

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MATKO

**MAGISTRSKA NALOGA**  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MATKO

**VREDNOTENJE IZBRANIH ANTAGONISTOV PXR NA  
ANDROGENIH, GLUKOKORTIKOIDNIH IN TIROIDNIH  
RECEPTORJIH**

**EVALUATION OF SELECTED ANTAGONISTS PXR ON  
ANDROGENE, GLUCOCORTICOID AND TYROID RECEPTORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvom prof. dr. Lucije Peterlin Mašič.

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm. za pomoč in usmerjanje pri pisanju magistrske naloge in pregled le-te. Iskreno se zahvaljujem tudi Darji Gramec Skledar, mag. farm., za pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela magistrske naloge in koristne nasvete.*

*Zahvalila bi se rada še članoma komisije prof. dr. Darku Černetu in doc. dr. Iliji German Iliču za pregled magistrske naloge.*

*Nazadnje se iz srca zahvaljujem tudi svoji družini, ki me je spodbujala in podpirala v celotnem času študija.*

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo opravila samostojno, pod mentorstvom prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

Ljubljana, 2018

Ana Matko

## KAZALO

KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO PREGLEDNIC.....	vi
KAZALO ENAČB.....	vii
POVZETEK.....	viii
ABSTRACT.....	x
SEZNAM OKRAJŠAV.....	xii
1. UVOD.....	1
1.1. ENDOKRINI SISTEM.....	1
1.1.1. GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM.....	3
1.1.2. ANDROGENI SISTEM.....	5
1.1.3. TIROIDNI SISTEM.....	8
1.1.4. PREGNANSKI X RECEPTOR.....	10
1.1.4.1. VLOGA PXR PRI RAKAVIH OBOLENJIH.....	11
2. NAMEN DELA.....	13
3. MATERIALI IN METODE.....	14
3.1. MATERIALI.....	14
3.1.1. TESTIRANE SPOJINE.....	14
3.1.1.1. PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN.....	16
3.1.2. CELIČNA LINIJA MDA-kb2 IN UPORABLJENI REAGENTI.....	18
3.1.3. CELIČNA LINIJA GH3.TRE-Luc IN UPORABLJENI REAGENTI.....	19
3.1.4. LABORATORIJSKA OPREMA.....	21
3.2. METODE.....	22
3.2.1. OSNOVNE METODE DELA S CELICAMI.....	22
3.2.1.1. OSNOVE DELA V CELIČNEM LABORATORIJU.....	22
3.2.1.2. ODMRZOVANJE IN ZAMRZNITEV CELIC.....	22
3.2.1.3. GOJENJE CELIC.....	23

3.2.1.4.	NASAJANJE IN PRESAJANJE CELIC .....	23
3.2.1.5.	ŠTETJE CELIC.....	25
3.2.2.	TEST CITOTOKSIČNOSTI.....	26
3.2.2.1.	MTS TEST .....	26
3.2.2.2.	TEST CITOTOKSIČNOSTI Z RESAZURINOM .....	28
3.2.3.	LUCIFERAZNI TEST .....	30
3.2.3.1.	LUCIFERAZNI TEST NA CELIČNI LINIJI MDA-KB2 .....	30
3.2.3.2.	LUCIFERAZNI TEST NA CELIČNI LINIJI GH3.TRE-Luc.....	32
3.2.4.	ANALIZA PODATKOV .....	33
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	35
4.1.	TEST CITOTOKSIČNOSTI .....	35
4.1.1.	REZULTATI MTS TESTA.....	35
4.1.2.	REZULTAT TESTA CITOTOKSIČNOSTI Z RESAZURINOM .....	40
4.2.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA AR .....	43
4.3.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA GR .....	51
4.4.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA TR.....	59
5.	SKLEP.....	66
6.	LITERATURA.....	68

## KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturni formuli (A) testosterona in (B) dihidrotestosterona.....	6
Slika 2: Strukturni formuli tiroidnih hormonov (A) T3 in (B) T4. ....	8
Slika 3: Prikazan je izgled hemocitometra, pokritega s krovnim steklom, ter komora, v katero vnesemo vzorec. ....	25
Slika 4: Slika, ki jo vidimo pod svetlobnim mikroskopom pri štetju celic v komori hemocitometra. ....	26
Slika 5: Redukcija MTS do formazana v metabolno aktivnih celicah (30).....	28
Slika 6: Redukcija resazurina do resofurina v živih metabolno aktivnih celicah (31).....	30
Slika 7: Reakcija oksidacije luciferina do bioiluminiscentnega oksiluciferina, ki se dogaja tudi v žuželkah npr. kresnički (32) .....	31
Slika 8: Rezultati MTS testa za agonizem na AR .....	36
Slika 9: Rezultati MTS testa za antagonizem na AR.....	37
Slika 10: Rezultati MTS testa za agonizem na GR .....	38
Slika 11: Rezultati MTS testa za antagonizem na GR.....	39
Slika 12: Rezultati testa živosti celic z resazurinom za agonistično delovanje na TR.....	41
Slika 13: Rezultati testa živosti celic z resazurinom za antagonistično delovanje na TR... ..	42
Slika 14: Rezultati luciferaznega testa za agonistično delovanje spojin na AR.....	44
Slika 15: Grafi prikazujejo agonistično učinkovanje spojin (A) DHT, (B) KZH-137, (C) KZH-165 (D) KZH-196 na AR .....	45
Slika 16: Rezultati luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin na AR.....	46
Slika 17: Grafi prikazujejo antagonistično učinkovanje spojin (A) FLUT, (B) KZH-165, (C) KZH-190, (D) KZH-196 na AR.....	47
Slika 18: Rezultati ponovljenega luciferaznega testa za agonistično delovanje spojine KZH-196 na AR. ....	48
Slika 19: Graf prikazuje ponovno testiranje za agonistično učinkovanje spojine KZH-196 na AR.....	48
Slika 20: Rezultati ponovljenega luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin KZH-137 in KZH-196 na AR.....	49
Slika 21: Graf prikazuje ponovno testiranje za antagonistično učinkovanje spojine (A) KZH-137 in (B) KZH-196 na AR .....	49
Slika 22: Rezultati luciferaznega testa za agonistično delovanje spojin na GR.....	51

Slika 23: Grafi prikazujejo agonistično učinkovanje spojin (A) HC, (B) KZH-137, (C) KZH-196 na GR .....	52
Slika 24: Rezultati luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin na GR. ....	53
Slika 25: Grafi prikazujejo antagonistično učinkovanje spojin (A) RU-486, (B) KZH-137, (C) KZH-165, (D) KZH-190 in (E) KZH-196 na GR .....	55
Slika 26: Rezultati ponovnega luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin na GR.....	57
Slika 27: Grafi prikazujejo antagonistično učinkovanje spojin (A) KZH-137, (B) KZH-165, (C) KZH-190 in (D) KZH-196 na GR.....	58
Slika 28: Rezultati luciferaznega testa za agonistično delovanje spojin na TR .....	60
Slika 29: Grafi prikazujejo agonistično učinkovanje spojin (A) T3, (B) KZH-137, (C) KZH-165, (D) KZH-190 in (E) KZH-196 na TR.....	62
Slika 30: Rezultati luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin na TR. ....	62
Slika 31: Grafi prikazujejo antagonistično učinkovanje spojin (A) KZH-137, (B) KZH-165 in (C) KZH-196, (D) KZH-190 in (E) BPA na TR. ....	64

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Ime, struktura, molekulska masa in masa spojin KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 .....	3
Preglednica II: Ime, struktura, molekulska masa in aktivnost na PXR spojin KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 .....	14
Preglednica III: Ime, struktura in molekulska masa uporabljenih kontrolnih spojin na celični liniji MDA-kb2 .....	15
Preglednica IV: Ime, struktura in molekulska masa uporabljenih kontrolnih spojin na celični liniji GH3.TRE-Luc .....	16
Preglednica V: Koncentracije spojin, ki smo jih uporabili za testiranje citotoksičnosti spojin. ....	17
Preglednica VI: Koncentracije spojin, ki smo jih uporabili za testiranje agonističnega in antagonističnega delovanja na AR, GR in TR.....	17
Preglednica VII: Koncentracije pozitivnih kontrolnih spojin, ki smo jih uporabili za testiranje agonističnega in antagonističnega delovanja na AR, GR in TR.....	18
Preglednica VIII: Reagenti, ki smo jih uporabili pri delu s celično linijo MDA-kb2. ....	18
Preglednica IX: Reagenti, ki smo jih uporabili pri delu s celično linijo GH3.TRE-Luc.....	19
Preglednica X: Najvišje necitotoksične koncentracije na celični liniji MDA-kb2.....	40
Preglednica XI: Določene vrednosti najvišje necitotoksične koncentracije na celični liniji GH3.TRE-Luc .....	43
Preglednica XII: Vrednosti EC <sub>50</sub> in IC <sub>50</sub> testnih spojin na GR. ....	56
Preglednica XIII: Vrednosti EC <sub>50</sub> in IC <sub>50</sub> testiranih spojin na TR. ....	64

## KAZALO ENAČB

Enačba A: Enačba za izračun koncentracije celične suspenzije.....	26
---	----

## POVZETEK

Pregnanski X receptor je jedrni receptor, pomemben za metabolizem in izločanje ksenobiotikov, vpleten pa je tudi v številne druge procese človeškega organizma, med drugim tudi v patogenezo rakavih obolenj. Aktivacija pregnanskega X receptorja pri zdravljenju rakavih obolenj lahko poveča odpornost rakavega tkiva na zdravilne učinkovine. Z uporabo selektivnih antagonistov pregnanskega X receptorja v sočasni terapiji z kemoterapevtiki bi lahko izboljšali izide zdravljenja določenih rakavih obolenj. V magistrski nalogi smo štirim izbranim antagonistom pregnanskega X receptorja (KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196) ovrednotili selektivnost delovanja s tem, da smo testirali njihovo aktivnost na ostalih jedrnih receptorjih, kot so androgeni, glukokortikoidni in tiroidni receptorji. Za vrednotenje delovanja na androgenih in glukokortikoidnih receptorjih smo uporabili stabilno celično linijo MDA-kb2, za vrednotenje delovanja na tiroidnih receptorjih pa stabilno celično linijo GH3.TRE-Luc.

Najprej smo izbranim spojinam določili najvišjo necitotoksično koncentracijo, selektivno za agonistično in antagonistično delovanje na vsakemu izmed preiskovanih receptorjev. Za določanje citotoksičnosti na celični liniji MDA-kb2 smo uporabili MTS test, medtem ko smo pri določanju citotoksičnosti na celični liniji GH3.TRE-Luc uporabili test živosti celic z resazurinom. S tem smo določili koncentracije antagonistov pregnanskega X receptorja, primerne za testiranje na posamezni celični liniji. Nato smo z luciferaznim testom ovrednotili delovanje na androgenih, glukokortikoidnih in tiroidnih receptorjih ter določili  $EC_{50}$  oziroma  $IC_{50}$  vrednosti za vsako izbrano spojino. Rezultati so pokazali antagonističen učinek na androgene receptorje pri spojinu KZH-137 z  $IC_{50}$  vrednostjo  $13,63 \mu\text{M}$ , a bi zaradi odsotnosti statistično značilnih rezultatov glede na kontrolo  $0,1 \%$  DMSO v gojitvenem mediju morali test ponoviti. Antagonistično aktivnost na glukokortikoidnih receptorjih smo določili pri vseh 4 antagonistih pregnanskega X receptorja z vrednostmi  $IC_{50}$  od  $12,76 \mu\text{M}$  za spojino KZH-137 do  $35,02 \mu\text{M}$  za spojino KZH-190. Pri testiranju aktivnosti na tiroidne receptorje pa smo odkrili agonistično aktivnost spojine KZH-165 pri koncentraciji  $1 \mu\text{M}$  in  $0,1 \mu\text{M}$ , medtem ko smo antagonističen učinek opazili pri spojinah KZH-165 in KZH-190 z vrednostjo  $IC_{50}$  v območju  $1-2 \mu\text{M}$ .

Na podlagi izvedenih testov smo ugotovili, da spojine KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 ne delujejo selektivno na pregnanski X receptor, a za potrditev rezultatov bi potrebovali vsaj tri neodvisne biološke ponovitve testiranja.

Ključne besede: antagonisti PXR, androgeni receptor, glukokortikoidni receptor, celična linija MDA-kb2, tiroidni receptor, celična linija GH3.TRE-Luc

## ABSTRACT

Pregnane X receptor is a nuclear receptor, important for his role in metabolism and elimination of xenobiotics and other human body processes, including the cancer pathogenesis. In cancer chemotherapy activation of pregnane X receptor can increase cancer resistance to chemotherapeutics. With co-use of antagonists of pregnane X receptor and chemotherapeutics we could improve the treatment outcomes for specific cancers. Because antagonists of pregane X receptor are new compounds we must not only determine their pharmacological actions, but also their safety – including actions on endocrine system. In our research we evaluated actions of four selected antagonists of pregnane X receptor (KZH-137, KZH-165, KZH-190 and KZH-196) on other nuclear receptors, specifically androgene, glucocorticoid and tyroid receptors. To evaluate effects on androgene and glukocorticoid receptor we used a stable cell line MDA-kb2, and to evaluate effects on tyroid receptor we used a stable cell line GH3.TRE-Luc.

First we determined the maximum noncitotoxic concentrations of chosen compounds, selectively for agonistic and antagonistic effects on each of the investigated receptors. To determine citotoxic effect on cell line MDA-kb2 we used MTS assay, while we determined citotoxic effect on cell line GH3.TRE-Luc with a viability resazurin assay. Results of MTS assay and cell viability resazurin assay determined the concentrations, suitable for use in further assays on each of the cell lines. Next we evaluated effects on androgene, glukocorticoid and tyroid receptors with luciferase assay and detemined EC<sub>50</sub> or IC<sub>50</sub> values for tested compounds. Our results showed antagonistic effect on androgene receptors of compound KZH- 137 with IC<sub>50</sub> value 13,63 µM, but because of lack of statistically significant results against the control sample 0,1 % DMSO in growth medium we would like to replicate the test again. Antagonistic effects on glukokorticoid receptors were discovered for all 4 antagonists of pregnane X receptor, with IC<sub>50</sub> values ranging from 12,76 µM for compound KZH-137 to 35,02 µM for compound KZH-190. With testing on tyroid receptors we discovered agonistic activity of compound KZH-165 for concentrations 1 µM and 0,1 µM, while we discovered antagonistic effect for compounds KZH-165 and KZH-190 with IC<sub>50</sub> values in the range of 1-2 µM.

From our research we concluded that tested compounds KZH-137, KZH-165, KZH-190 and KZH-196 are not selective antagonists of pregnane X receptor, but we would need at least three biological replicates to prove the validity of the results.

Key words: antagonists PXR, androgene receptor, glucocorticoid receptor, cell line MDA-kb2, tyroid receptor, cell line GH3.TRE-Luc

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACTH: adrenokortikotropni hormon

AMP: adenzil monofosfat

AR: androgeni receptor

ATP: adenzin trifosfat

BMT: bazalni metabolizem telesa

BPA: bisfenol A

CRH: kortikotropin-sproščujoči hormon

DHT: dihidrotestosteron

DMSO: dimetil sulfoksid

DNK: deoksiribonukleinska kislina

DTI: inhibitor tripsina

EC<sub>50</sub>: koncentracija, pri kateri spojina doseže 50% maksimalnega učinka

FBS: fetalni goveji serum

FLUT: flutamid

FSH: folikle stimulirajoči hormon

GR: glukokortikoidni receptor

GnRH: gonadoliberin

HC: hidrokortizon

IC<sub>50</sub>: koncentracija, pri kateri spojina zavre 50 % maksimalnega učinka dodanega agonista

LAF: laminarni pretok zraka

LH: luteinizirajoči hormon

MMTV: virus tumorja mišje mlečne žleze

mRNK: informacijska ribonukleinska kislina

NADH: nikotinamidadeninukleotid

NADPH: nikotinamidadeninukleotidfosfat

PBS: fosfatni pufer

PPi: pirofosfatni anion

PXR: Pregnanski X receptor

RU-486: mifepriston

RXR: retinojski X receptor

T3: trijodotironin

T4: tiroksin

TR: tiroidni receptor

TRH: tirotropin-sproščujoči hormon

TSH: tirotropin

## 1. UVOD

Rak ostaja bolezen z visoko smrtnostjo, zato je pomembno načrtovati in odkrivati nove zdravilne učinkovine za terapevtsko uporabo. Na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo so sintetizirali spojine KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196, ki so antagonisti pregnanskega X receptorja (PXR). PXR je v nekaterih rakavih tkivih (npr. raku dojke, raku prostate, osteosarkomu...) povečano izražen in je odgovoren za nastanek rezistence nekaterih tumorjev na konvencionalne učinkovine. Antagonisti PXR bi tako bili uporabni pri zdravljenju tumorjev, ki so rezistentni na konvencionalne kemoterapevtike (1). A pot od odkritja potencialne zdravilne učinkovine do registracije novega zdravila je dolga. Že zgodaj na tej poti je potrebno ovrednotiti varnost novih potencialnih učinkovin. PXR spada v skupino jedrnih receptorjev in zaradi podobnosti vezavnega žepa z ostalimi jedrnimi receptorji obstaja možnost sočasne modulacije drugih jedrnih receptorjev. Selektivnost omenjenih antagonistov PXR smo ovrednotili s testiranjem omenjenih učinkovin na nekaj ostalih izbranih jedrnih receptorjih. Ovrednotili smo delovanje izbranih antagonistov PXR na glukokortikoidnih receptorjih (GR), androgenih receptorjih (AR) in tiroidnih receptorjih (TR). Za to smo uporabili *in vitro* model na celični liniji MDA-kb2, s katero smo ovrednotili delovanje na GR in AR, in GH3.TRE-Luc, s katero smo ovrednotili delovanje na TR.

### 1.1. ENDOKRINI SISTEM

Hormonski oz. endokrini sistem je sistem v telesu, ki skupaj z živčnim sistemom zagotavlja homeostazo organizma z odzivanjem na zunanje spremembe okolja in uravnavanjem notranjega okolja organizma. Signalne molekule v endokrinem sistemu so hormoni, ki sodelujejo pri rasti, presnovi, razvoju in reprodukciji človeškega organizma. Hormone izločajo posamezne sekretorne celice in specializirane endokrine žleze, kot so hipofiza, hipotalamus, ščitnica, obščitnične žleze, timus, nadledvične žleze, trebušna slinavka, ovariji, testisi in placenta v nosečnosti (2).

Hormoni lahko glede na lokacijo učinkovanja delujejo endokrino, parakrino ali avtokrino. Endokrino delujejo hormoni, ki nastajajo v endokrinih žlezah, se sproščajo v kri ter prenesejo po krvi do oddaljenih tarčnih tkiv. Po krvi lahko potujejo vezani na transportne proteine ali prosti. Parakrino hormoni delujejo na kratke razdalje, prenesejo se po živčnih vlaknih in

medceličnini do sosednje celice. Hormoni, ki delujejo na isto celico, kjer so bili sintetizirani, pa delujejo avtokrino (3).

Glede na kemijsko zgradbo ločimo hormone, ki imajo aminokislinsko strukturo, npr. adrenalin, peptidno strukturo (rasni hormon, adrenokortikotropni hormon, inzulin, itd.) in steroidne hormone. Steroidni hormoni se za razliko od ostalih ne skladiščijo v organizmu in jih mora telo sintetizirati iz holesterola. Po mehanizmu učinkovanja ločimo hormone na vodotopne in hidrofobne. Vodotopni hormoni delujejo na receptor na membrani celice in povzročijo tvorbo sekundarnega celičnega prenašalca na notranji strani membrane, ki prenese sporočilo naprej po celici. Vodotopni hormoni se lahko vežejo tudi na membranske receptorje s kinazno aktivnostjo, ali tiste, ki povzročijo odprtje celičnega kanalčka ob vezavi hormona na membranski receptor. Učinek je dosežen v sekundah ali minutah in hitro izzveni. Za razliko od vodotopnih pa imajo hidrofobni hormoni dolgotrajnejši učinek, a počasnejši začetek delovanja (ure ali dnevi). Hidrofobni steroidni hormoni in hormoni ščitnice lahko zaradi svoje lipofilnosti difundirajo skozi celično membrano. Tiroidni hormoni se vežejo na receptor v jedru celice, medtem ko se steroidni hormoni v citoplazmi vežejo na receptorje in prenesejo v celično jedro. Tam receptor tvori heterodimer ali homodimer s še enim receptorjem, se z ustreznim zaporedjem veže na DNA na hormonsko odzivno zaporedje, ter tako omogoči transkripcijo oz. prevajanje genov in s tem sintezo novih proteinov (3).

