5, sme vyvodili dve hlavné s antagonistickou aktivitou na FXR a TGR5, ktoré zároveň neboli cytotoxické. Boli to (-)-kanadin a (+)-korydalin, ktorých aktivitu na FXR sme v ďalších skriningových metódach potvrdili. 10  $\mu\text{M}$  (-)-kanadin bol schopný znižovať aktivitu OCA až o 47 % oproti kontrole, čím prejavil najsilnejšiu antagonistickú aktivitu a jeho  $\text{IC}_{50}$  bola 26,15  $\mu\text{M}$ . 10  $\mu\text{M}$  (+)-korydalin znížil aktivitu OCA o 24 % a hodnota jeho  $\text{IC}_{50}$  bola 45,85  $\mu\text{M}$ . Táto aktivita skúmaných alkaloidov doposiaľ nebola v odbornej literatúre popísaná. Navyše kombinácia inhibície oboch receptorov je unikátna, pretože nebola popísaná pre podobné štrukturálne alkaloidy. Zároveň tieto látky doposiaľ neboli skúmané ani ako ligandy ďalších nukleárných receptorov. Netoxický efekt kanadinu bol potvrdený aj v predchádzajúcich štúdiách, nielen v rámci bunecnej línie HepG2, ale aj HeLa (ľudské epitelové bunky z maligného karcinomu krčka maternice) a potkaních hepatocytoch. Podľa štúdií v rámci molekulárneho modelovania sa predpokladá, že kvartérny dusík, aromatická polycyklická a planárna štruktúra berberínu, čo je súčasťou štruktúry nami skúmaných alkaloidov, by mohla byť potenciálnym farmakoforickým základom na vyvolanie cytotoxického účinku, čo sme však v rámci nášho experimentu u (-)-kanadinu a (+)-korydalinu nepotvrdili. Súčasný výsledky predošlých výskumov potvrdili aj antioxidačnú aktivitu kanadinu (*Correché et al. 2007*).

Či by alkaloidy, ktoré preukázali aktivitu proti FXR alebo TGR5 receptoru mohli byť terapeuticky aktívne je otáznou. V odbornej literatúre je málo informácií o biologických alebo farmakologických účinkoch týchto látok.

Zaujímavé je, že niektoré zo skúmaných látok, konkrétne (+)-kanadin a (+)-taliktrikavin, inhibujú acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu a prestupujú cez hematoencefalickú bariéru, čo je potencionálnym predpokladom ich využitia v liečbe Alzheimerovej choroby (*Chlebek et al. 2019*).

Tieto štúdie však vyžadujú ďalšie podrobnejšie experimenty, napríklad v prostredí skutočného živého organizmu či bunky, nakoľko predstavujú potenciálne liečebne využiteľné schopnosti pri metabolických dejoch ovplyvňovaných FXR a TGR5 alebo potenciál v liečbe Alzheimerovej choroby.

Podrobnejšie štúdie vyžaduje aj hipeastrin, ktorý naznačil aktivitu potenciácie účinkov agonistu LCA u TGR5, avšak v koncentrácií nad 40  $\mu\text{M}$  preukázal po 24 hodinách cytotoxickú

aktivitu na bunky HepG2, avšak nakoľko aplikovaný v roztoku s LCA preukázal toxickú aktivitu až v koncentrácií nad 100  $\mu\text{M}$ , jeho aktivita taktiež vyžaduje ďalšie, podrobnejšie štúdie, ktoré sú nad kapacitný rozsah tejto práce.