Izločanje hormonov je regulirano z negativno povratno zanko, razen v redkih primerih, kjer je njihovo izločanje regulirano s pozitivno povratno zanko. Glavni cilj je vzdrževanje konstantne ravni prostih hormonov v krvi. Hormoni se vežejo na specifične receptorje v telesu in izzovejo biološki odgovor že v zelo nizkih koncentracijah (za delovanje so običajne koncentracije 1 pg/mL do nekaj µg/mL). Po krvi se nazaj do endokrine žleze prenesejo spojine, ki so posledica biološkega odgovora in delujejo zaviralno na nadaljnje izločanje hormona iz endokrine žleze. Tako je sklenjena fiziološka negativna povratna zanka, ki jo uravnava nastali biološki odgovor. Endokrina negativna povratna zanka je značilna za hipotalamus-hipofizno os, kjer hormon, izločen iz periferne endokrine žleze, deluje zaviralno na hipotalamus in hipofizo, ki uravnava njegovo izločanje iz periferne endokrine žleze. Takšen primer je npr. izločanje tiroidnih hormonov iz ščitnice, ki delujejo zaviralno na sproščanje hormonov hipotalamusa in hipofize. Eden redkih hormonov, ki je reguliran s pozitivno povratno zanko, je oksitocin, ki je pomemben pri porodu. Oksitocin povzroči mehčanje stene materničnega vratu in krčenje maternice, le-to pa preko živčnih impulzov do

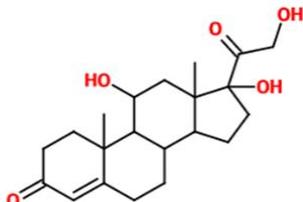
možganov privede do okrepitve izločanja oksitocina iz hipofize in še izrazitejše učinke, kar predstavlja pozitivno povratno zanko (4).

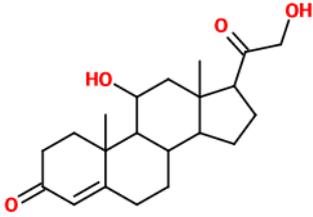
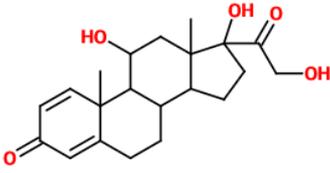
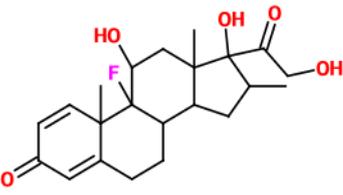
### 1.1.1. GLUKOKORTIKOIDNI SISTEM

GR spadajo v skupino jedrnih receptorjev in so zadolženi za različne naloge v telesu: od uravnavanja vnetnih odzivov organizma do metabolizma ogljikovih hidratov, maščob in proteinov. Nahajajo se po celem telesu, v celicah se GR nahaja v citoplazmi celice in je ob odsotnosti hormonov vezan v proteinski kompleks, ki ohranja njegovo konformacijo. Ob vezavi ligandov, ki jih imenujemo glukokortikoidni hormoni, se konformacija GR spremeni, odcepi se od proteinskega kompleksa in oddifundira v celično jedro. V celičnem jedru nastane dimer dveh GR, ki se veže na deoksiribonukleinsko kislino (DNK) na ustrezno glukokortikoidno odzivno mesto. Tako glukokortikoidni hormoni z vezavo na GR povzročijo povečano ali zmanjšano prepisovanje genov, preko uravnavanja sinteze informacijske ribonukleinske kisline (mRNK), ki nosi zapis za posamezne proteine. Poleg opisanega genomskega delovanja glukokortikoidnih hormonov poznamo tudi negenomsko delovanje. Negenomske glukokortikoidni hormoni delujejo na glukokortikoidni receptor v citoplazmi in ob aktivaciji receptorja učinkujejo že v sekundi do minuti, saj za svoje učinke ne potrebujejo sinteze novih proteinov (5).

V spodnji preglednici I bomo predstavili nekaj pomembnejših naravnih in sinteznih glukokortikoidnih hormonov.

Preglednica I: Ime, struktura, molekulska masa in masa spojin KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196

IME	STRUKTURA	AKTIVNOST
<b>Kortizol</b>		Endogena učinkovina, prispeva k 95 % glukokortikoidne aktivnosti v telesu

<b>Kortikosteron</b>		Endogena učinkovina, prispeva k 4 % glukokortikoidne aktivnosti v telesu, kortikosteron je manj potenten kot kortizol
<b>Prednizolon</b>		Eksogena učinkovina, sintezni glukokortikoid, ki ima 4-krat večjo jakost delovanja na GR kot kortizol
<b>Deksametazon</b>		Eksogena učinkovina, sintezni glukokortikoid, ki ima 30-krat večjo jakost delovanja na GR kot kortizol, ter je skoraj brez mineralokortikoidne aktivnosti

V organizmu glukokortikoidni hormoni nastajajo skupaj z mineralokortikoidni hormoni iz holesterola v skorji nadledvične žleze. Najpomembnejši predstavnik glukokortikoidnih hormonov je kortizol, ki ima ohranjene tudi nekaj mineralokortikoidne aktivnosti. V krvi je kortizol v 90 do 95 % vezan na plazemske proteine, predvsem na kortizol-vezajoče globuline v manjši meri pa tudi na albumine. S tem je zagotovljen daljši razpolovni čas kortizola in enakomerna porazdelitev v tkivih (3).

V organizmu kortizol vpliva na številne pomembne procese, kot so metabolizem, vnetje in stres. Kortizol povzroči dvig krvnega sladkorja s stimulacijo glukoneogeneze in zmanjšanjem porabe glukoze v številnih tkivih. Pod vplivom glukokortikoidnih hormonov se poveča mobilizacija aminokislin iz mišic in pospeši nastajanje glukoze iz aminokislin v jetrnih celicah. Obenem glukokortikoidni hormoni zmanjšajo občutljivost tkiv, posebno skeletnih mišic in maščobnega tkiva, na učinke inzulina za privzem in porabo glukoze v tkivih (6). Kortizol prav tako vpliva na metabolizem proteinov in maščob. Celične zaloge proteinov se v vseh celicah organizma zmanjšajo, saj se pod vplivom kortizola zmanjša sinteza proteinov in poveča katabolizem proteinov v celicah. Edina izjema so jetrne celice, v katerih je sinteza proteinov povečana, kar poveča tudi koncentracijo plazemskih proteinov, ki se sintetizirajo v jetrih in se izločajo v kri. V plazmi pod vplivom kortizola tako opazimo povečane koncentracije aminokislin, proteinov in tudi prostih maščobnih kislin, ki so

mobilizirane iz maščobnega tkiva (3). Kortizol ima direkten vpliv tudi na oksidacijo maščobnih kislin v celicah, v stresnih situacijah se poveča poraba prostih maščobnih kislin kot vir energije namesto glukoze (3).

Stresne situacije, kot so infekcije, kakršnekoli travme, operacije, izčrpavajoče bolezni, injekcije simpatomimetikov ali psihični stres, povzročijo povečano sproščanje kortizola iz nadledvične žleze, zato kortizol poljudno imenujemo stresni hormon (3). Kortizol deluje na organizem protivnetno, tako da omili že nastalo vnetje ali pa prepreči vnetne procese že pred nastankom pravega vnetja. Takšno delovanje dosega z različnimi mehanizmi. Najpomembnejši protivnetni učinek kortizola je stabilizacija lizosomalnih membran, ki tako ne razpadejo in v okoliško tkivo ne sprostijo proteolitičnih encimov, ki bi povzročili vnetje. Kortizol zmanjša sintezo prostaglandinov in levkotrienov, ki so odgovorni za vnetne procese, ter tako prepreči vazodilatacijo, zmanjša permeabilnost kapilar in ustavi premik belih krvnih celic v vneto področje (6). V belih krvnih celicah zmanjša sintezo interleukina-1 in s tem zniža povišano temperaturo ter zmanjša nadaljnjo vazodilatacijo, ki bi nastala ob visoki temperaturi. Kortizol na imunski sistem deluje zaviralno, zmanjša se predvsem sinteza limfocita T (3).

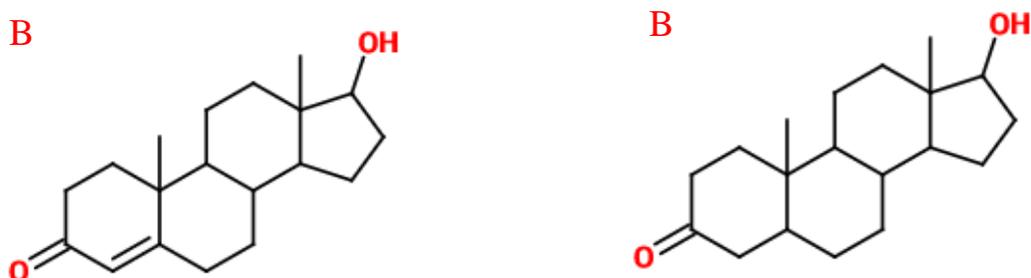
Sproščanje glukokortikoidnih hormonov iz skorje nadledvične žleze je pod nadzorom hipotalamus-hipofizne osi. Sproščanje glukokortikoidnih hormonov poteka po cirkadianem ritmu in pa ob določenih stresnih dejavnikih. Iz hipotalamusa se sprošča kortikotropin-sproščujoči hormon (CRH), ki vpliva na adenohipofizo. Iz celic adenohipofize se pod vplivom CRH začne v krvni obtok sproščati adrenokortikotropin (ACTH), ki v skorji nadledvične žleze povzroči sintezo glukokortikoidnih hormonov. Regulacija plazemske koncentracije kortizola je urejena z negativno povratno zanko. Ko koncentracija kortizola v krvi zadosti naraste, kortizol zavira svoje nadaljnje sproščanje z zaviralnim delovanjem na hipotalamus in hipofizo, kar ustavi sproščanje CRH in ACTH iz omenjenih žlez (7).

### 1.1.2. ANDROGENI SISTEM

AR so jedrni receptorji, ki ob aktivaciji z moškimi spolnimi hormoni uravnavajo transkripcijo genov v tarčnih tkivih in so odgovorni za razvoj in vzdrževanje značilnih moških karakteristik, s katerimi se moški razlikujejo od žensk. Moške spolne hormone, kot so testosteron, dihidrotestosteron (DHT) (Slika 1), androsteron in ostale, imenujemo s

skupnim pojmom androgeni hormoni. Izločajo jih intersticijske Leydigove celice v testisih, izmed hormonov prevladuje izločanje testosterona (8).

Izločanje androgenih hormonov se s časom spreminja, obilno se izločajo v gestacijski dobi, po rojstvu in v prvih parih mesecih življenja novorojenca. V otroški dobi se androgeni hormoni praktično ne izločajo do pubertete. Z nastopom pubertete pa izločanje androgenih hormonov počasi narašča do maksimuma, ki ga doseže odrasel moški. Majhne količine androgenih hormonov se izločajo tudi iz drugih delov telesa, npr. iz nadledvične žleze in pri ženskah iz jajčnikov, a je njihova aktivnost običajno tako majhna, da pri ženskah ne povzročajo moških karakteristik razen rasti sramnih dlak (3).



Slika 1: Strukturni formulirji (A) testosterona in (B) dihidrotestosterona (DHT).

Androgeni hormoni so steroidne spojine in se sintetizirajo iz holesterola ali direktno iz acetil koencima A, pretvorba iz testosterona do DHT pa poteka s pomočjo encima  $5\alpha$  reduktaza. Testosteron je glavni androgeni hormon in ima številne učinke v telesu, DHT pa je njegova bolj aktivna biološka oblika (9). Po krvi se večina testosterona prenaša vezanega na plazemske proteine - albumine in globuline, ki vežejo spolne hormone bolj močno kot albumini. Iz krvi preide v tkiva ali se izloči iz telesa preko jeter ali ledvic. Testosteron v prosti obliki prehaja v različna tkiva v celem telesu, med katerimi je žleza prostata tista, na katero najbolj vpliva. V celicah prostate se testosteron reducira do DHT-ja s pomočjo intracelularnega encima  $5\alpha$ -reduktaze (3).

DHT se v citoplazmi celice veže na AR, ki ob vezavi spremeni konformacijo, disocira od proteinov toplotnega šoka in kompleks DHT-AR tako preide v celično jedro. V jedru celice se dva AR povežeta v dimer in vežeta na DNK na mesto odzivno za androgene hormone. Transkripcijska aktivnost je odvisna od koregulatorjev (korepresorjev ali koaktivatorjev), ki se vežejo zraven. Ob vezavi koaktivatorjev se začne transkripcija DNK, tvorijo se mRNK in sinteza novih proteinov se močno poveča (8–10). Opaženo je bilo tudi negenomsko

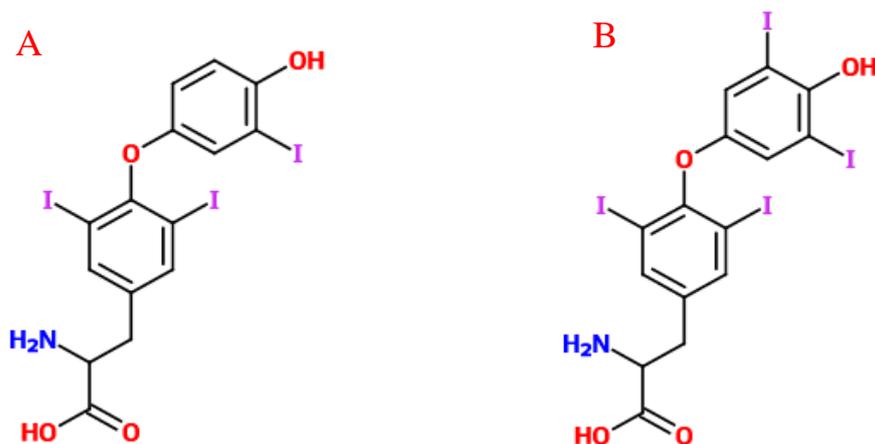
delovanje androgenih hormonov preko različnih poti intracelularne signalizacije. Za takšno delovanje vezava na DNK in transkripcija ter translacija genov ni potrebna, zato učinki nastopijo prej, že v času ene sekunde do nekaj minut (10).

Testosteron in DHT vplivata na mnoge procese v človeškem telesu. Odgovorna sta za pravilen razvoj moških telesnih značilnosti pri plodu: za nastanek mošnje, penisa, prostate, semenskih mešičkov in moških spolnih vodov. V zadnjem trimesečju nosečnosti testisi ploda izločajo večje količine testosterona, kar povzroči spust testisov v mošnjo. Od pubertete naprej testosteron povzroči razvoj primarnih in sekundarnih moških spolnih znakov. Povzroči rast penisa, mošnje in testisov, ki so primarni spolni znaki moškega. Pojavijo se tudi značilni sekundarni moški spolni znaki: rast sramnih dlak, brade, večja poraščenost tudi na drugih delih telesa, sprememba glasu, pojav aken, dvig mišične mase. Spremeni se oblikovanost celega telesa, saj poleg povečanja mišične mase, testosteron poveča tudi velikost in moč kosti. Upočasnijo se rast las in z leti opazimo umikajočo lasno linijo ali celo plešavost. Testosteron poveča bazalni metabolizem telesa (BMT) in vpliva na elektrolitsko ravnotežje v telesu z reabsorpcijo natrija v distalnih tubulih ledvic. Razlika med moškimi in ženskami nastane tudi v številu krvnih celic, moški jih imajo namreč okoli 700.000 več. Pod vplivom testosterona se začne tudi proces spermatogeneze oz. nastajanja semenčic v Sertolijevih celicah testisa (3).

Regulacija izločanja androgenih hormonov poteka preko hipotalamus-hipofizne osi. Iz hipotalamusa se v ciklusih sprošča gonadoliberin (GnRH), ki deluje spodbujevalno na izločanje gonadotropnih hormonov iz hipofize (9). Iz hipofize se izločata dva hormona: luteinizirajoči hormon (LH) in folikulostimulirajoči hormon (FSH). LH stimulira izločanje testosterona iz Leydigovih celic testisa, količina izločenega testosterona je direktno proporcionalna količini porabljenega LH. FSH pa se veže na specifične receptorje na Sertolijevih celicah testisa in vpliva na spermatogenezo. Sertolijeve celice izločajo tudi hormon inhibin, ki zavira izločanje GnRH iz hipotalamusa ter FSH in LH iz hipofize in tako zaključuje negativno povratno zanko. Druga negativna povratna zanka regulacije je sklenjena s testosteronom, ki prav tako deluje zaviralno na hipotalamus in hipofizo (3).

### 1.1.3. TIROIDNI SISTEM

TR so jedrni receptorji, ki se nahajajo po celem telesu in ob aktivaciji s tiroidnimi hormoni uravnavajo transkripcijo velikega števila genov in povzročijo večjo funkcionalno aktivnost celega telesa. Žleza ščitnica proizvaja in izloča v kri tiroidne hormone, večino 93 % izločenih metabolno aktivnih hormonov predstavlja tiroksin (T4), preostalih 7 % pa predstavlja trijodotironin (T3) (Slika 2) (3).



Slika 2: Strukturni formuli tiroidnih hormonov (A) T3 in (B) T4.

Po krvi se T3 in T4 prenašata vezana na transportne proteine: tiroksin-vezujoče globuline, tiroksin-vezajoče prealbumine in albumine. T3 ima manjšo afiniteto do transportnih proteinov in hitreje prehaja v tkivne celice, kjer se oba hormona skladiščita vezana na intracelularne proteine. T3 in T4 iz krvi prehajata skozi celično membrano s pomočjo difuzije. V citoplazmi celice se večina T4 dejodira do T3, ki ima večjo afiniteto do tiroidnega receptorja in se v 90 % vezave molekul veže na tiroidni receptor (3).

Kljub temu, da sta hormona T3 in T4 odgovorna za enake farmakološke učinke v telesu, se razlikujeta v hitrosti in trajanju delovanja. T3 je bolj potenten kot T4, ima večjo afiniteto do TR, učinki delovanja T3 na TR nastopijo hitreje in tudi hitreje izzvenijo. T4 ima daljšo latentno dobo do par dni, njegovo aktivno delovanje pa traja dalj časa kot pri T3. TR, ki se nahaja v jedru celice v bližini DNK, ob vezavi liganda tvori homodimer s še enim TR ali heterodimer z retinojskim X receptorjem (RXR). Na DNK se dimer veže na odzivnem mestu za tiroidne hormone, skupaj s koregulatorji. Vezava koaktivatorja na kompleks sproži proces prepisovanja DNK s pomočjo RNA polimeraze in tvorjenje novih proteinov (11).

Takšno je klasično delovanje tiroidnih hormonov, ki pa se prekriva tudi z nengenomskim delovanjem tiroidnih hormonov, ki je hitrejšo od klasičnega delovanja, učinki nengenomskega delovanja so opazni že po nekaj minutah. Tiroidni hormoni lahko namreč delujejo poleg na TR tudi na specifične receptorje na membrani celice, na mitohondrij in na okrnjene izoforme tiroidnih receptorjev, ki se nahajajo v citoplazmi ali na membrani celice. Preko uravnavanja delovanja ionskih kanalčkov in oksidativne fosforilacije, s katero nastajajo sekundarni celični prenašalci, tiroidni hormoni učinkujejo na srce, možgane in maščobno tkivo (12).

Tiroidni hormoni spodbujajo rast telesa, kar je najbolj razvidno pri rastočih otrocih. Zelo pomembni so učinki tiroidnih hormonov na rast in razvoj možganov pri človeškem plodu in v prvih nekaj letih njegovega življenja. Hudo pomanjkanje tiroidnih hormonov v tem obdobju lahko povzroči bolezen kretinizem. Stimulacija centralnega živčnega sistema s strani tiroidnih hormonov poveča hitrost vzbujenja živčnih vlaken, kar se pri posameznikih s povišanimi tiroidnimi hormoni (hipertiroidizem) lahko izrazi z nervoznostjo, paranojo in anksioznimi motnjami. Tiroidni hormoni stimulirajo metabolizem ogljikovih hidratov in maščob, znižajo koncentracijo holesterola, fosfolipidov in trigliceridov v plazmi, medtem ko se koncentracija prostih maščobnih kislin v plazmi poveča. Pod vplivom tiroidnih hormonov se poveča tudi sinteza in razkroj proteinov ter BMT. Povečane koncentracije tiroidnih hormonov lahko povečajo BMT od 60 % do 100 % nad normalnim BMT-jem in kljub zvečanemu apetitu znižajo telesno težo, ravno obratno pa znižane koncentracije tiroidnih hormonov znižajo BMT in telesna teža se poviša. Nizke koncentracije tiroidnih hormonov (hipotiroidizem) zmanjšajo izločanje prebavnih sokov in motiliteto gastrointestinalnega trakta ter lahko povzročijo zaprtje oz. konstipacijo (3).

Tiroidni hormoni vplivajo tudi na kardiovaskularni sistem: povzročijo povečan srčni utrip, večji pretok krvi, moč srčne mišice, povečan sistoličen in znižan diastoličen krvni tlak. Poveča se poraba kisika in nastajanje CO<sub>2</sub>, kar spodbudi hitrost in globino dihanja. Vpliv tiroidnih hormonov je opazen tudi na mišicah (pri hipertiroidizmu opazimo tremor mišic), na spancu (hipertiroidizem povzroča težave s spanjem, kljub občutku utrujenosti) in endokrinem delovanju ostalih žlez v telesu (izločanje inzulina, glukagona, paratiroidnih in spolnih hormonov, glukokortikoidnih hormonov, itd.) (4).

Tiroidni hormoni z aktivacijo TR vplivajo na funkcionalno aktivnost celega telesa. Pod vplivom tiroidnih hormonov se v vseh celicah telesa poveča metabolna aktivnost celic,

poveča se aktivnost in število mitohondrijev v celicah in aktivni transport ionov skozi celične membrane, ki porablja energijo v obliki adenozin trifosfat-a (ATP). Tako se poveča produkcija toplote v telesu (13).

Regulacija izločanja tiroidnih hormonov iz žleze ščitnice poteka preko hipotalamus-hipofizne osi. Iz hipotalamusa se pod vplivom različnih signalov (kot npr. mraz, čustva) sprošča tirootropin-sproščujoči hormon (TRH). To je peptidni hormon, ki deluje na celice hipofize. TRH stimulira sintezo in izločanje tirotropina (TSH) iz hipofize. TSH pa vpliva direktno na žlezo ščitnico, pod njegovim vplivom se namreč iz ščitnice sproščata T4 in T3. Z delovanjem T3 in T4 na celice se poveča metabolizem celic, različni produkti metabolizma pa inhibirajo nadaljnjo sproščanje TSH in TRH iz hipofize in hipotalamusa. Tudi sami tiroidni hormoni delujejo direktno na hipofizo in inhibirajo nastajanje TSH. Tako je sklenjena negativna povratna zanka, katere glavni cilj je vzdrževanje konstantne ravni prostih tiroidnih hormonov v krvi. Mnogo substanc lahko preko različnih mehanizmov vpliva na izločanje tiroidnih hormonov iz ščitnice in poruši vzdrževanje stalne koncentracije tiroidnih hormonov v krvi, kar se kaže kot hipo- ali hiper-tiroidizem (3,4).

#### 1.1.4. PREGNANSKI X RECEPTOR

PXR spada v družino celičnih jedrnih receptorjev, ki so zadolženi za prepisovanje oz. transkripcijo genov. S podobno strukturo, a večjim vezavnim žepom kot ostali jedrni receptorji, lahko veže veliko strukturno različnih ligandov. Ob vezavi liganda na PXR se spremeni konformacija vezavnega mesta, kar povzroči odcep PXR od proteinov toplotnega šoka, s katerim v citoplazmi celice tvori kompleks. Prost PXR preide v celično jedro, kjer tvori heterodimer z RXR ter se veže na DNA, zraven pa se vežejo koaktivatorji, ki sprožijo transkripcijo genov ali korepresorji, ki transkripcijo genov zavirajo (14, 15).

PXR se nahaja v tkivih po celem telesu in sodeluje v številnih procesih v človeškem telesu, kot so: regulacija metabolizma endogenih in eksogenih snovi, transport žolčne kisline, vnetni procesi in patogeneza raka. Nahaja se v ledvicah, jetrih, želodcu, tankem in debelem črevesju, v celicah imunskega sistema, v ovarijih, prostati, dojkah, kostnem mozgu, možganih in hrbtenjači. Značilno je tudi večje izražanje receptorja v rakavih tkivih, najdemo ga pri raku dojk, raku prostate, raku kolona, raku ovarijev in endometrija, ter pri

osteosarkomu. Aktivacija PXR lahko vpliva na povečano ali zmanjšano apoptozo in proliferacijo tumorskih celic in nadaljnji razvoj tumorja (14–16).

PXR ima veliko vlogo pri metabolizmu in eliminaciji ksenobiotikov. Aktivacija PXR z agonisti povzroči sintezo encimov prve (citokroma P450: npr. CYP3A, CYP2B, CYP2C) in druge faze biotransformacije (aldehid dehidrogenaze, alkohol dehidrogenaze, karboksil-esteraze, UDP-glukuronoziltransferaze, glutation-S-transferaze, sulfotransferaze), ter transportnih proteinov (P-glikoprotein: ABCC in MDR prenašalca) in tako omogoči hitrejše očiščenje telesa eksogene snovi (14, 15, 17). Aktivacijo PXR lahko povzročijo številne spojine, tudi naravna (npr. šentjanževka) ali sintezna zdravila npr. rifampicin, klotrimazol, ritonavir, ciklosporin, paklitaksel, tamoksifen (15). Takšna aktivacija PXR lahko povzroči številne interakcije med zdravili, neuspešnost terapije zaradi prehitrega izločanja zdravilne učinkovine iz telesa in neželene učinke terapije. Pri rakavih obolenjih lahko aktivacija PXR z naštetim delovanjem privede tudi do nastanka tumorjev rezistentnih na zdravila, poleg tega pa sama aktivacija PXR lahko povzroči večjo agresivnost tumorjev (18). Aktivacija PXR v nekaterih rakavih tkivih (npr. rak kolona) povzroči celično rast in deluje prokarcinogeno preko različnih mehanizmov, kot so aktivacija kisikovih reaktivnih vrst, inhibicija apoptoze celic. Nasprotno so dokazali v študiji na tumorskih celicah dojk, a tudi tu obstajajo dokazi o povečani proliferaciji celic, povzročeni z aktivacijo PXR (19).

Zaradi velike vpletenosti PXR pri rakavih obolenjih, tako na same tumorske celice kot tudi na terapijo z zdravilnimi učinkovinami, je aktivacija PXR neželena. Farmacevtska industrija se aktivaciji PXR poskuša izogniti z zdravilnimi učinkovinami, ki ne izkazujejo aktivnosti na PXR. A z uporabo netoksičnih in dovolj potentnih antagonistov PXR bi lahko izboljšali učinkovitost zdravilnih učinkovin, preprečili stranske učinke, ne samo pri terapiji določenih rakavih obolenj, pač pa tudi nekaterih drugih stanjih, kot je metabolni sindrom pri osebah na dieti z visokim vnosom maščob (18).

#### *1.1.4.1. VLOGA PXR PRI RAKAVIH BOLENJIH*

Številne raziskave so potrdile vlogo PXR pri rakavih obolenjih. Gupta s sodelavci je z raziskavo na celicah karcinoma ovarija potrdil prisotnost PXR v tumorskih celicah ovarija in ugotovil, da njegova aktivacija povzroči proliferacijo celic, rast tumorja in rezistenco na zdravila (20). Raziskave Wanga s sodelavci so potrdile vpliv PXR na rast in apoptozo celic raka debelega črevesa. Aktivacija PXR namreč spodbuja rast, invazijo in metastazo rakavih celic debelega črevesja (21). Prisotnost PXR in njegovo vpletenost v razvoj rakavih

obolenjih so ugotovili tudi pri raku prostate, endometrija, požiralnika, jeter, levkemiji in osteosarkomu (16).

Tudi zdravljenje rakavih obolenj s kemoterapevtiki je podvrženo vplivom PXR, ki regulira metabolizem in eliminacijo ksenobiotikov preko sinteze encimov prve in druge stopnje biotransformacije in transportnih proteinov, ter tako vpliva na učinkovitost kemoterapevtikov. Nekateri izmed kemoterapevtikov, npr. paklitaksel, tamoksifen in vinblastin delujejo kot aktivatorji PXR in z zvečanjem sinteze encimov biotransformacije, ter transportnih proteinov vplivajo na hitrejšo izločanje učinkovine iz celic in telesa. Tako se lahko pojavi rezistenca tumorjev na eno ali več različnih zdravilnih učinkovin. Za pojav rezistence tumorja na zdravila je možno več vzrokov. Premajhna koncentracija učinkovine v celici za doseg željenega terapevtskega učinka nastane tudi ob povečanemu izražanju transportnih proteinov, kot je P-glikoprotein, MDR1 in ABC transporterja. Takšna rezistenca je značilna, npr. pri doksorubicinu, ki ga iz tumorske celice črpa P-glikoprotein in vinblastinu, ki se iz celice izloča z ABC transportejem. Za rezistenco tumorjev na zdravila je lahko kriva premajhna aktivacija predzdravila, ki se *in vivo* metabolizira v aktivno učinkovino, kot primer lahko navedemo irinotekan. S povečanim metabolizmom se poveča inaktivacija učinkovine (npr. metaboliti paklitaksela izgubijo terapevtski učinek) in uporaba alternativnih metaboličnih poti učinkovine, kar lahko povzroči pojav rezistence tumorjev na zdravila (15).

Ob sočasni uporabi več različnih zdravil, ki je pogosto potrebna pri kemoterapiji, lahko z opisano aktivacijo PXR in povečanjem metabolizma povzročimo več stranskih učinkov zdravil in interakcij med zdravili. Rešitev opisanih problemov kemoterapije predstavlja regulacija PXR z uporabo netoksičnih selektivnih antagonistov PXR. V raziskavi na celični liniji endometričnih rakavih celic HEC-1 so Masuyama in sodelavci z uporabo majhnih interferenčnih molekul siRNK, ki zavirajo delovanje PXR ob prisotnosti protitumornih učinkovin cisplatina in paklitaksela dokazali značilno zmanjšanje celične rasti in zvečanje apoptoze celic. Učinek so opazili pri cisplatinu in paklitakselu, ki sta liganda PXR, ne pa tudi pri doketakselu in karboplatinu (22).

Netoksični antagonisti PXR bi tako, kot nove zdravilne učinkovine v določenih primerih, lahko pomagali nadzorovati rast tumorskih celic in preprečili nastanek rezistence tumorjev na zdravila in ob sočasni terapiji s kemoterapevtiki izboljšali izide zdravljenja rakavih

obolenj. Potrebne pa so še nadaljnje raziskave, ki bi določile pri zdravljenju katerih tumorjev, bi imela terapija z antagonisti PXR signifikantne koristi.

## 2. NAMEN DELA

Katedra za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo je sintetizirala nove spojine KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196, ki so antagonisti PXR in bi lahko imele uporabno vrednost v terapiji rakavih obolenj. PXR je jedrni receptor, ki je sposoben vezave veliko strukturno različnih ligandov, in ima podoben vezavni žep kot ostali jedrni receptorji, zato obstaja možnost učinkovanja antagonistov PXR tudi na ostale jedrne receptorje. Novim učinkovinam bomo ovrednotili selektivnost delovanja na izbrani receptor, saj s selektivnim delovanjem zdravilne učinkovine dosežemo želene terapevtske učinke in manj neželenih učinkov.

V naši magistrski nalogi bomo vrednotili selektivnost delovanja izbranih antagonistov PXR. Spojinam KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 bomo določili potencialen učinek na AR, GR in TR z *in vitro* luciferaznim testom. Na celični liniji MDA-kb2 bomo določali potencialno agonistično in antagonistično delovanje omenjenih spojin na AR in GR, na celični liniji GH3.TRE-Luc pa potencialno agonistično in antagonistično delovanje omenjenih spojin na TR. Najprej bomo z MTS testom preverili citotoksičnost izbranih spojin na celični liniji MDA-kb2 in določili najvišje necitotoksične koncentracije spojin, ki jih bomo uporabili v luciferaznem testu, s katerim bomo ovrednotili delovanje izbranih spojin selektivno na AR in GR. Ob tem bomo določili tudi  $EC_{50}$  in  $IC_{50}$  vrednosti posameznih spojin na AR in GR, ki jih bomo primerjali z  $EC_{50}$  in  $IC_{50}$  vrednostmi izbranih kontrolnih spojin. Citotoksičnost na celični liniji GH3.TRE-Luc bomo preverili s testom živosti celic z resazurinom in določili najvišje necitotoksične koncentracije spojin za agonistično in antagonistično delovanje na TR. Takoj za testom živosti celic z resazurinom bomo izvedli tudi luciferazni test, ter določili  $EC_{50}$  in  $IC_{50}$  vrednosti posameznih spojin na TR. Z naštetimi eksperimenti bomo poskušali potrditi ali zavreči naslednje hipoteze:

1. Hipoteza: Spojina KZH-137 je sposobna modulacije AR, GR ali TR.
2. Hipoteza: Spojina KZH-165 je sposobna modulacije AR, GR ali TR.
3. Hipoteza: Spojina KZH-190 je sposobna modulacije AR, GR ali TR.
4. Hipoteza: Spojina KZH-196 je sposobna modulacije AR, GR ali TR.

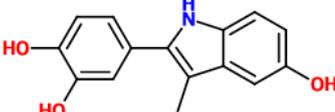
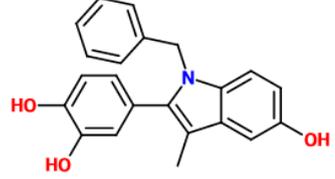
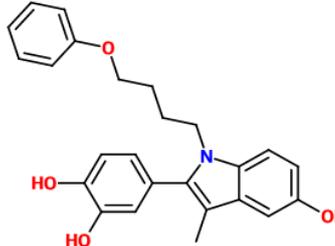
### 3. MATERIALI IN METODE

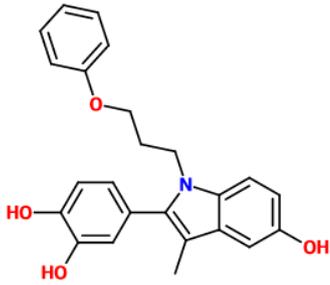
#### 3.1. MATERIALI

##### 3.1.1. TESTIRANE SPOJINE

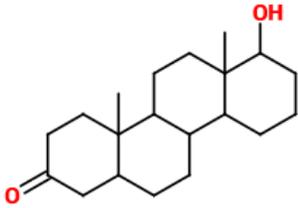
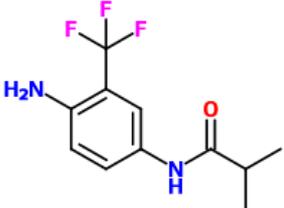
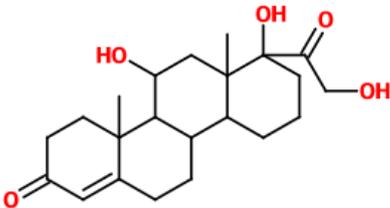
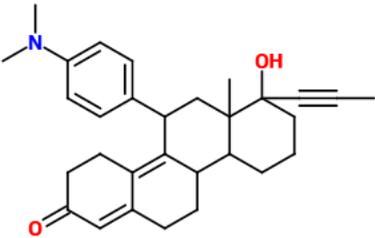
Za testiranje smo izbrali 4 antagonist PXR, ki so bili sintetizirani na Fakulteti za farmacijo na Katedri za Farmacevtsko kemijo. To so KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196. V preglednici II spodaj so prikazani ime, struktura, molekulska masa in aktivnost izbranih spojin na PXR. Kot kontrolne spojine smo uporabili še DHT, mifepriston (RU-486), flutamid (FLUT) in hidrokortizon (HC) pri testiranju delovanja na AR in GR na celični liniji MDA-kb2 (Preglednica III) in T3 ter bisfenol A (BPA) pri testiranju delovanja na TR na celični liniji GH3.TRE-Luc (Preglednica IV).

Preglednica II: Ime, struktura, molekulska masa in aktivnost na PXR spojin KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196

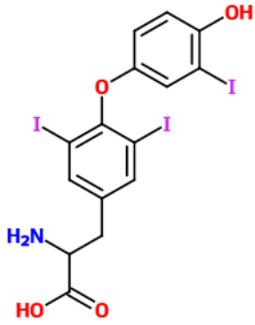
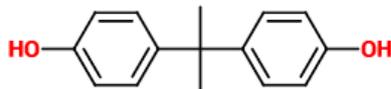
IME SPOJINE	STRUKTURA	MOLEKULSKA MASA [g/mol]	AKTIVNOST NA PXR
KZH-137		255,27	Antagonist, IC <sub>50</sub> =11 μM (23)
KZH-165		345,40	Agonistična aktivnost pri koncentraciji 10 μM
KZH-190		403,48	Agonistična in antagonistična aktivnost pri koncentraciji 10 μM

KZH-196		389,45	Antagonistična aktivnost pri koncentraciji 10 $\mu$ M
---------	---	--------	---

Preglednica III: Ime, struktura in molekulska masa uporabljenih kontrolnih spojin na celični liniji MDA-kb2

IME SPOJINE	STRUKTURA	MOLEKULSKA MASA [g/mol]
DIHIDROTESTOSTERON (DHT)		290,4403
FLUTAMID (FLUT)		276,2118
HIDROKORTIZON (HC)		362,4599
MIFEPRISTON (RU-486)		429,5937

Preglednica IV: Ime, struktura in molekulska masa uporabljenih kontrolnih spojin na celični liniji GH3.TRE-Luc

IME SPOJINE	STRUKTURA	MOLEKULSKA MASA [g/mol]
TRIJODTIRONIN (T3)		650,9735
BISFENOL A (BPA)		228,291

### 3.1.1.1. PRIPRAVA VZORCEV TESTIRANIH SPOJIN

Najprej smo glede na znano maso in molekulska maso spojin KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 preračunali potreben volumen topila dimetil sulfoksida (DMSO) za pripravo 400 mM raztopine in izbrane antagoniste PXR raztopili v DMSO v mikrocentrifugirki. Pripravljeno 400 mM raztopino smo redčili z DMSO v razmerju 50:50 in tako dobili 200 mM raztopino. 200 mM raztopino smo 1000-krat redčili z gojitvenim medijem, gojitveni medij smo prilagodili posamezni celični liniji in ogreli na telesno temperaturo. Za testiranja na celični liniji MDA-kb2 smo uporabili gojitveni medij, opisan v poglavju Celična linija MDA-kb2 in uporabljeni reagenti (poglavje 3.1.2.), za testiranje na celični liniji GH3.TRE-Luc pa smo uporabili PMC medij, opisan v poglavju Celična linija GH3.TRE-Luc in uporabljeni reagenti (poglavje 3.1.3.). Tako smo pridobili delovno raztopino s koncentracijo 200  $\mu$ M, ki vsebuje le 0,1 % DMSO v mediju. S testiranjem smo se prepričali, da dodatek 0,1 % DMSO v mediju ne vpliva na rezultate in daje enake rezultate kot uporaba samega medija. Iz 200 $\mu$ M delovne raztopine smo z redčenjem z 0,1% DMSO v gojitvenem mediju pripravili ostale koncentracije raztopine (prikazane v preglednici V in VI), ki smo jih potrebovali za testiranje citotoksičnosti izbranih antagonistov PXR na obeh celičnih linijah in morebitno učinkovanje na AR, GR in TR.

Preglednica V: Koncentracije spojin, ki smo jih uporabili za testiranje citotoksičnosti spojin.

	<b>AR</b>		<b>GR</b>		<b>TR</b>	
	Agonizem	in antagonizem	Agonizem	in antagonizem	Agonizem	Antagonizem
<i>KZH-137</i>	100 µM		100 µM		100 µM	50 µM
<i>KZH-165</i>	50 µM		50 µM		50 µM	25 µM
<i>KZH-196</i>	25 µM		25 µM		10 µM	5 µM
					1 µM	0,5 µM
					0,1 µM	0,05 µM
					0,01 µM	0,005 µM
					0,001 µM	0,0005 µM
<i>KZH-190</i>	100 µM		100 µM		50 µM	25 µM
	50 µM		50 µM		20 µM	10 µM
	25 µM		25 µM		10 µM	5 µM
	10 µM		10 µM		1 µM	0,5 µM
	1 µM		1 µM		0,1 µM	0,05 µM
					0,01 µM	0,005 µM
					0,001 µM	0,0005 µM

Preglednica VI: Koncentracije spojin, ki smo jih uporabili za testiranje agonističnega in antagonističnega delovanja na AR, GR in TR.

	<b>AR</b>		<b>GR</b>		<b>TR</b>	
	Agonizem	in antagonizem	Agonizem	in antagonizem	Agonizem	Antagonizem
<i>KZH-137</i>	50 µM		50 µM		100 µM	50 µM
<i>KZH-165</i>	10 µM		10 µM		50 µM	25 µM
<i>KZH-196</i>	1 µM		1 µM		10 µM	5 µM
	0,1 µM		0,1 µM		1 µM	0,5 µM
	0,01 µM		0,01 µM		0,1 µM	0,05 µM
	0,001 µM		0,001 µM		0,01 µM	0,005 µM
	0,0001 µM		0,0001 µM		0,001 µM	0,0005 µM
<i>KZH-190</i>	10 µM		10 µM		50 µM	25 µM
	1 µM		1 µM		20 µM	10 µM
	0,1 µM		0,1 µM		10 µM	5 µM
	0,01 µM		0,01 µM		1 µM	0,5 µM
	0,001 µM		0,001 µM		0,1 µM	0,05 µM
	0,0001 µM		0,0001 µM		0,01 µM	0,005 µM
					0,001 µM	0,0005 µM

Pripravili smo si tudi raztopine kontrolnih spojin. Spojine smo raztopili v topilu DMSO in pripravljeno raztopino 1000-krat redčili z gojitvenim medijem, ki smo ga uporabili pri posamezni celični liniji, ogretim na telesno temperaturo. Tako je bila vsebnost DMSO v mediju 0,1 % kar smo s predhodnih testiranjem dokazali, da ne vpliva na rezultate. Nadaljnja

redčenja do ustrezne žele koncentracije, prikazane v preglednici VII, smo izvajali s topilom 0,1 % DMSO v mediju.

Preglednica VII: Koncentracije pozitivnih kontrolnih spojin, ki smo jih uporabili za testiranje agonističnega in antagonističnega delovanja na AR, GR in TR.

Spojina	DHT	FLUT	HC	RU-486	T3	BPA
Testirane koncentracije	1000 nM	50 µM	50 µM	10 µM	0,1 µM	100 µM
	100 nM	10 µM	10 µM	1 µM	0,01 µM	75 µM
	10 nM	3,3 µM	1 µM	0,1 µM	0,001 µM	50 µM
	1 nM	1 µM	0,5 µM	0,05 µM	0,0005 µM	25 µM
	0,1 nM	0,33 µM	0,1 µM	0,01 µM	0,00025 µM	10 µM
	0,01 nM	0,1 µM	0,01 µM	0,001 µM	0,0001 µM	1 µM
	0,001 nM	0,01 µM	0,001 µM	0,0001 µM	0,00005 µM	0,1 µM
					0,00001 µM	0,01 µM
Aktivnost	Agonist AR	Antagonist AR	Agonist GR	Antagonist GR	Agonist TR	Antagonist TR

### 3.1.2. CELIČNA LINIJA MDA-kb2 IN UPORABLJENI REAGENTI

Celična linija MDA-kb2 (ATCC, Nemčija) je bila razvita iz starševske celične linije MDA-MB-453 humanih celic raka dojke, ki endogeno stabilno izraža AR in GR, le šibko estrogene receptorje  $\beta$  in ne izraža estrogenskih receptorjev  $\alpha$  in progesteronskih receptorjev. S transformacijo celic s plazmidnim vektorjem MMTV.neo.luc, ki vsebuje promotorsko zaporedje odzivno na androgene in glukokortikoide hormone, ter reporterski gen za luciferazo, je bila pridobljena stabilna celična linija MDA-kb2. Prednosti celične linije so: stabilnost linije, enostavno gojenje in vzdrževanje celic, visoka občutljivost in odzivnost tudi preko 80 pasaž celic. Omogoča hitro in enostavno pridobitev rezultatov ter dobro ponovljivost rezultatov. Slabost MDA-kb2 je nižja specifičnost zaradi prisotnosti drugih receptorjev, ki prav tako aktivirajo MMTV reporter in lahko motijo odziv na AR in GR (24).