## 9. LITERATÚRA

- Al Shammari, L. et al. (2021). Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* CV. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer' s disease. *South African Journal of Botany*, 136, 137-146.
- Allard, STM. & Kopish, K. (2008). Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research [online]. Na stránke: Promega Corporation, 2008. Citované: 29.3.2022. Dostupné na: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/cellnotes/luciferase-reporter-assays-powerful-adaptable-tools-for-cell-biology-research/>
- Baffy, G. (2019). Potential mechanisms linking gut microbiota and portal hypertension. *Liver International*, 39(4), 598-609.
- Bertolini, A., Fiorotto, R., & Strazzabosco, M. (2022, April). Bile acids and their receptors: modulators and therapeutic targets in liver inflammation. In *Seminars in immunopathology* (pp. 1-18). Springer Berlin Heidelberg.
- Breiterova, K. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii civilizačních onemocnění. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2019: 134s.
- Brunt, E. M., Neuschwander-Tetri, B. A., & Burt, A. D. (2011). Fatty liver disease: alcoholic and nonalcoholic. *MacSween's Pathology of the Liver, 6th ed.; Burt, AD, Portmann, B., Ferrell, L., Eds*, 293-359.
- Cahlíková, L. et al. (2015). Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*, 103, 192-196.
- Carino, A. et al. (2019). Agonism for the bile acid receptor GPBAR1 reverses liver and vascular damage in a mouse model of steatohepatitis. *The FASEB Journal*, 33(2), 2809-2822.
- Correché, E. R., Andujar, S. A., Kurdelas, R. R., Lechón, M. J. G., Freile, M. L., & Enriz, R. D. (2008). Antioxidant and cytotoxic activities of canadine: Biological effects and structural aspects. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(7), 3641-3651.
- Dalecka, M., Havelek, R., Kralovec, K., Bruckova, L., & Cahlikova, L. (2013). Amaryllidaceae family alkaloids as potential drugs for cancer treatment. *Chem. Listy*, 107(9), 701-708.
- Deng, A. P. et al. (2021). Systematic review of the alkaloid constituents in several important medicinal plants of the Genus *Corydalis*. *Phytochemistry*, 183, 112644.

- Donkers, J. M., Abbing, R. L. R., & Van de Graaf, S. F. (2019). Developments in bile salt based therapies: a critical overview. *Biochemical Pharmacology*, *161*, 1-13.
- Downes, M. et al. (2003). A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Molecular cell*, *11*(4), 1079-1092.
- Fraser, M. D., Vallin, H. E., Davies, J. R. T., Rowlands, G. E., & Chang, X. (2021). Integrating Narcissus-derived galanthamine production into traditional upland farming systems. *Scientific Reports*, *11*(1), 1-9.
- Ghosal, S. & Razdan, S. (1985). (+)-Epimaritidine, an alkaloid from *Zephyranthes rosea*. *Phytochemistry*, *24*(3), 635-637.
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(2), 669-672.
- Han, L. Y. et al. (2014). Aberrant DNA methylation of G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) is a potential biomarker for hepatitis B Virus associated hepatocellular carcinoma. *International Journal of Medical Sciences*, *11*(2), 164.
- Hartwell, J. L. (1967). Plant remedies for cancer. *Cancer Che mother. Rep.* 7: 19-24 and Plants used against cancer: a survey. *Lloydia*, *30*, 379-436.
- Hejny S. & Slavík B. (1988). *Květena ČSR. 1. díl.* Academia, Praha 1988, ISBN 80-200- 0643-5
- Hulcová, D. et al. (2019). Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, *165*, 112055.
- Chen, Q., Ma, H., Guo, X., Liu, J., Gui, T., & Gai, Z. (2019). Farnesoid X receptor (FXR) aggravates amyloid- $\beta$ -triggered apoptosis by modulating the cAMP-response element-binding protein (CREB)/brain-derived neurotrophic factor (BDNF) pathway in vitro. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *25*, 9335.
- Chlebek, J. et al. (2016). Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets. *Fitoterapia*, *109*, 241-247.