Celično linijo smo uporabili za proučevanje agonističnega in antagonističnega delovanja spojin na AR in GR. Tako AR kot GR agonisti aktivirajo reporterski gen in inducirajo izražanje encima luciferaze, zato je za razlikovanje obeh učinkov potrebno dodati znan antagonist, kot npr. FLUT na AR, da le-ta specifično zasede AR vezavna mesta, ne pa tudi GR. Pri delu smo uporabili naslednje reagente, prikazane v preglednici VIII:

Preglednica VIII: Reagenti, ki smo jih uporabili pri delu s celično linijo MDA-kb2.

Ime	Proizvajalec	Pogoji shranjevanja
Fosfatni pufer (PBS)	Gibco, ZDA	Sobna temperatura
Tripsin	Gibco, ZDA	Zmrzovalnik pri -20 °C

99,9 % DMSO	Sigma-Aldrich, Nemčija	Zmrzovalnik pri -20 °C
Barvilo tripan modro	Sigma-Aldrich, Nemčija	Sobna temperatura
CellTiter 96®AQueous One Solution Reagent (reagent za MTS test)	Promega, Madison, WI, ZDA	Zmrzovalnik pri -20 °C, v temi
Reporter Lysis 1X Buffer (lizirni pufer)	Promega, Madison, WI, ZDA	Zmrzovalnik pri -20 °C
Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrate (reagenta za luciferazni test)	Promega, Madison, WI, ZDA	Zmrzovalnik pri -80 °C, v temi
Gojitveni medij	*	Hladilnik pri 2-8 °C

\* Gojitveni medij za MDA-kb2 smo pripravili iz naslednjih reagentov:

- 500 mL Leibovitz-15 medija (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 50 mL fetalnega govejega seruma (FBS) (Gibco, ZDA),
- 5 mL raztopine antibiotikov penicilina ( $10^4$  U/mL) in streptomicina ( $10^4$  µg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, ZDA).

Raztopino smo pripravili v laboratoriju v nesterilnih pogojih, zato smo jo pred uporabo prefiltrirali v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF) skozi filter z velikostjo por 0,22 µm, ter tako zagotovili sterilnost raztopine.

### 3.1.3. CELIČNA LINJA GH3.TRE-Luc IN UPORABLJENI REAGENTI

Celično linijo GH3.TRE-Luc (univerza Wageningen, Nizozemska) smo uporabili za določanje agonističnega in antagonističnega delovanja spojin na TR. Razvita je bila iz tumorskih celic hipofize podgane (celice GH3) s postopkom stabilne transfekcije. Vstavljen je bil reporterski plazmid pGL4CP-SV40-2xtaDR4, ki nosi zapis za encim luciferazo. Tako je nastala stabilna celična linija GH3.TRE-Luc, ki se uporablja v *in vitro* testih visoke zmogljivosti in omogoča identifikacijo in kvalifikacijo učinkovin, ki so sposobne moduliranja TR. Njene prednosti so: dobra ponovljivost rezultatov, specifičnost, hitro in preprosto testiranje, ter enostavno gojenje celic (25). Pri delu smo uporabili naslednje reagente, prikazane v preglednici IX:

Preglednica IX: Reagenti, ki smo jih uporabili pri delu s celično linijo GH3.TRE-Luc.

Ime	Proizvajalec	Pogoji shranjevanja
PBS	Gibco, ZDA	Sobna temperatura

Tripsin	Gibco, ZDA	Zmrzovalnik pri -20 °C
Inhibitor tripsina (DTI)	(Gibco, ZDA)	Zmrzovalnik pri -20 °C
99,9 % DMSO	Sigma-Aldrich, Nemčija	Zmrzovalnik pri -20 °C
Barvilo tripan modro	Sigma-Aldrich, Nemčija	Sobna temperatura
CellTiter-Blue® Reagent (reagent za test s resazurinom)	Promega, Madison, WI, ZDA	Zmrzovalnik pri -20 °C, v temi
Reporter Lysis 5X Buffer (lizirni pufer)	Promega, Madison, WI, ZDA	Zmrzovalnik pri -20 °C
Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrate (reagenta za luciferazni test)	Promega, Madison, WI, ZDA	Zmrzovalnik pri -80 °C, v temi
PMC medij	*	Hladilnik od 2-8 °C
Gojitveni medij	**	Hladilnik od 2-8 °C

\*PMC medij ne vsebuje FBS in se uporablja pri izčrpavanju celic ter pri testiranjih, kjer bi lahko FBS motil rezultate. Pripravili smo ga iz naslednjih reagentov:

- 500 mL medija DMEM/F12 (Gibco, ZDA),
- 122 µL etanolamina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 500 µL insulina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 6,25 mL govejega serumskega albumina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 100 µL humanega apo-transferina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 100 µL natrijevega selenita (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 5mL raztopine antibiotikov penicilina ( $10^4$  U/mL) in streptomicina ( $10^4$  µg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, ZDA).

\*\* Gojitveni medij za GH3.TRE-Luc smo pripravili iz naslednjih reagentov:

- 500 mL medija DMEM/F12 (Gibco, ZDA),
- 50 mL FBS (Gibco, ZDA),
- 5 mL raztopine antibiotikov penicilina ( $10^4$  U/mL) in streptomicina ( $10^4$  µg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, ZDA).

Sterilnost raztopin smo zagotoviti s filtriranjem pripravljenih raztopin v LAF komori, skozi filter z velikostjo por 0,22 µm.

### 3.1.4. LABORATORIJSKA OPREMA

- Invertni svetlobni mikroskop Olympus (Olympus, Tokyo, Japonska),
- Pipetboy (Biohit, Helsinki, Finska),
- Serološke pipete za enkratno uporabo 5 mL, 10 mL, 50 mL (TPP, Transadingen, Švica),
- Pipete 2-20 mL, 100-1000 mL, 20-200 mL (Gilson, Middleton, ZDA),
- Nastavki za pipete (Biohit, Helsinki, Finska),
- Mikrocentrifugirke 15 mL, 50 mL (TPP, Transadingen, Švica),
- Inkubator MCO-18AIC (Sanyo, ZDA),
- Gojitvena posoda s površino 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Transadingen, Švica),
- Mikrotitrski plošče tipa 92096 (TPP, Transadingen, Švica),
- Vibracijski mešalnik (Biosan, Latvija),
- Hladilnik in zmrzovalnik (Gorenje, Slovenija),
- Hemocitometer (Brand, Wertheim, Nemčija),
- Avtomatska multikanalna pipeta (Biohit, Helsinki, Finska),
- Mikrocentrifugirke 1,5 mL, 2 mL (Brand, Wertheim, Nemčija),
- Centrifuga (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- Inkubator Heraeus (Semlab, Amsterdam, Nizozemska),
- Mikrotitrski plošče Lumitrac 600 (TPP, Transadingen, Švica),
- Posoda za shranjevanje gojitvenega medija (TPP, Transadingen, Švica),
- Zmrzovalnik -80°C (Sanyo, ZDA),
- Krioviale (TPP, Transadingen, Švica),
- LAF komora (Iskra, Šentjernej, Slovenija),
- Čitalec mikrotitrskih plošč Synergy™ 4Hybrid Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT, ZDA).

## 3.2. METODE

### 3.2.1. OSNOVNE METODE DELA S CELICAMI

#### 3.2.1.1. OSNOVE DELA V CELIČNEM LABORATORIJU

Pri delu s celičnimi kulturami moramo biti izredno pazljivi, da ne pride do okužbe naše celične kulture s patogeni ali celicami druge celične linije. Prav tako moramo zaščititi sebe pred potencialno toksičnim materialom. Zato s celičnimi kulturami vedno rokujemo v komori z LAF komori, ki zagotavlja aseptično delo. V LAF komori je tlak zraka višji kot v prostoru, kar preprečuje vdor kontaminiranega zraka v komoro, stalen laminaren tok zraka pa preprečuje nastajanje turbulenc ob ovirah. V komori so nameščeni visoko zmogljivi HEPA filtri za zrak, ki zadržijo 99,997 % delcev, večjih od 0,3  $\mu\text{m}$  (26).

Vsak dan pred pričetkom dela v LAF komori in tudi po zaključku dela smo prižgali ultravijolično lučko za vsaj 20 minut, da zanesljivo uničimo vse žive organizme. Pred pričetkom in po koncu dela v LAF komori smo le-to tudi očistili s 70 % etanolom. Pri delu smo bili zaščiteni s čisto belo delovno haljo, ter uporabljali obutev, namenjeno le delu v celičnem laboratoriju. Uporabljali smo rokavice, ki smo jih med samim delom večkrat razkužili s 70 % etanolom, obvezno tudi pred odprtjem inkubatorja. S 70 % etanolom smo razkužili tudi vse delovne površine in laboratorijsko opremo.

#### 3.2.1.2. ODMRZOVANJE IN ZAMRZNITEV CELIC

Dolgoročno shranjevanje celic nam omogoča zamrznitev celic v tekočem dušiku pri  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Z zamrznitvijo celic preprečimo možnost nastanka genetskih sprememb in kontaminacije celične linije. Obe uporabljeni celični liniji MDA-kb2 in GH3.TRE-Luc sta adherentni celični liniji, katerih zamrznitev in odmrzovanje poteka po enakem postopku. Razlikujeta se le uporabljena gojitvena medija za MDA-kb2 in GH3.TRE-Luc, ki sta opisana v poglavjih Celična linija MDA-kb2 in uporabljeni reagenti (3.1.2.) in Celična linija GH3.TRE-Luc in uporabljeni reagenti (3.1.3.).

Kot medij za zamrzovanje celic smo uporabili 50 % gojitvenega medija, 45 % FBS in 5 % krioprotektanta DMSO. Dodatek krioprotektanta prepreči nastanek ledenih kristalov, ki poškodujejo celične stene in lahko povzročijo celično smrt. Prav tako dodatek krioprotektanta zniža tališče medija in omogoča počasnejše ohlajanje. Celično suspenzijo smo zamrznili v 1 mL krioviali s kontroliranim počasnim ohlajanjem do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Krioviale smo opremili z imenom celične linije, datumom in številom celic. Po zamrznitvi celic na -

80 °C, lahko krioviale prestavimo v posodo s tekočim dušikom in shranjujemo pri temperaturi do -180 °C (27).

Odmrzovanje celic mora potekati hitro, saj je DMSO citotoksičen in lahko pri sobni temperaturi poškoduje celice. Celično suspenzijo v krioviali smo za 2-3 minute potopili v vodno kopel, ogreto na 37 °C, da se odtali. V LAF komori smo nato suspenzijo odpipetirali v 15 mL centrifugirko, kamor smo dodali približno 9 mL gojitvenega medija, ogretega na 37 °C. Suspenzijo celic smo nato centrifugirali 5 minut pri 900 obratih na minuto, ter odpipetirali in zavrgli supernatant, ki vsebuje DMSO. Celice, ki so ostale na dnu centrifugirke, smo resuspendirali v 5 mL gojitvenega medija s pomočjo vibracijskega mešalnika. Za gojenje smo celice nasadili v T-flask posode (sterilne plastenke s površino 75 cm<sup>2</sup> in perforiranim zamaškom) in inkubirali pri pogojih, prilagojenih posamezni celični liniji. Po postopku odmrzovanja so celice za rast potrebovale daljši čas (28).

#### *3.2.1.3. GOJENJE CELIC*

Celice linije MDA-kb2 in GH3.TRE-Luc so adherentne celične linije in se po nasaditvi v T-flask v 2 do 3 urah prilepijo na površino. Celično linijo MDA-kb2 smo inkubirali v inkubatorju pri 37 °C brez prisotnosti CO<sub>2</sub>, medtem ko smo celično linijo GH3.TRE-Luc inkubirali pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosferi. Celice so med rastjo črpale hranila iz gojitvenega medija, ki smo ga menjali na 2 do 3 dni, odvisno od hitrosti rasti celic. Gojitveni medij smo menjali v LAF komori, kjer smo s serološko pipeto odpipetirali iztrošen medij in ga zavrgli. Celice so pri tem ostale prilepljene na površino. Z novo sterilno serološko pipeto smo dodali 10 mL svežega gojitvenega medija ogretega na 37 °C. Vsak dan smo spremljali rast celic s svetlobnim mikroskopom. S presajanjem celične kulture na približno 7 dni oziroma ob dosegu 80 % konfluentnosti (prekrite 80 % površine gojitvene posode) smo preprečili celično odmiranje. Tako smo s presajanjem celic pripravili več celičnih subkultur, katere smo ob dosegu 80 % konfluentnosti uporabili za svoja testiranja.

#### *3.2.1.4. NASAJANJE IN PRESAJANJE CELIC*

Postopek nasajanja in presajanja celic smo opravili v LAF komori in sta potekala na podoben način. Postopek, opisan v nadaljevanju, smo uporabili pri uporabi gojitvenega medija, ki vsebuje FBS. Najprej smo odlepili celice od podlage. S sterilno serološko pipeto smo odpipetirali iztrošen gojitveni medij in ga zavrgli. V gojitveno posodo smo nato odpipetirali 5 mL PBS, s katerim smo sprali celice. S tem korakom smo odstranili preostanek gojitvenega medija, ki bi zaradi vsebnosti FBS motil delovanje tripsina. Tripsin je reagent, proteaza, ki

smo ga uporabili za odlepljanje celice od podlage. V naslednjem koraku smo odpipetirali in zavrgli PBS, ter v gojitveno posodo odpipetirali 5 mL 0,01 % tripsina, ogretega na telesno temperaturo. Tripsin smo pustili delovati 5 minut pri 37 °C, ta čas smo T-flask s celicami vrnili v inkubator. Po 5 minutah smo s svetlobnim mikroskopom preverili, ali so se celice odlepili od podlage. Celice tripsinu niso smele biti predolgo izpostavljene, saj jih le-ta lahko poškoduje. Celice, ki se niso odlepili od podlage, smo v naslednjem koraku poskušali odstraniti mehansko. To smo storili s sterilno serološko pipeto, s katero smo odpipetirali vsebino v posodi, in še nekajkrat sprali dno posode z isto vsebino.

Nastalo suspenzijo celic smo prenesli v 15 mL centrifugirko, kjer smo suspenziji dodali 5 mL gojitvenega medija, ki je inhibiral delovanje tripsina zaradi vsebnosti FBS. Pri uporabi gojitvenega medija brez FBS smo za inhibicijo delovanja tripsina morali uporabiti DTI. Vsebino smo premešali z vibracijskim mešalnikom ter odpipetirali v mikrocentrifugirko 40 µL suspenzije, ki nam je služila za štetje celic. Centrifugirko s celično suspenzijo smo prestavili v centrifugo, nastavili protiutež ter centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih/minuto. Celice so se tako usedle na dnu centrifugirke, kar nam je omogočilo enostavno menjavo medija. S sterilno serološko pipeto smo odpipetirali in zavrgli supernatant, ki vsebuje tripsin in v centrifugirko odpipetirali 10 mL svežega gojitvenega medija, ogretega na 37°C. Medij smo dodali v dveh korakih. Najprej smo odpipetirali le 1 mL, v katerem smo resuspendirali celice s pipeto, ter nato preostalih 9 mL in vsebino premešali na vibracijskem mešalniku do nastanka ustrezne celične suspenzije.

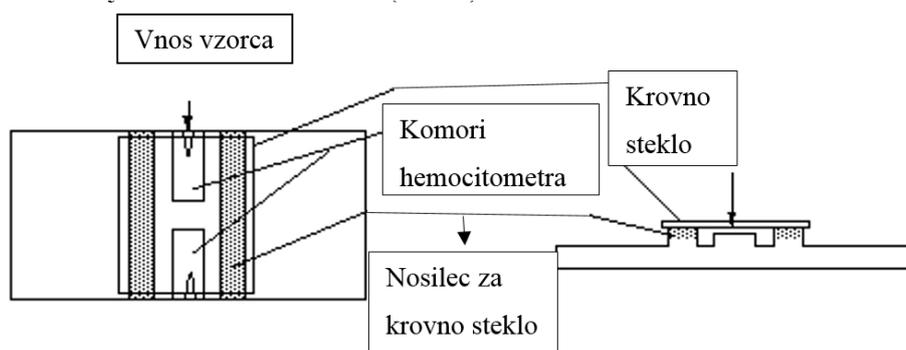
Pri postopku presaditve celic smo poljuben volumen (odvisno od hitrosti rasti celic, kdaj si želimo doseg 80 % konfluentnosti) celične suspenzije prenesli v novo gojitveno posodo, ki smo jo opremili z podatki o celični liniji, številu celic, svojim imenom in datumom ter dodali gojitveni medij do skupnega volumna 10 mL. Celice smo inkubirali pri pogojih idealnih za izbrano celično linijo. Celice linije MDA-kb2 smo inkubirali pri 37 °C brez dodanega CO<sub>2</sub> v inkubatorju MCO-18AIC, celice linije GH3.TRE-Luc pa pri 37 °C in 5 % atmosferskega CO<sub>2</sub>.

Za nasaditev celic na mikrotitrsko ploščo s 96 luknjami (tipa 92096 za MTS test in tipa Lumitrac 600 za luciferazni test ter test živosti celic z rezozurinom) smo morali pripraviti ustrezno redčitev celične suspenzije do zelene koncentracije celic (10<sup>5</sup> celic/mL za celično linijo MDA-kb2 in 3\*10<sup>5</sup> celic/mL za celično linijo GH3.TRE-Luc) ter zadosten volumen celične suspenzije. V vsako luknjo smo s pomočjo avtomatske multikanalne pipete

odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  celične suspenzije. V tem koraku smo celice tudi tretirali z izbranimi spojinami. Pred izvedbo testiranj smo celice linije MDA-kb2 inkubirali 24 ur na 37°C brez prisotnosti  $\text{CO}_2$ , celice linije GH3.TRE-Luc pa 24 ur na 37 °C ob prisotnosti 5 %  $\text{CO}_2$ .

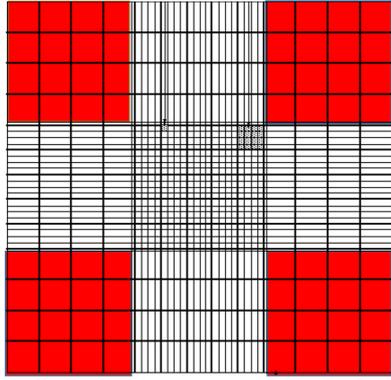
### 3.2.1.5. ŠTETJE CELIC

Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra, prikazanega na sliki 3.



Slika 3: Prikazan je izgled hemocitometra, pokritega s krovnim steklom, ter komora, v katero vnesemo vzorec.

Celično suspenzijo, nastalo po postopku odlepljanja od podlage opisanem v poglavju Nasajanje in presajanje celic (3.2.1.4.), smo pretresli na vibracijskem mešalniku, nato smo s pipeto odvzeli 40  $\mu\text{L}$  suspenzije. Odvzeto suspenzijo celic smo dodali v mikrocentrifugirko, kamor smo predhodno že odpipetirali 40  $\mu\text{L}$  barvila tripan modro (razmerje 1:1). Le-to obarva mrtve celice modro, žive celice pa ostanejo svetle. Barvilo tripan modro je toksično in kancerogeno, zato z njim rokujemo previdno in s potrebno zaščitno opremo. Vsebino v mikrocentrifugirki smo premešali na vibracijskem mešalniku in odvzeli 1  $\mu\text{L}$  nastale suspenzije ter jo vnesli v komoro hemocitometra. Hemocitometer smo predhodno očistili s 70 % etanolom. Vzorec smo s pomočjo kapilarnega vleka napolnili v eno izmed komor hemocitometra, pokrito s krovnim steklom. Komora vsebuje 9 kvadrantov, ki merijo 1 mm x 1 mm. Tudi globina je zaradi krovne stekla natančno določena 0,1 mm. Tako je volumen vsakega kvadranta 0,1  $\text{mm}^3$ . Prešteli smo žive celice v štirih kvadrantih, obarvanih rdeče na sliki 4 in izračunali povprečno število celic v enem kvadrantu ( $\bar{x}$ ).



Slika 4: Slika, ki jo vidimo pod svetlobnim mikroskopom pri štetju celic v komori hemocitometra.

Koncentracijo celic v suspenziji smo izračunali po enačbi A.

Enačba A: Enačba za izračun koncentracije celične suspenzije.

$$\rho = \bar{x} * FR * K \text{ (število celic na 1mL celične suspenzije) [Št. celic/mL]}$$

$\bar{x}$  je povprečno število celic v enem kvadrantu

FR je faktor redčenja zaradi mešanja gojišča in barvila tripan modro, v našem primeru 2

K je korekcijski faktor, v našem primeru 10000

Na štetje celic vplivajo tudi nekateri faktorji, na katere moramo biti pozorni. Suspenzijo celic je potrebno redčiti do ustrezne koncentracije. Le-ta je ustrezna, ko se celice ne prekrivajo in so enakomerno porazdeljene, še vedno pa jih je dovolj, da je naš izbran vzorec statistično značilen. Komoro hemocitometra moramo napolniti z zadostnim volumnom celične suspenzije, prisotni ne smejo biti zračni mehurčki ali nečistote (29).

## 3.2.2. TEST CITOTOKSIČNOSTI

### 3.2.2.1. MTS TEST

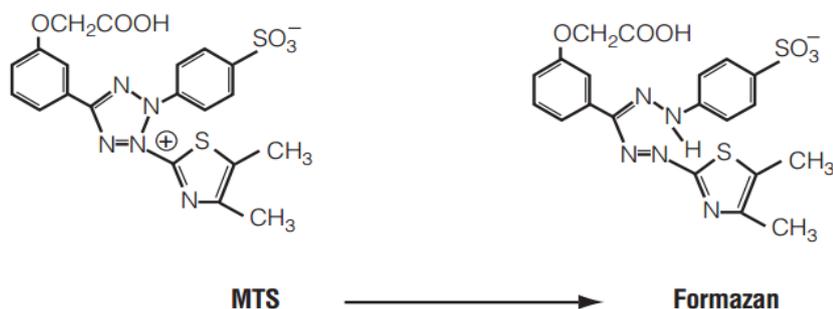
Citotoksičnost spojin za delovanje na AR in GR smo določali z metaboličnim MTS testom na celicah MDA-kb2 linije, s katerim smo določili stopnjo preživetja celic po stimulaciji celic s preiskovanimi spojinami. MTS test je kolorimetrični test in je potekal tri dni.

1. dan smo iz celične kulture MDA-kb2 v gojitveni posodi pripravili celično suspenzijo v koncentraciji  $1 \times 10^5$  celic/mL po postopku, opisanem v poglavju Nasajanje in presajanje celic (3.2.1.4.). Nasadili smo 100  $\mu$ L celične suspenzije v vsako luknjo na

dve mikrotitrski plošči tipa 92096. Prazne smo pustili le luknje v zadnji vrsti, ki nam bodo služile kot slepi vzorec - vzorec topila brez celic. Celično kulturo smo vrnili v inkubator, celice so se prilepile na podlago v 2-3 urah.

2. dan smo celice tretirali z izbranimi spojinami. Najprej smo si v mikrocentrifugirkah pripravili raztopine kontrolnih in testnih spojin v gojitvenem mediju po postopku, opisanem v poglavju Priprava vzorcev testiranih raztopin (3.1.1.1.). Iz vseh lukenj smo odpipetirali star gojitveni medij in ga zavrgli. Za ugotavljanje citotoksičnosti delovanja agonistov na AR smo v izbrane luknje odpipetirali 50  $\mu$ L 200 nM raztopine znanega antagonist na GR RU-486. Za ugotavljanje citotoksičnosti agonistov na GR pa 50  $\mu$ L 10  $\mu$ M FLUT (antagonista na AR). V izbrane luknje smo odpipetirali 50  $\mu$ L 1  $\mu$ M HC (agonista na GR, ki nam služi za ugotavljanje citotoksičnosti delovanja antagonistov na GR) ali 50  $\mu$ L 1 nM DHT (agonista na AR, ki nam služi za ugotavljanje citotoksičnosti antagonistov na AR). Tako smo zagotovili selektivnost testiranja citotoksičnost za agonistično in antagonistično delovanje na AR in GR. Po 30 minutah inkubacije smo dodali še 50  $\mu$ L raztopine izbranih antagonistov PXR. Na prvi mikrotitrski plošči smo celice izpostavili KZH-137, KZH-165, KZH-190, KZH-196 v koncentraciji 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M in 25  $\mu$ M v treh paralelah, ob prisotnosti dodanega glukokortikoidnega antagonist RU-486 v koncentraciji 100 nM na eni polovici in androgenega agonista DHT-ja koncentracije 0,5 nM na drugi. Na drugi mikrotitrski plošči smo celice izpostavili KZH-137, KZH-165, KZH-190, KZH-196 v koncentraciji 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M in 25  $\mu$ M v treh paralelah, ob prisotnost dodanega androgenega antagonist FLUT koncentracije 5  $\mu$ M na eni strani in glukokortikoidnega agonista HC koncentracije 500 nM na drugi. Zaradi ugotovljene citotoksičnosti spojine KZH-190 pri testiranih koncentracijah smo spojino testirali tudi pri koncentraciji 10  $\mu$ M in 1  $\mu$ M. Na obeh ploščah smo pripravili tudi kontrolni vzorec, kamor smo na celice v luknjah odpipetirali 100  $\mu$ L 0,1 % DMSO v mediju, ki predstavlja 100 % preživetje celic. Sledila je 24-urna inkubacija ploščic v inkubatorju MCO-18AIC pri 37 °C brez dodanega CO<sub>2</sub>.
3. dan smo v luknje na ploščah dodali substrat (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevo sol) (MTS), ki so ga žive celice sposobne reducirati do obarvanega produkta formazana. Tega so sposobne le

žive, metabolno aktivne celice, ki z encimi dehidrogenaze tvorijo NADPH (oz. NADH), ki sodeluje v reakciji redukcije MTS. Reakcija je prikazana na sliki 5.



Slika 5: Redukcija MTS do formazana v metabolno aktivnih celicah (30)

Po 1-4 urah smo s čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy™ 4Hybrid Microplate Reader izmerili absorbanco formazana pri 490 nm. Količina nastalega formazana je proporcionalna številu živih celic. Večje kot je bilo število živih celic, večja količina formazana je nastala in izmerili smo višje vrednosti absorbance. Napaka se lahko dogodi pri celicah, ki imajo okvarjene encime dehidrogenaze, sicer pa je metoda enostavna, varna in hitra (30). Izmerili smo še slepi vzorec in kontrolo 0,1 % DMSO v mediju, ki predstavlja vrednost 1, ter določili mejo citotoksičnosti pri 80 % preživelih celic glede na kontrolo.

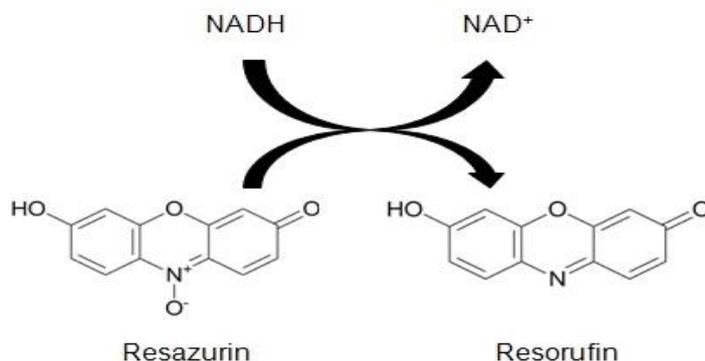
### 3.2.2.2. TEST CITOTOKSIČNOSTI Z RESAZURINOM

Citotoksičnost spojin na celice GH3.TRE-Luc smo določali s testom živosti celic z resazurinom.

1. dan smo pripravili subkulturo GH3.TRE-Luc celic. Celično suspenzijo v koncentraciji  $3 \times 10^5$  celic/mL smo nasadili v gojitveno posodo in jih pustili inkubirati do dosega približno 80 % preraščenosti celic v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.
2. dan smo izvedli izčrpavanje celic. S sterilno serološko pipeto smo odpipetirali in zavrgli gojitveni medij. Celice v gojitveni posodi smo sprali s 5 mL PBS. Nato smo v gojitveno posodo odpipetirali 10 mL PMC medija in celice vrnili v inkubator. PMC medij smo uporabili, saj ne vsebuje FBS, ki bi lahko motil meritve in posledično vplival na rezultate.

3. dan smo pripravili celično suspenzijo. Najprej smo odpipetirali in zavrgli PMC medij. V gojitveno posodo smo odpipetirali 1 mL 0,01 % tripsina. Po 30 sekundah delovanja tripsina smo ga odpipetirali in zavrgli. Celice smo pustili inkubirati 4 minute in nato pod svetlobnim mikroskopom preverili, ali so se odlepile. Potem smo v gojitveno posodo odpipetirali 1 mL inhibitorja tripsina DTI in 9 mL PMC medija. Uporabljen PMC medij namreč ni sposoben inhibirati delovanja tripsina, tako kot gojitveni medij za MDA-kb2, saj ne vsebuje FBS, zato za inhibicijo delovanja tripsina uporabimo DTI. Nadaljevali smo po postopku, opisanem v poglavju Nasajanje in presajanje celic (4.2.1.4.), in nasadili celice v koncentraciji  $3 \times 10^5$  celic/mL na mikrotitrsko ploščo Lumitrac 600. V vsako luknjo smo odpipetirali 100  $\mu$ L celične suspenzije, kjer so se celice v 2-3 urah adherirale na podlago. Za slepi vzorec, ki nam je služil kot kontrola topila, smo v luknje brez celične suspenzije odpipetirali 200  $\mu$ L PMC medija. Pripravili smo si raztopine kontrolnih in testiranih spojin po postopku, opisanem v poglavju Priprava vzorcev testiranih raztopin (3.1.1.1.). Za testiranje citotoksičnosti agonističnega delovanja na TR smo celice tretirali s 100  $\mu$ L raztopine testiranih spojin v različnih koncentracijah. Pri spojinah KZH-137, KZH-165 in KZH-196 smo testirali koncentracije 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,001  $\mu$ M. Spojino KZH-190 pa smo testirali v koncentracijah 50  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M in 0,001  $\mu$ M. Za testiranje antagonističnega delovanja na TR smo celicam dodali 50  $\mu$ L raztopine znanega agonista T3 v končni koncentraciji 0,25 nM in 50  $\mu$ L raztopine izbranih spojin različnih koncentracij. Spojine KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 smo testirali za antagonistično delovanje na TR v koncentracijah, ki so pol manjše kot pri testiranju agonističnega delovanja na TR. Po tretiranju s spojinami smo celice 24-ur inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.
4. dan smo izvedli test živosti celic z resazurinom. Barvilo resazurin je občutljivo na svetlobo, zato smo pri delu imeli ugasnjeno luč v LAF komori, ploščice s celicami pa smo ovijali v alufolijo. V vsako luknjico na mikrotitrski plošči smo dodali 10  $\mu$ L resazurina. Meritev fluorescence smo izvedli s čitalcem mikrotitrskih plošč Synergy™ 4Hybrid Microplate Reader, prvič takoj po dodatku resazurina in drugič po preteklem inkubacijskem času dveh ur. S to fluorimetrično metodo merjenja smo izmerili fluorescenco resofurina, ki je reducirana oblika resazurina, pri 590 nm.

Barvilo resazurin so žive, metabolno aktivne celice reducirale do resofurina, ki najbolj fluorescira pri 590 nm (31). Reakcija redukcije je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Redukcija resazurina do resofurina v živih metabolno aktivnih celicah (31)

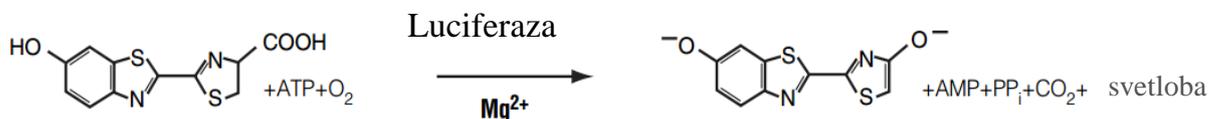
Količina nastalega resofurina je bila tako sorazmerna številu živih celic. Izmerili smo tudi ozadje - fluorescenco PMC medija brez celic, ki nam je služil kot slepi vzorec in kontrolni vzorec 0,1 % DMSO v PMC mediju, ki nam je služil kot vrednost 1 in pomeni 100 % preživetje celic. Mejo citotoksičnosti smo določili pri 80 % metabolne aktivnosti celic glede na kontrolni vzorec. Metoda je enostavna, varna in hitra. Namesto merjenja fluorescence bi lahko izmerili tudi absorbanco resofurina pri 573 nm, kjer doseže svoj absorpcijski maksimum. Tudi izmerjena vrednost absorbance je namreč sorazmerna številu živih celic in nam lahko služi za ugotavljanje citotoksičnosti spojine. A za slednjo možnost se nismo odločili, saj je metoda merjenja fluorescence bolj občutljiva in lažja za izračun rezultatov (31).

### 3.2.3. LUCIFERAZNI TEST

#### 3.2.3.1. LUCIFERAZNI TEST NA CELIČNI LINIJI MDA-KB2

Ob izpostavitvi celic MDA-kb2 agonistom AR ali GR se aktivirata AR ali GR, ki delujeta kot transkripcijska faktorja in se vežeta na MMTV promotorsko zaporedje. Slednje sproži aktivacijo gena za encim luciferazo, ki sledi MMTV promotorskemu zaporedju. V celici tako nastaja encim luciferaza, ki katalizira reakcijo oksidacije reagenta luciferina v oksiluciferin. Reakcija poteka le v živih metabolno aktivnih celicah, saj sta kot kofaktorja oksidacije potrebna magnezijev ion in ATP, ki nastaja le v živih celicah. Potek reakcije oksidacije je dvostopenjski in analogen naravni reakciji bioiluminiscence v navadni vzhodni kresnički. Luciferin reagira z ATP in  $Mg^{2+}$  do nastanka intermedijata luciferil-adenilata, le-

ta pa reagira s kisikom do oksiluciferina. V reakciji nastanejo še adenzil monofosfat (AMP), pirofosfatni anion (PPi), ogljikov dioksid in svetloba, ki jo izmerimo s čitalcem mikrotitrskih plošč. Nastala svetloba je proporcionalna aktivaciji encima luciferaze, kar pomeni, da lahko izmerjeno luminiscenco uporabimo kot merilo za aktivacijo AR oz. GR (32).



Slika 7: Reakcija oksidacije luciferina do bioiluminiscentnega oksiluciferina, ki se dogaja tudi v žuželkah npr. kresnički (32).

Testno metodo smo uporabili za določanje agonističnega in antagonističnega delovanja izbranih preiskovanih spojin na AR in GR. Testirali smo spojine KZH-137, KZH-165 in KZH-196 v koncentraciji 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,001  $\mu$ M in 0,0001  $\mu$ M. Spojino KZH-190, za katero se je izkazalo, da je citotoksična nad koncentracijo 25  $\mu$ M, smo testirali v koncentraciji 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,001  $\mu$ M in 0,0001  $\mu$ M. Kot negativno kontrolo smo uporabili 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju, kot kontrolni slepi vzorec pa gojitveni medij, brez celic. Uporabili smo tudi pozitivne kontrole: DHT kot agonist na AR, FLUT kot antagonist na AR, HC kot agonist na GR in RU-486 kot antagonist na GR, katerih testirane koncentracije so prikazane v preglednici VII v poglavju Priprava vzorcev testiranih spojin (3.1.1.1.). Luciferaznega testa smo se poslužili, saj poleg tega, da omogoča identifikacijo tako agonistov kot antagonistov na AR in GR, nudi visoko občutljivost testa in hitro pridobitev rezultatov.

Za luciferazni test na celični liniji MDA-kb2 smo 100  $\mu$ L celične suspenzije nasadili v luknje dveh mikrotitrskih plošč Lumitrac 600. Prazne smo pustili luknje, ki nam bodo služile kot slepi vzorec. Za slepi vzorec smo uporabili 200  $\mu$ L gojitvenega medija. Naslednji dan smo celice tretirali z izbranimi PXR antagonisti.

Za testiranje agonističnega učinka na AR smo v luknje najprej odpipetirali 50  $\mu$ L 200 nM RU-486, za določanje agonističnega učinka na GR pa 50  $\mu$ L 10  $\mu$ M FLUT. Nato smo celice inkubirali 30 minut v inkubatorju pri 37 °C brez dodanega CO<sub>2</sub>. V tem času RU-486 zasede GR in omogoči določanje agonističnega učinka le na AR; FLUT pa zasede AR in nam tako omogoči določanje učinka le na GR. Po inkubaciji na mikrotitrsko ploščo odpipetiramo 50  $\mu$ L raztopine izbrane spojine. Za določanje antagonističnega učinka na AR in GR smo v luknje najprej odpipetirali 50  $\mu$ L preiskovane spojine in celice inkubirali 30 minut. Za

testiranje antagonističnega učinka na AR smo po končani inkubaciji v luknje odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  1 nM DHT, za testiranje antagonističnega učinka na GR pa 50  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{M}$  HC. Glede na zmanjšani učinek DHT smo določili antagonistični učinek preiskovane spojine na AR. Antagonistični učinek preiskovane spojine na GR smo določili glede na zmanjšan učinek HC. Pripravili smo tudi kontrolni vzorec (100  $\mu\text{L}$  0,1 % DMSO v mediju).

Po 24-urni inkubaciji celic v inkubatorju pri 37 °C brez CO<sub>2</sub> smo celice lizirali. Naprej smo z avtomatsko multikanalno pipeto odpipetirali gojitveni medij in ga zavrgli. Nato smo celice sprali z 100  $\mu\text{L}$  PBS. Celice smo lizirali z dodatkom 20  $\mu\text{L}$  lizirnega pufra (Reporter Lysis 1X Buffer) v vsako luknjo in z izpostavitvijo nizkim temperaturam za en dan (-80 °C). Z uničenjem celične stene so celice sprostile svojo vsebino, v kateri se nahaja tudi encim luciferaza. Nadaljnje smo v vsako luknjo odpipetirali 35  $\mu\text{L}$  predhodno pripravljenega reagenta za luciferazni test. To smo naredili z avtomatsko multikanalno pipeto čim hitreje in v temi, saj luciferazni reagent na svetlobi s časom hitro razpada. Nazadnje smo s čitalcem mikrotitrskih plošč pomerili luminiscenco pri občutljivosti 135 in intervalu 1 sekunda.

### 3.2.3.2. LUCIFERAZNI TEST NA CELIČNI LINIJI GH3.TRE-Luc

Princip teste metode je enak kot na celični liniji MDA-kb2, saj tudi celice GH3.TRE-Luc ob izpostavitvi agonistu na TR proizvajajo encim luciferazo. Encim luciferaza katalizira reakcijo luciferina do oksiluciferina, ki je prikazana v poglavju Luciferazni test na celični liniji MDA-kb2 (4.2.3.1.) na sliki 7. Izmerjena luminiscenca je proporcionalna aktivaciji TR, ki jo sprožijo agonisti TR.

Na agonistično delovanje na TR smo spojine KZH-137, KZH-165 in KZH-196 testirali v koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,001  $\mu\text{M}$ , spojino KZH-190 pa v koncentracijah 50  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$  in 0,001  $\mu\text{M}$ . Kot pozitivno kontrolo smo uporabili znan agonist na TR T3 v koncentracijah 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,001  $\mu\text{M}$ , 0,0005  $\mu\text{M}$ , 0,00025  $\mu\text{M}$ , 0,0001  $\mu\text{M}$ , 0,00005  $\mu\text{M}$  in 0,00001  $\mu\text{M}$ . Na antagonistično delovanje na TR smo testirali koncentracije spojin, ki so pol manjše od testiranih koncentracij za agonistično delovanje na TR. Kot kontrolo antagonističnega delovanja na TR smo uporabili znan antagonist na TR BPA v koncentracijah 100  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  in 0,01  $\mu\text{M}$ . Za negativno kontrolo, ki nima učinka na celice in služi kot vrednost 1, smo uporabili 0,1 % DMSO v PMC mediju. Kot slepi vzorec (vzorec topila) pa nam služi PMC medij brez celic.

Luciferazni test na celični liniji GH3.TRE-Luc smo izvedli takoj po končanju testa živosti celic z rezozurinom na istih mikrotitrskih ploščah. Najprej smo odpipetirali stran PMC medij in ga zavrgli. Celice v luknjah smo sprali s 100  $\mu$ L PBS in izvedli lizo celic z dodatkom 20  $\mu$ L RLB lizirnega pufra in jih za en dan zmrznili na -80 °C. Tako so celice sprostile svojo vsebino, kjer se nahaja tudi encim luciferaza. Nato smo v luknje mikrotitrške plošče z avtomatsko multikanalno pipeto odpipetirali 35  $\mu$ L predhodno pripravljenega reagenta za luciferazni test. To smo naredili v temi, saj reagent za luciferazni test na svetlobi hitro razpada. Za konec pomerimo luminiscenco s čitalcem mikrotitrskih plošč pri občutljivosti 135 in intervalu 1 sekunde.

### 3.2.4. ANALIZA PODATKOV

Rezultate meritev preživetja celic in odzivov na AR, GR in TR smo obdelali s programom Microsoft Excel. Vsako koncentracijo spojine smo testirali v najmanj treh ponovitvah. Za vsak rezultat smo izračunali tudi standardno deviacijo. Nekatere spojine, ki so izzvale odziv na AR in GR, smo tudi ponovno testirali na novi pasaži celic.