- Chlebek, J. et al. (2019). In Vitro and In Silico acetylcholinesterase inhibitory activity of thalictricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *Molecules*, 24(7), 1340.
- Chlebek, J. Isochinolinové alkaloidy jako potenciální léčiva. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2021: 95s.
- Chlebek, J., Macáková, K., Cahlíková, L., Kurfürst, M., Kuneš, J., & Opletal, L. (2011). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Natural product communications*, 6(5), 1934578X1100600507.
- Iranshahy, M., Quinn, R. J., & Iranshahi, M. (2014). Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. *Rsc Advances*, 4(31), 15900-15913.
- Ito, K. et al. (2021). Dual Agonist of Farnesoid X Receptor and Takeda G Protein-Coupled Receptor 5 Inhibits Hepatitis B Virus Infection In Vitro and In Vivo. *Hepatology*, 74(1), 83-98.
- Jahodář, L. (2011). Farmakobotanika. *Nakladatelství Karolinum*, Praha 2011, ISBN 978-80-246-2015-2, 278 str.
- Kameníčková, A. (2012). Gene reporter assay [online]. Na stránce: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2012. Citované: 29.3.2022. Dostupné na: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=219&t=0>
- Kemper, J. K. (2011). Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 842-850.
- Khan, S. A., & Heuvel, J. P. V. (2003). Reviews: current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(10), 554-567.
- Kiryama, Y., & Nochi, H. (2019). The biosynthesis, signaling, and neurological functions of bile acids. *Biomolecules*, 9(6), 232. Yoshimitsu, K., Hiromi, N., et al.: *Biomolecules*, 9, 2019, 232.
- Kocian, P. (2003). Dymnivka dutá. Na stránce: Květena ČR. Citované 31.3.2022. Dostupné na: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=42>.

- Kocna, P. Na stránke: Biolib.cz. Dostupné na: [Obrázek - Corydalis cava \(dymnivka dutá\) | BioLib.cz](#). Prevzaté dňa 29.3.2022.
- Králová, M. (2017). Demencie. 89 str., ISBN 978-80-223-4307-7.
- Kreh, M., & Matusch, R. (1995). O-Methyloduline and N-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry*, 38(6), 1533-1535.
- Kubista, M. et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Lee, F. Y., Lee, H., Hubbert, M. L., Edwards, P. A., & Zhang, Y. (2006). FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends in biochemical sciences*, 31(10), 572-580.
- Ma, K., Tang, D., Yu, C., & Zhao, L. (2021). Progress in research on the roles of TGR5 receptor in liver diseases. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 56(6), 717-726.
- Murillo, PG, Martín, IA a García, AS (2021). Novedades a sekta narcisov. Pseudonarcissi dc. (Amaryllidaceae) v Španielsku: *N. ramirezii* sp. nov. *Flora Montiberica* , (79), 116-119.
- Qian, M. et al. (2022). Discovery of novel cholic acid derivatives as highly potent agonists for G protein-coupled bile acid receptor. *Bioorganic Chemistry*, 120, 105588.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G.. (2007). Rang & Dale's Pharmacology. Edinburgh: *Churchill Livingstone* 2007, 844 str., ISBN-10: 0443069115, ISBN-13: 978-0443069116.
- Sepe, V., Distrutti, E., Fiorucci, S., & Zampella, A. (2018). Farnesoid X receptor modulators 2014-present: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(5), 351-364.
- Shang, X. F. et al. (2020). Biologically active isoquinoline alkaloids covering 2014–2018. *Medicinal research reviews*, 40(6), 2212-2289.
- Shin, D. J., & Wang, L. (2019). Bile acid-activated receptors: a review on FXR and other nuclear receptors. *Bile Acids and Their Receptors*, 51-72.
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta histochemica*, 120(3), 159-167.
- Tuteja, N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant signaling & behavior*, 4(10), 942-947.



- Wiersema, J. H., & Taxonomy, G. R. I. N. (2019). US National Plant Germplasm System. *Washington, DC, USA*. In: [International Plant Names Index](#). Dostupné na: <https://www.gbif.org/species/105331121> a <https://www.gbif.org/species/2858244>.
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, *64*(1), 73-84.
- Zhang, Y. et al. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(4), 1006-1011.