Na celični liniji MDA-kb2 smo za ugotovitev citotoksičnosti spojin izvedli MTS test. Na celični liniji GH3-TRE.luc pa smo izvedli test živosti celic z resazurinom. Izračunavanje je pri obeh potekalo podobno. Od pridobljenih rezultatov meritev za posamezne spojine smo odšteli povprečno slepo vrednost (medij, brez celic) in izračunali povprečne vrednosti meritev. Le-te smo normirali glede na povprečno kontrolno vrednost (0,1 % DMSO v mediju), ki predstavlja 100 % preživetje celic. Izračunali smo tudi standardno deviacijo. Mejo citotoksičnosti spojine smo si izbrali pri 80 % metabolno aktivnosti celic glede na kontrolo. Dobljene vrednosti smo obdelali z dvostranskim Studentovim T-testom, kjer smo izbrali 5 % stopnjo tveganja ( $\alpha=0,05$ ). Odstopanje od kontrole je bilo torej statistično značilno, kadar je verjetnost, da sta si rezultata testiranih spojin in kontrole enaka, manjša kot 5 %. Za lažjo predstavbo smo rezultate prikazali v obliki histograma.

Test luciferaze na obeh celičnih linijah poteka podobno, zato tudi analiza podatkov poteka podobno. Vsako koncentracijo spojine smo testirali v treh paralelah. Od rezultatov meritev luminiscence smo odšteli slepo vrednost (medij, brez celic) in izračunali povprečje. Rezultat smo normirali glede na povprečno vrednost kontrole (0,1 % DMSO v mediju). Ob vseh vrednostih smo izračunali tudi standardno deviacijo, dobljene vrednosti pa smo obdelali z

dvostranskim Studentovim T-testom, kjer smo si izbrali stopnjo tveganja 5 % (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ). V primerih testiranja agonističnega delovanja na GR, AR in TR 0,1% DMSO v mediju predstavlja negativno kontrolo, kjer ni odziva celic. Pri testiranju antagonističnega delovanja pa 0,1 % DMSO v mediju dodamo tudi natančno določeno količino znanega agonista, zato kontrola predstavlja 100 % odziv celic. Pri celični liniji GH3.TRE-Luc, kjer imamo ob vsaki testirani koncentraciji spojine tudi znane podatke o živosti celic, smo rezultate antagonističnega delovanja na TR preračunali na 100 % preživetje celic.

Rezultate smo obdelali v programu GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ZDA), s katerim smo izdelali tudi grafe učinka v odvisnosti od koncentracije spojine. Tako smo določili  $EC_{50}$  oz.  $IC_{50}$  vrednosti za posamezne spojine, kjer je bilo vrednosti mogoče izračunati.  $EC_{50}$  vrednost predstavlja koncentracijo, pri kateri posamezna spojina izzove 50 % maksimalnega učinka. Vrednost  $IC_{50}$  pa predstavlja koncentracijo posamezne spojine, ki izzove 50 % inhibicijo dodanega izbranega agonista. Rezultate smo prikazali tudi s histogramom, ki prikazuje N-kratno spremembo aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Na koncu smo izračunali še indeks selektivnosti, s katerim primerjamo učinek delovanja antagonistov PXR na testirane receptorje v primerjavi z delovanjem na PXR. Za spojino KZH-137 smo indeks selektivnosti izračunali z deljenjem  $IC_{50}$  vrednosti na AR ali GR z  $IC_{50}$  vrednostjo na PXR ( $IC_{50\ AR}$  ali  $GR/IC_{50\ PXR}$ ). Za ostale testirane spojine, ki nimajo znanih  $IC_{50}$  vrednosti na PXR, indeksa selektivnosti nismo mogli izračunati, zato smo za primerjavo delovanja spojin na PXR in testirane receptorje primerjali najnižjo koncentracijo, pri kateri spojina učinkuje na testirane receptorje oziroma PXR.

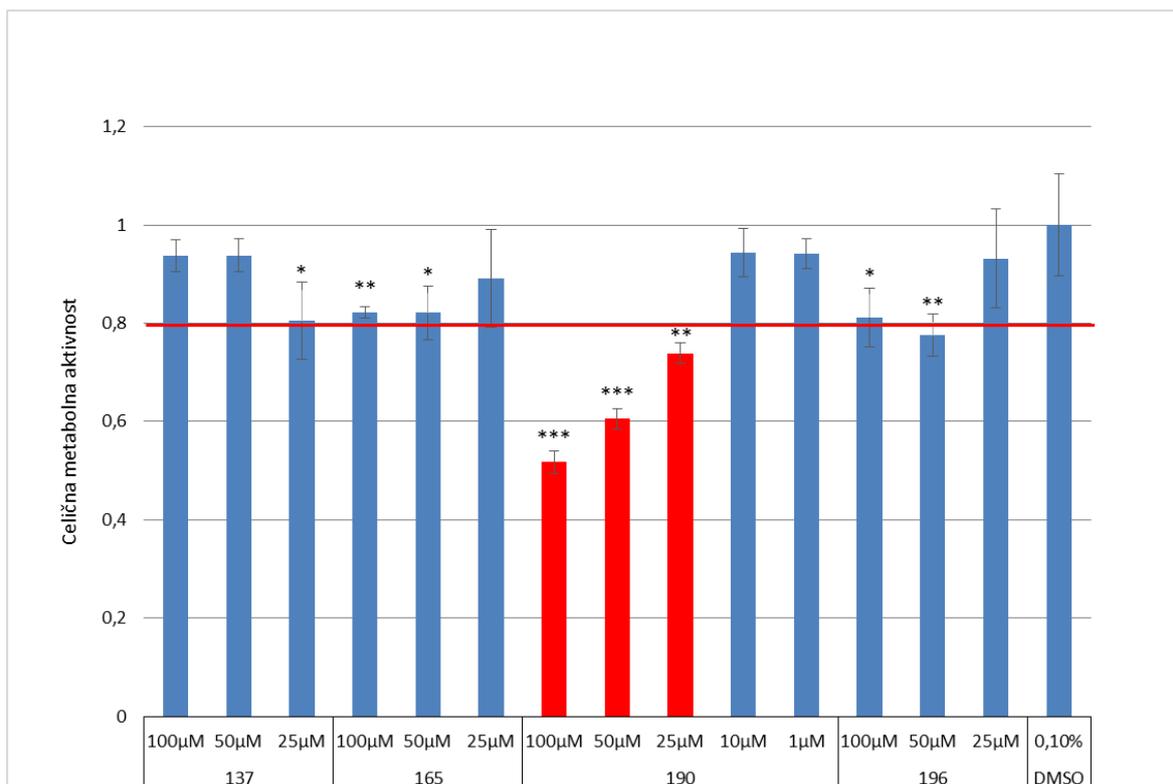
## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. TEST CITOTOKSIČNOSTI

Spojinam KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 smo najprej določili najvišjo necitotoksično koncentracijo, ki smo jo uporabili za nadaljnje poskuse. To je najvišja koncentracija raztopine testirane spojine, pri kateri je živost celic večja od postavljene meje. Mejo citotoksičnosti smo si postavili pri 80 % preživelih celic po 24-urni izpostavitvi testiranim spojinam glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Za testiranje citotoksičnosti na celicah MDA-kb2 smo uporabili MTS test, ki je opisan v poglavju MTS test (3.2.2.1.), za testiranje citotoksičnosti na celicah GH3.TRE-Luc pa test živosti celic z resazurinom (3.2.2.2.).

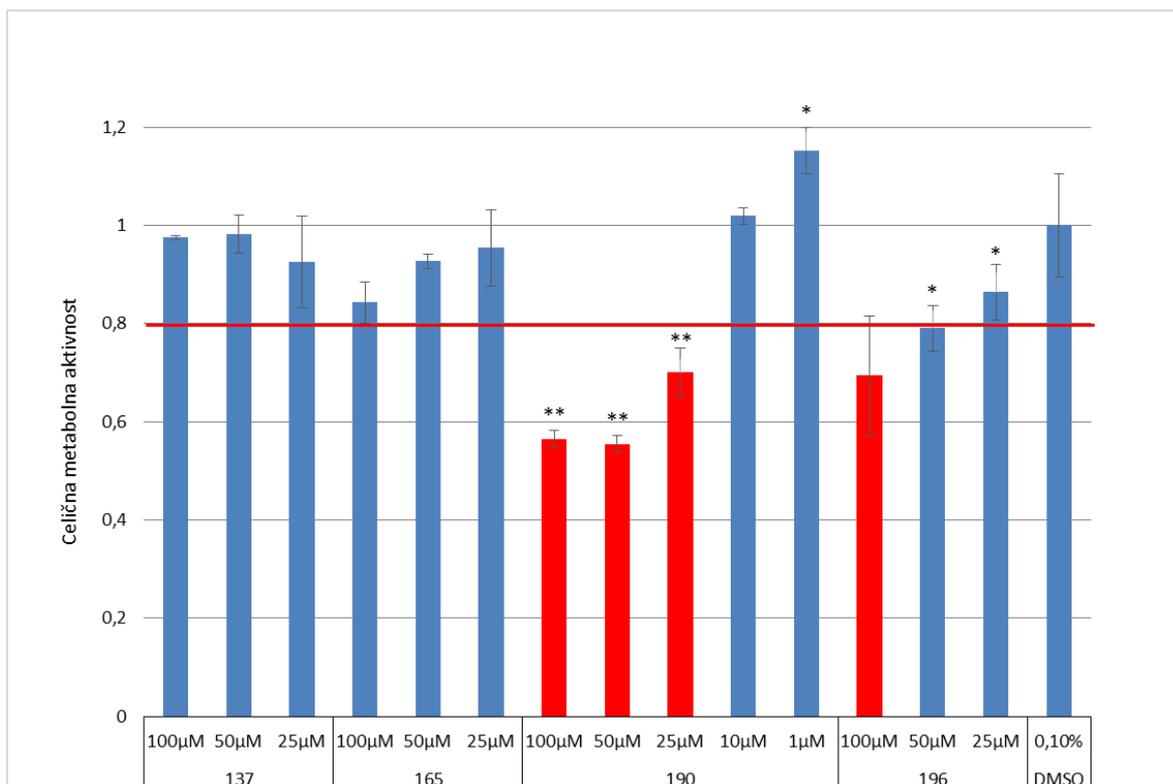
#### 4.1.1. REZULTATI MTS TESTA

Z MTS testom smo izbrane spojine testirali na citotoksičnost selektivno za agonistično in antagonistično delovanje na AR, ter selektivno za agonistično in antagonistično delovanje na GR. Testirali smo 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  in 25  $\mu\text{M}$  koncentracije raztopin, ki smo jih pripravili po postopku, opisanem v poglavju Priprava vzorcev testiranih spojin (3.1.1.1.). Spojino KZH-190, ki se je v prvem poizkusu izkazala za citotoksično pri koncentracijah 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  in 25  $\mu\text{M}$ , smo testirali še v koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  in 1  $\mu\text{M}$ . Rezultate testiranja smo prikazali v obliki histogramov (Slike 8, 9, 10, 11) ter določene najvišje necitotoksične koncentracije zapisali v preglednici X.



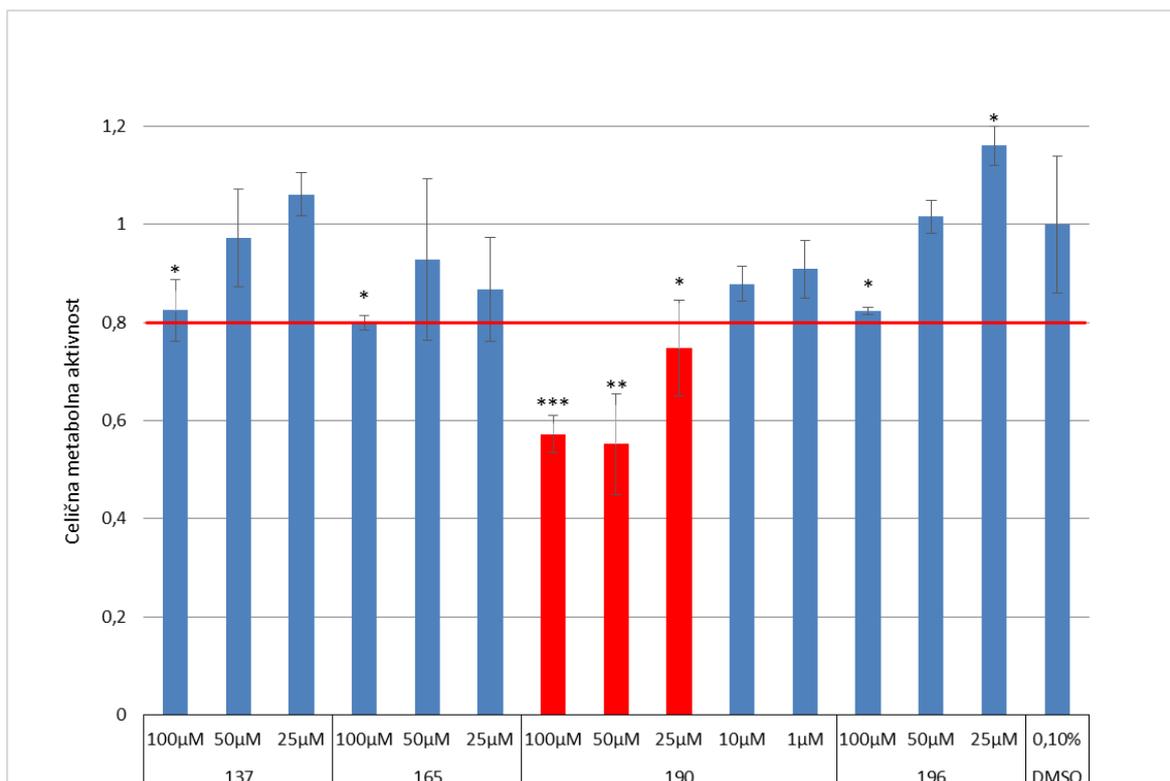
Slika 8: Rezultati MTS testa za agonizem na AR. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Histogram na sliki 8 predstavlja rezultate MTS testa za agonizem na AR, ki so prikazani s povprečno vrednostjo meritev treh paralel testa MTS za vsako spojino in pripadajočimi standardnimi deviacijami. Absorbanca je bila izmerjena 24 ur po izpostavitvi celicam testiranim spojinam in antagonistu RU-486 v koncentraciji 100 nM, ki zasede GR. Vrednosti celične metabolne aktivnosti smo preračunali iz vrednosti izmerjene absorbance formazana, nastalega v celicah, testiranih z izbranimi spojinami, glede na povprečno izmerjeno absorbanco formazana, nastalega v vzorcu celic tretiranih s kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Kontrola 0,1 % DMSO predstavlja vrednost 1 oz. 100 % celično metabolno aktivnost. Mejna vrednost, 80 % celične metabolne aktivnosti, je označena z rdečo črto. Stolpci, ki so obarvani z rdečo, ne dosežajo mejne celične metabolne aktivnosti. Iz histograma na sliki 8 smo tako razbrali najvišje necitotoksične koncentracije posameznih spojin za agonistično delovanje na AR, to so 100 μM za spojine KZH-137, KZH-165 in KZH-196, ter 10 μM za spojino KZH-190. KZH-190, ki se je izkazala za bolj citotoksično od ostalih spojin ima najdaljši substituent na dušiku indolnega obroča izmed testiranih spojin, kar bi lahko bil razlog za večjo citotoksičnost spojine KZH-190.



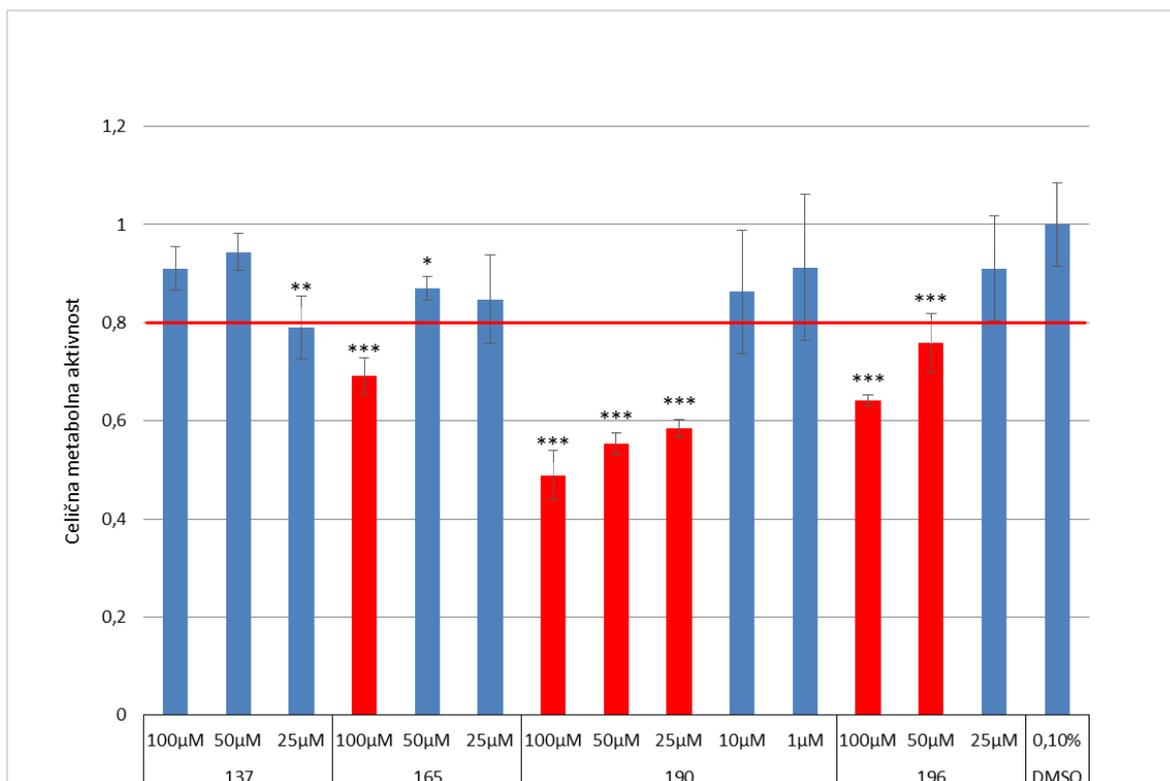
Slika 9: Rezultati MTS testa za antagonizem na AR. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Histogram na sliki 9 predstavlja rezultate MTS testa za antagonizem na AR, ki so prikazani s povprečno vrednostjo meritev treh paralel testa MTS za vsako spojino in pripadajočimi standardnimi deviacijami. Najvišje necitotoksične koncentracije posameznih spojin za antagonistično delovanje na AR, ki smo jih razbrali iz histograma na sliki 9, so naslednje: 100 μM za spojini KZH-137, KZH-165, 50 μM za spojino KZH-196 ter 10 μM za spojino KZH-190. KZH-190 se je ponovno izkazala za bolj citotoksično od ostalih spojin, razlog za večjo citotoksičnost spojine bi lahko bil daljši substituent na dušiku indolnega obroča. Tudi spojina KZH-196, ki je po strukturi najbolj podobna spojini KZH-190, je izkazala citotoksične lastnosti pri najvišji testirani koncentraciji 100 μM.



Slika 10: Rezultati MTS testa za agonizem na GR. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Iz histograma na sliki 10, ki prikazuje rezultate MTS testa za agonistično delovanje na GR, smo razbrali najvišje necitotoksične koncentracije posameznih spojin za agonistično delovanje na GR. Za spojini KZH-137 in KZH-165 znaša najvišja necitotoksična koncentracija 100 μM, za spojino KZH-196 le-ta znaša 50 μM ter 10 μM za spojino KZH-190. Rezultati MTS testa za agonizem na GR so zelo podobni rezultatom MTS testa za agonizem na AR. KZH-190 se je ponovno izkazala za bolj citotoksično od ostalih spojin, razlog za večjo citotoksičnost spojine je lahko bil daljši substituent na dušiku indolnega obroča, za razliko od substituentov pri ostalih testiranih spojinah.



Slika 11: Rezultati MTS testa za antagonizem na GR. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Iz histograma na sliki 11 smo določili najvišje necitotoksične koncentracije posameznih spojin za antagonistično delovanje na GR, ki znašajo 100 μM za spojino KZH-137; 50 μM za spojino KZH-165; 25 μM za spojino KZH-196 in 10 μM za spojino KZH-190. Za najmanj citotoksično se je izkazala spojina KZH-137, ki za razliko od ostalih testiranih spojin v svoji strukturi ne vsebuje substituenta na dušiku indolnega obroča. KZH-190 se je ponovno izkazala za najbolj citotoksično izmed testiranih spojin, razlog bi lahko bil najdaljši substituent na dušiku indolnega obroča izmed testiranih spojin. Tudi spojina KZH-196, ki je izmed testiranih spojin po strukturi najbolj podobna spojini KZH-190, se je izkazala bolj citotoksično od spojine KZH-165, ki ima na dušiku indolnega obroča fenolni substituent.

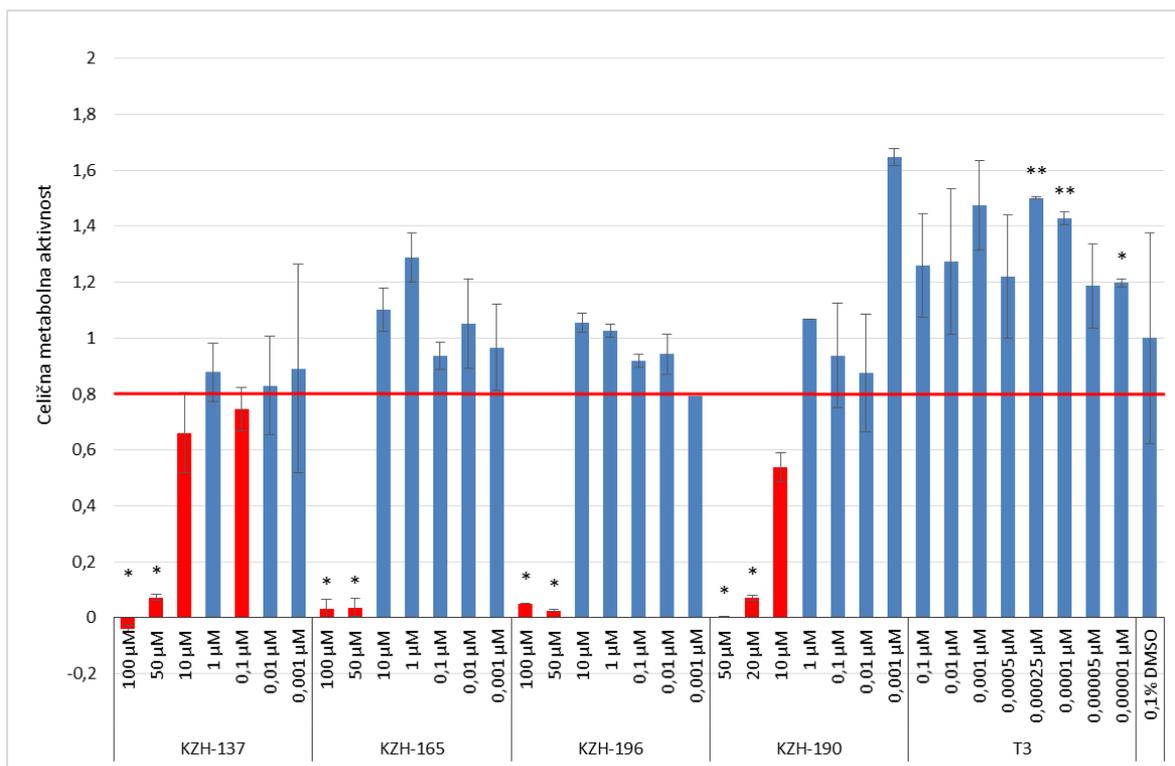
Iz histogramov določene najvišje necitotoksične koncentracije na celični liniji MDA-kb2 za posamezne spojine, smo prikazali v preglednici X. Najvišje necitotoksične koncentracije vsake spojine se razlikujejo glede na agonistično in antagonistično delovanje na AR in GR. Mejo citotoksičnosti spojin, določeno z MTS testom, smo upoštevali pri nadaljnjih poskusih učinkovanja spojin na AR in GR ter interpretaciji rezultatov.

Preglednica X: Najvišje necitotoksične koncentracije na celični liniji MDA-kb2

<i>DELOVANJE</i>		<i>KZH-137</i>	<i>KZH-165</i>	<i>KZH-190</i>	<i>KZH-196</i>
<i>AR</i>	agonizem	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
	antagonizem	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M
<i>GR</i>	agonizem	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
	antagonizem	100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M

#### 4.1.2. REZULTAT TESTA CITOTOKSIČNOSTI Z RESAZURINOM

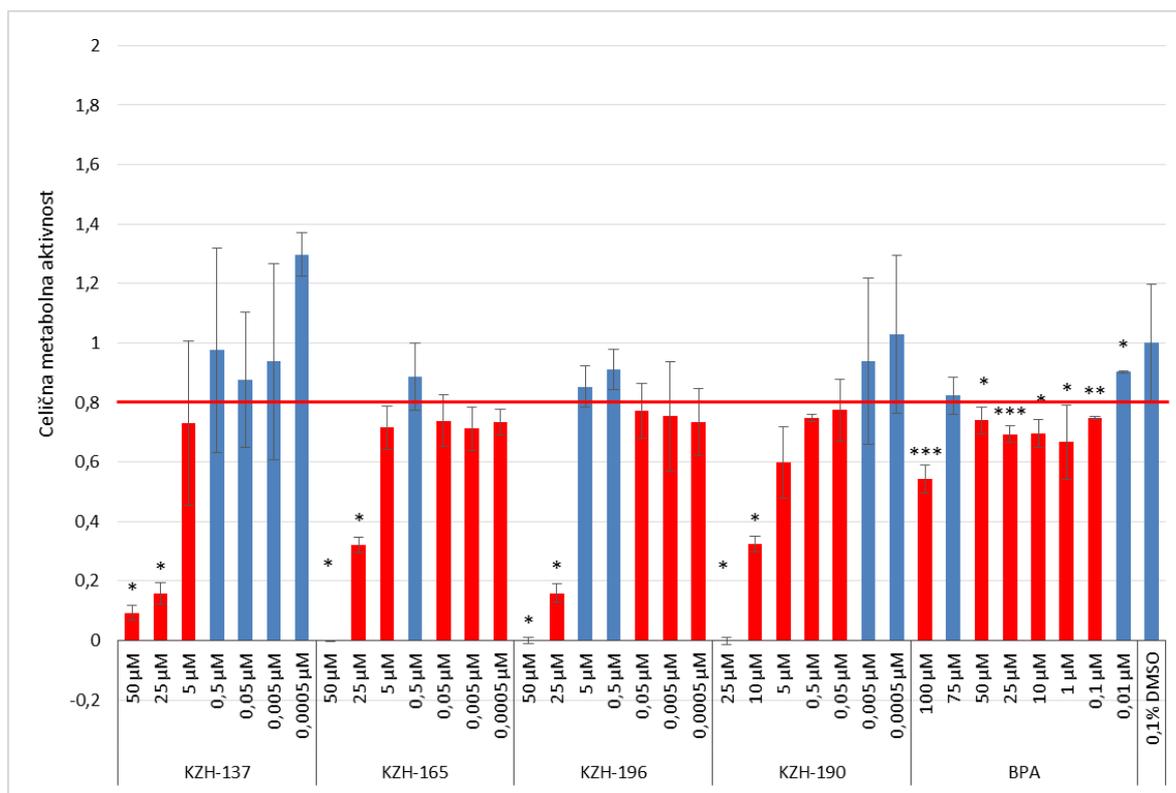
Citotoksičnost na celicah GH3.TRE-Luc smo testirali s testom živosti celic z resazurinom selektivno za agonistično in antagonistično delovanje na TR. Celice smo izpostavili testiranim spojinam ter po 24 urah izvedli test živosti celic z resazurinom in izmerili fluorescenco pri celicah. Testirane koncentracije posameznih spojin so razvidne iz preglednice V v poglavju Priprava vzorcev testiranih spojin (3.1.1.1.). Rezultate celične metabolne aktivnosti smo pridobili s primerjanjem izmerjene fluorescence pri celicah, tretiranih s testirano spojino, z izmerjeno fluorescenco pri kontrolnem vzorcu (0,1 % DMSO v PMC mediju), ki predstavlja vrednost 1 oz. 100 % celično metabolno aktivnost. Natančen opis pridobitev rezultatov je opisan v poglavju Analiza rezultatov (3.2.4.). Za lažjo predstavbo smo rezultate predstavili v obliki histograma na sliki 12 in 13. Mejno vrednost smo določili pri 80 % celične metabolne aktivnosti, enako kot pri MTS testu, in stolpce, ki ne dosegajo postavljene mejne vrednosti celične metabolne aktivnosti, na histogramu obarvali z rdečo.



Slika 12: Rezultati testa živosti celic z resazurinom za agonistično delovanje na TR. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Na histogramu na sliki 12 vidimo rezultate testa živosti celic z resazurinom za agonistično delovanje na TR, ki so prikazani s povprečno vrednostjo meritev treh paralel testa za vsako spojino in s pripadajočimi standardnimi deviacijami. Iz histograma lahko razberemo, da v začetnih testiranih koncentracijah vse 4 testirane spojine izkazujejo izrazite citotoksične lastnosti. Koncentraciji 100 µM in 50 µM spojin KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 sta toksični za tudi več kot 90 % vseh celic, pri spojini KZH-190 je tako močno toksična tudi koncentracija 20 µM. To smo zaradi barve opazili že med samim testiranjem, zato smo omenjene koncentracije izločili iz nadaljnega testiranja aktivnosti na TR. Določili smo naslednje najvišje necitotoksične koncentracije za vsako testirano spojino: 10 µM za spojini KZH-165 in KZH-196, ter 1 µM za spojini KZH-190 in KZH-137. Opazili smo, da so določene najvišje necitotoksične koncentracije na celični liniji GH3.TRE-Luc veliko nižje (tudi do 100-krat), kot tiste, določene na celični liniji MDA-kb2. Tudi na celični liniji GH3.TRE-Luc pa se je za bolj citotoksično izmed spojin izkazala spojina KZH-190, ki ima izmed testiranih spojin v strukturi najdaljši lipofilni substituent na dušiku indolnega obroča,

a v isti meri je citotoksičnost izkazala tudi spojina KZH-137, ki substituenta na dušiku indolnega obroča nima.



Slika 13: Rezultati testa živosti celic z resazurinom za antagonistično delovanje na TR. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Iz histograma na sliki 13, ki prikazuje rezultate testa živosti celic z resazurinom za antagonistično delovanje na TR, smo opazili večjo citotoksičnost spojin, v primerjavi z agonističnem delovanjem na TR. Določili smo najvišje necitotoksične koncentracije za vsako testirano spojino: 0,5 µM za spojini KZH-137 in KZH-165; 5 µM za spojino KZH-196 ter 0,005 µM za spojino KZH-190. Izmed določenih necitotoksičnih koncentracij je spojina KZH-190 ponovno tista z najnižjo določeno, kar pomeni večjo citotoksičnost od ostalih testiranih spojin. Tudi rezultati kontrolnega vzorca z antagonistom BPA so nižji od postavljene meje metabolične aktivnosti celic pri 0,8. Prvo necitotoksično koncentracijo smo opazili šele pri zadnji testirani koncentraciji 0,01 µM. Ker je velika večina testiranih koncentracij spojin pod postavljeno mejo citotoksičnosti, smo rezultate pri nadaljnjem testiranju aktivnosti spojin na TR prilagodili dejanski živosti celic. Najvišji prvi dve začetni testirani koncentraciji pa smo že pred testiranjem aktivnosti na TR izločili iz nadaljnjih testov ter luciferaznega testa pri koncentracijah 50 µM in 25 µM nismo izvajali.

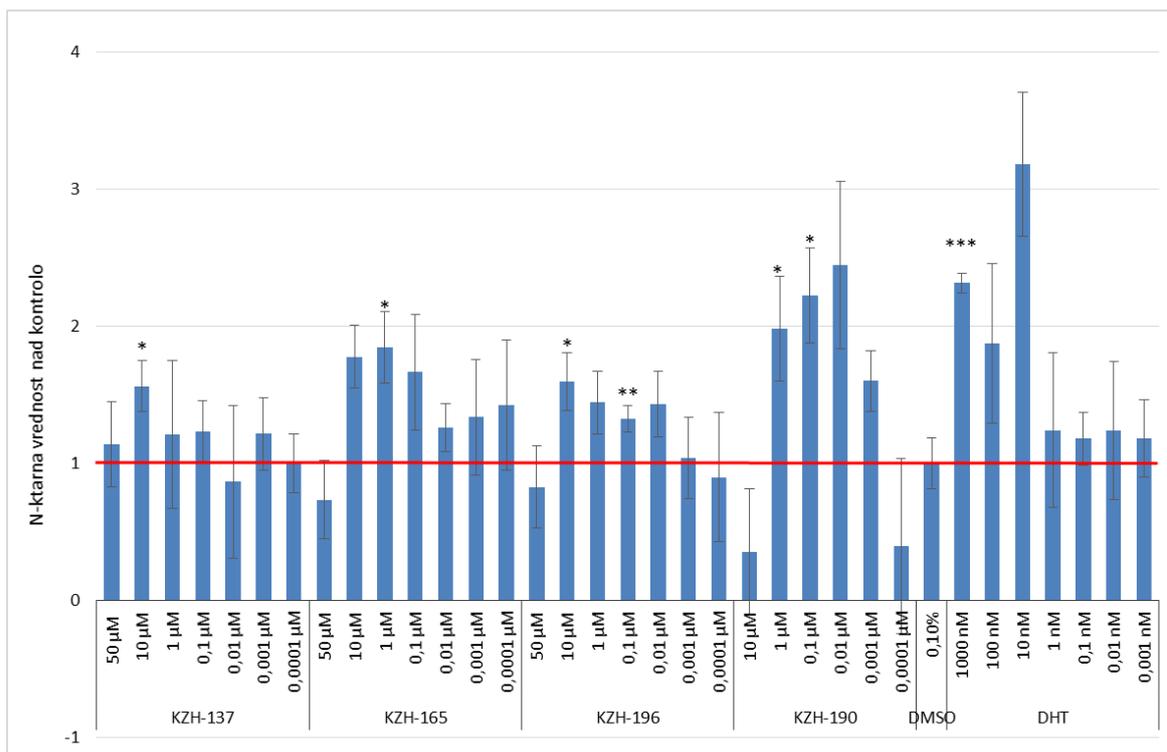
V preglednici XI smo zapisali iz histogramov na sliki 12 in 13 določene najvišje necitotoksične koncentracije na celični liniji GH3.TRE-Luc za posamezne spojine, ki se razlikujejo za agonistično in antagonistično delovanje na TR. Izsledke testa živosti celic z resazurinom smo upoštevali pri izvajanju luciferaznega testa, s katerim smo določali aktivnost spojin na TR.

Preglednica XI: Določene vrednosti najvišje necitotoksične koncentracije na celični liniji GH3.TRE-Luc

<i>DELOVANJE</i>		<i>KZH-137</i>	<i>KZH-165</i>	<i>KZH-196</i>	<i>KZH-190</i>
<i>TR</i>	agonizem	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
	antagonizem	0,5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	0,005 $\mu\text{M}$

## 4.2. DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA AR

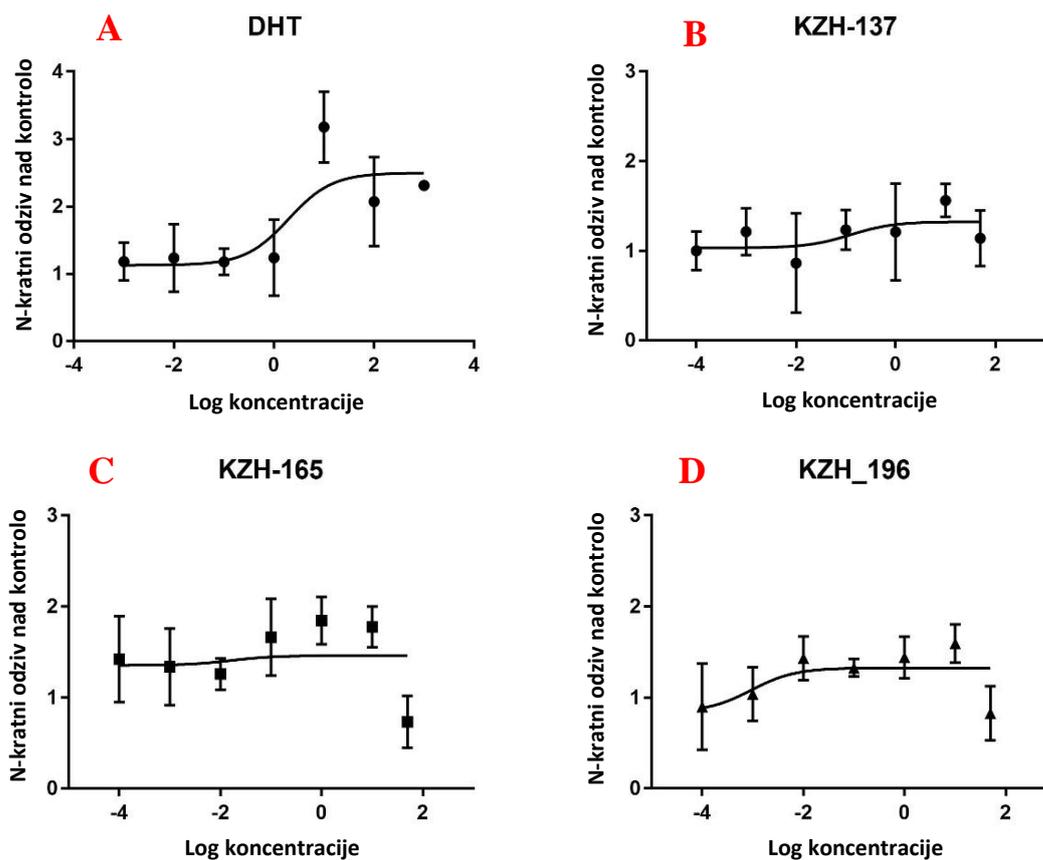
Spojinam KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 smo določali agonistično in antagonistično delovanje na AR na celični liniji MDA-kb2, ki sicer izraža poleg AR tudi GR. Pred dodatkom testnih spojin celicam smo celice 30 minut inkubirali s 100 nM RU-486, ki je antagonist GR, kar nam omogoči selektivno določanje agonističnega delovanja na AR. Selektivno antagonistično delovanje na AR smo določili glede na zmanjšanje učinka, dodanega DHT v koncentraciji 0,5 nM, ki ga celicam dodamo 30 minut po dodatku testnih spojin. Po 24-urni inkubaciji celic smo za določanje aktivnosti na AR uporabili luciferazni test po postopku, opisanem v poglavju Luciferazni test na celični liniji MDA-kb2 (3.2.3.1.). Od vrednosti meritev luciferaznega testa za posamezno spojino smo odšteli slepo vrednost medija, brez celic in rezultate vrednotili glede na negativno kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Oblikovali smo histogram, ki prikazuje N-kratno spremembo aktivnosti glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju z standardno deviacijo in naredili Studentov T-test z stopnjo zaupanja 5 % (\*:  $p < 0,5$ ; \*\*:  $p < 0,1$ ; \*\*\*:  $p < 0,01$ ). Na sliki 14 so prikazani rezultati testiranja agonističnega delovanja izbranih spojin na AR, na sliki 16 pa so rezultati testiranja antagonističnega delovanja izbranih spojin na AR.



Slika 14: Rezultati luciferaznega testa za agonistično delovanje spojin na AR, ki so prikazani kot N-kratna vrednost nad kontrolo s standardno deviacijo. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

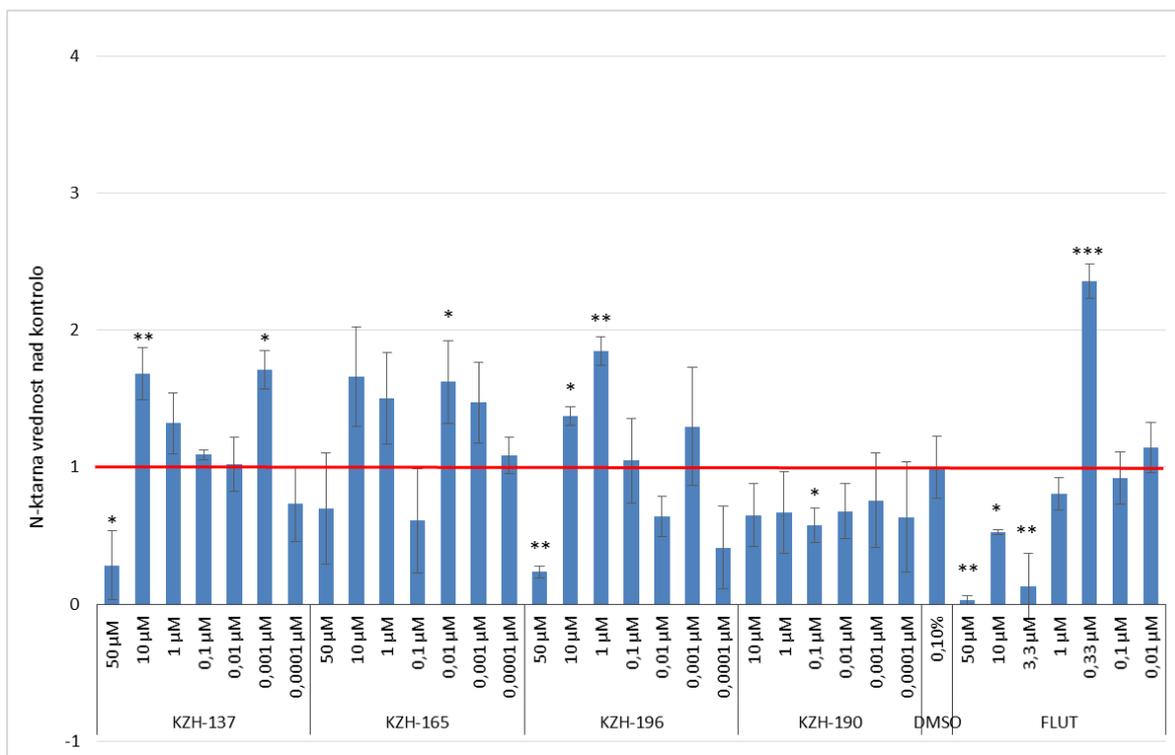
Kontrola 0,1 % DMSO v mediju predstavlja vrednost 1 oz. 0 % agonistične aktivnosti na AR, vizualno je na histogramu vrednost 1 prikazana z rdečo črto. Kot pozitivna kontrola, s katero smo se prepričali, da luciferazni test deluje, nam služi testiranje DHT, ki je znan agonist AR. Pri pozitivni kontroli smo opazili statistično značilno zvišanje nad kontrolo pri koncentraciji 1000 nM, zvišanje nad kontrolo pa je opazno tudi pri ostalih koncentracijah, največ za 3,18-kratno vrednost kontrole 0,1 % DMSO v mediju. Na histogramu na sliki 14 smo opazili zvišanje luciferazne aktivnosti nad kontrolo pri vseh 4 testiranih spojinah. Statistično značilno zvišanje nad kontrolo smo opazili pri koncentracijah 10 µM spojine KZH-137, 1 µM pri spojnini KZH-165, 10 µM in 0,1 µM pri spojnini KZH-196 ter 1 µM in 0,1 µM za KZH-190. Največ izmed testiranih spojin je aktivnost luciferaze zvišal vzorec spojine KZH-190 pri 0,01 µM koncentraciji, za 2,44-krat nad vrednost kontrole 0,1 % DMSO v mediju.

Rezultate za posamezne testirane spojine ter pozitivno kontrolo DHT smo prikazali tudi v grafični obliki na sliki 15, kjer je učinek funkcija logaritma koncentracije spojine, pri čemer smo uporabili programsko opremo GraphPad Prism 7.0.



Slika 15: Grafi prikazujejo agonistično učinkovanje spojin (A) DHT, (B) KZH-137, (C) KZH-165 (D) KZH-196 na AR glede na logaritem koncentracije (v  $\mu\text{M}$ , razen DHT v nM). Učinek je prikazan kot N-kratna sprememba vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolo 0,1 % DMSO v mediju.

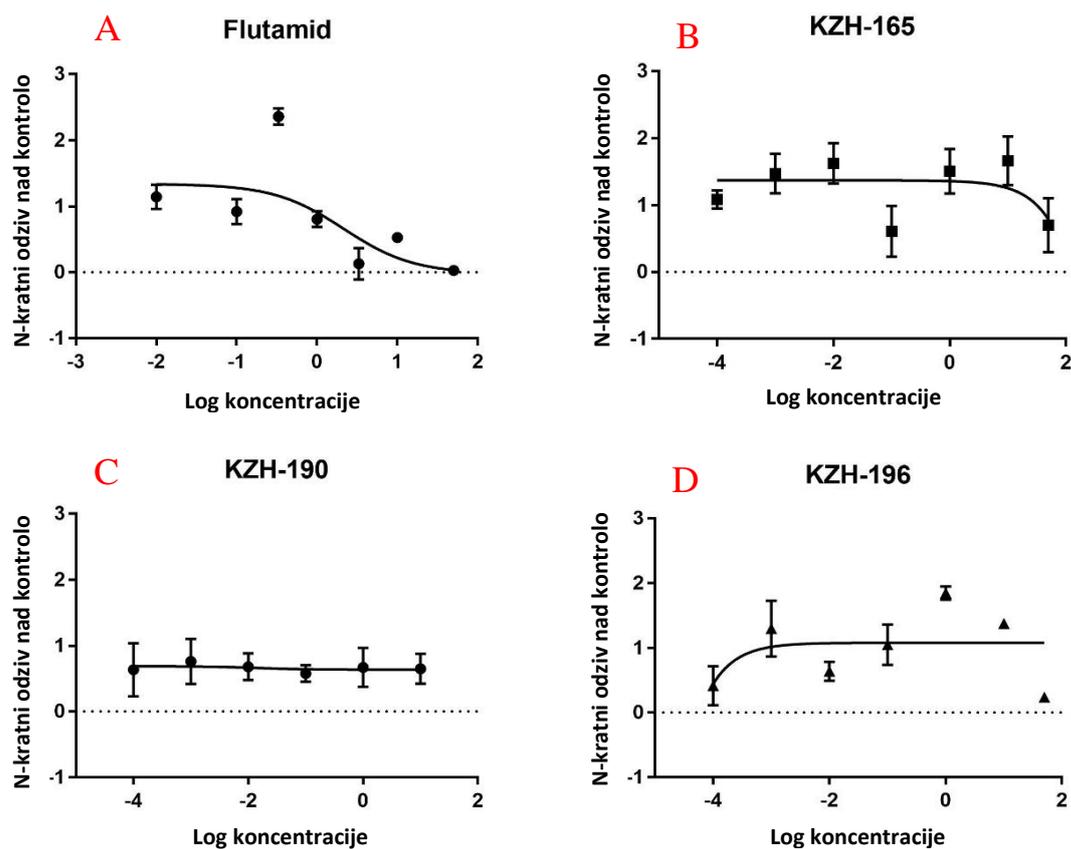
Na sliki 15 smo opazili, da spojine KZH-137, KZH-165 in KZH-196 ne izkazujejo tipične krivulje učinka v odvisnosti od koncentracije agonistov, krivulje naštetih spojin so namreč skoraj vodoravne. Tako iz krivulj za naštete spojine nismo mogli odčitati vrednosti  $EC_{50}$ . Prav tako za spojino KZH-190 ni bilo mogoče določiti vrednosti  $EC_{50}$  ter narisati grafa učinka glede na logaritem koncentracije spojine. Testirane spojine najverjetneje niso agonisti AR, a bi za potrditev rezultatov potrebovali vsaj 3 neodvisne biološke ponovitve testa. Iz grafa A za pozitivno kontrolo DHT smo opazili značilno krivuljo učinka v odvisnosti od koncentracije za agoniste in odčitali vrednost  $EC_{50}$  pri 1,958 nM. Literaturni podatki za vrednost  $EC_{50}$  DHT-ja se razlikujejo ter znašajo 0,5 nM (33) in 0,15 nM (34) za celično linijo MDA-kb2. Razlike lahko nastanejo zaradi drugačnih pogojev merjenja npr. gostote celic ter samega postopka merjenja luminiscence.



Slika 16: Rezultati luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin na AR, ki so prikazani kot N-kratna vrednost nad kontrolo s standardno deviacijo. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Na sliki 16 smo z rdečo črto prikazali vrednost 1 kontrole 0,1 % DMSO v mediju, ki predstavlja 100 % agonistične aktivnosti na AR. Kot pozitivna kontrola, s katero smo se prepričali, da luciferazni test deluje, nam služi testiranje FLUT znanega antagonista AR. Pri FLUT smo znižanje aktivnosti luciferaze glede na kontrolo opazili pri koncentracijah 50 μM, 10 μM, 3,3 μM in 1 μM, s statistično značilnim rezultatom pri 50 μM, 10 μM in 3,3 μM. Pri testiranih spojinah smo statistično znižanje glede na kontrolo opazili pri koncentraciji 50 μM spojine KZH-137 in KZH-196, ter koncentraciji 0,1 μM spojine KZH-190.

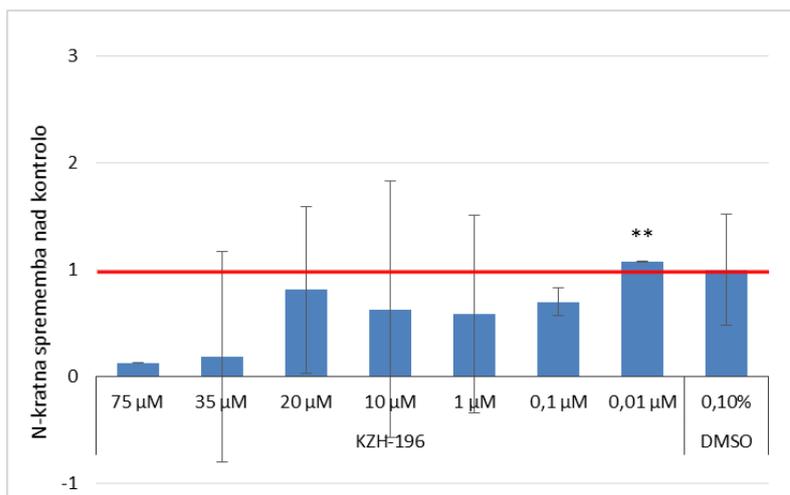
S programom GraphPad Prism 7.0 smo izdelali tudi grafe učinka glede na logaritem koncentracije spojin za testirane spojine in pozitivno kontrolo FLUT, ter jih prikazali na sliki 17. Za spojino KZH-137 s programom GraphPad Prism 7.0 grafa učinka v odvisnosti od logaritma koncentracije spojine ni bilo mogoče izdelati.



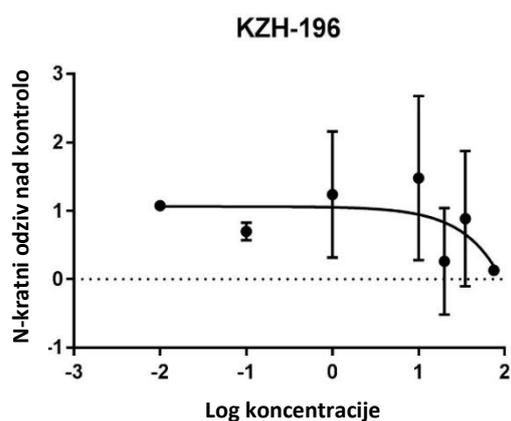
Slika 17: Grafi prikazujejo antagonistično učinkovanje spojin (A) FLUT, (B) KZH-165, (C) KZH-190, (D) KZH-196 na AR glede na logaritem koncentracije (v  $\mu\text{M}$ ). Učinek je prikazan kot N-kratna sprememba vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolo 0,1 % DMSO v mediju.

Za pozitivno kontrolo FLUT smo izdelali graf in izračunali  $\text{IC}_{50}$  vrednost 2,145  $\mu\text{M}$ , kar je podobno območje vrednosti  $\text{IC}_{50}$  kot v literaturi: 5  $\mu\text{M}$  (33) oz. 4,573  $\mu\text{M}$  (35). Iz grafa za spojine KZH-165, KZH-190 in KZH-196 nismo opazili značilnega učinka v odvisnosti od koncentracije za antagoniste. Iz narisanih grafov tako nismo mogli določiti  $\text{IC}_{50}$  vrednost testiranih spojin. Spojini KZH-137 in KZH-196 pri 50  $\mu\text{M}$  sicer statistično značilno znižata aktivnost luciferaze glede na kontrolo, zato bi bilo testiranje smiselno ponoviti še pri višji koncentraciji, ki pa ne sme biti citotoksična.

Ker so spojine KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 nove, svojih rezultatov nismo mogli primerjati z nobeno raziskavo. Da bi svoje izsledke potrdili, bi bilo potrebno narediti vsaj tri neodvisne biološke ponovitve testiranj. Odločili smo se, da spojine, ki so delovale najbolj potentno, ponovno testiramo po enakem postopku kot prvič. Ponovno smo testirali agonistično aktivnost spojine KZH-196 ter antagonistično delovanje obeh spojin, ki so izkazale statistično značilne rezultate pri 50  $\mu\text{M}$  koncentraciji (KZH-137 in KZH-196).

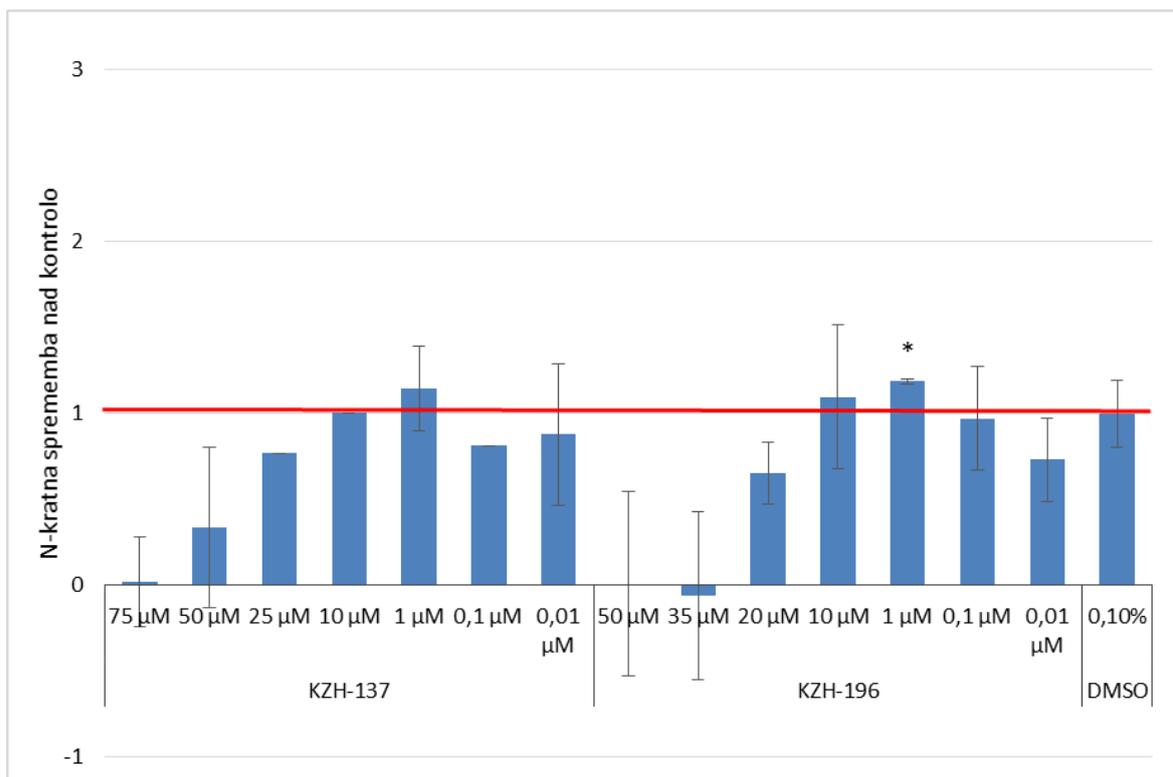


Slika 18: Rezultati ponovljenega luciferaznega testa za agonistično delovanje spojine KZH-196 na AR. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

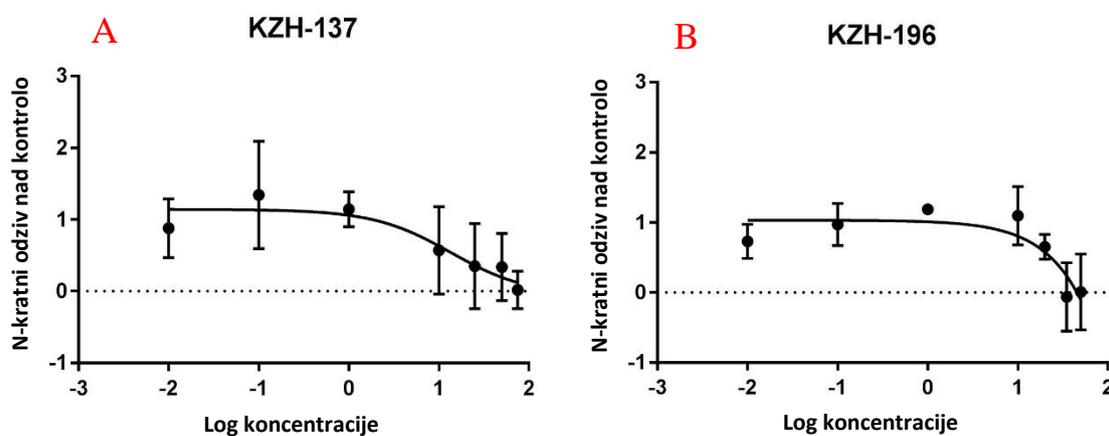


Slika 19: Graf prikazuje ponovno testiranje za agonistično učinkovanje spojine KZH-196 na AR. Učinek je prikazan kot N-kratna sprememba vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolo 0,1 % DMSO v mediju.

Na sliki 18 in 19 smo prikazali rezultate ponovnega testiranja spojine KZH-196. Pri koncentraciji 0,01 µM smo opazili manjše zvišanje aktivnosti luciferaze glede na kontrolo, ki je statistično značilno. A iz grafa na sliki 19 nismo opazili agonistične krivulje delovanja spojine KZH-196, velika pa je tudi standardna deviacija rezultatov pri posameznih koncentracijah. Želeli bi si več statistično značilnih rezultatov, za potrditev rezultatov pa bi potrebovali še tretjo biološko ponovitev testa.



Slika 20: Rezultati ponovljenega luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin KZH-137 in KZH-196 na AR. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).



Slika 21: Graf prikazuje ponovno testiranje za antagonistično učinkovanje spojine (A) KZH-137 in (B) KZH-196 na AR. Učinek je prikazan kot N-kratna sprememba vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolo 0,1 % DMSO v mediju.

Na sliki 20 in 21 smo prikazali izsledke ponovnega testiranja spojin KZH-137 in KZH-196. Spojino KZH-137 smo testirali pri višji koncentraciji kot v prejšnjem poizkusu, pri spojini KZH-196 pa to ni bilo možno, saj je testirana koncentracija 50 μM najvišja necitotoksična

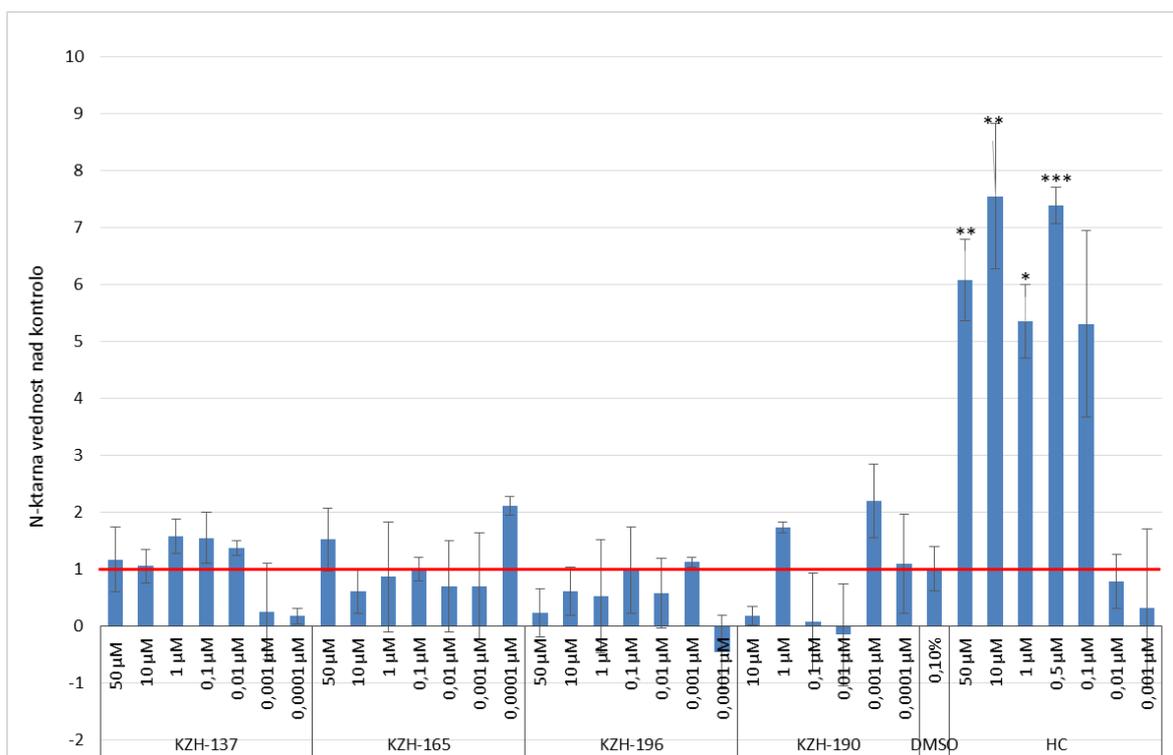
koncentracija. Spojini sta v prvih treh testiranih koncentracijah znižali aktivnost luciferaze glede na kontrolo. Vrednost  $IC_{50}$  za spojino KZH-137, ki ji v prvem poizkusu nismo mogli določiti  $IC_{50}$  vrednosti, tokrat znaša  $13,63 \mu M$ , a brez statistično značilnih rezultatov ne moremo biti prepričani v pravilnost rezultatov. Določena  $IC_{50}$  vrednost spojine KZH-137 je 6,4-krat večja od določene  $IC_{50}$  vrednosti FLUT v prvem poizkusu. Da primerjamo delovanje spojine KZH-137 na PXR ( $IC_{50 \text{ PXR}} = 11 \mu M$ ) in na AR smo delili  $IC_{50}$  vrednosti ( $IC_{50 \text{ AR}}/IC_{50 \text{ PXR}}$ ). Rezultat je indeks selektivnosti 1,239, ki pomeni slabo selektivnost delovanja spojine KZH-137 na PXR. Pri spojini KZH-196 iz grafa na sliki 21 ni bilo mogoče določiti  $IC_{50}$  vrednosti. Za potrditev teh izsledkov bi potrebovali še najmanj eno biološko ponovitev testiranja.

Glede na strukturo testiranih molekul smo sklepali, da testirane spojine lahko učinkujejo na AR. V strukturi namreč vsebujejo polarne hidroksilne skupine na obeh skrajnih koncih nepolarnega jedra molekule, kar so značilni strukturni elementi, pomembni za vezavo androgenih molekul na AR. Z našim poizkusom bistvenega agonističnega delovanja na AR nismo zasledili, medtem ko smo opazili antagonističen učinek spojine KZH-137, a se brez statistično značilnih rezultatov ne moremo prepričati o pravilnosti izsledkov. A v naši nalogi smo z *in vitro* metodo preverjali le vpliv antagonistov PXR direktno na AR, zaradi podobne strukture vezavnega žepa omenjenih jedrnih receptorjev.

Zaradi medsebojnega vpliva signalnih poti med PXR in AR pa lahko v organizmu pričakujemo tudi vpliv antagonistov PXR na androgeni sistem preko vpletenosti PXR v homeostazo androgenih hormonov. V Indiji so Kumar in njegovi sodelavci namreč odkrili, da zniževanje ravni izražanja PXR okrepi transkripcijsko aktivnost androgenih hormonov (36). Podobno temo je raziskoval tudi Zhang s sodelavci, ki je odkril, da genetska ali farmakološka aktivacija PXR zniža aktivnost androgenih hormonov. Na kastriranih miškah, ki so prejemale dnevne injekcije testosteron propionata, so opazili zavrto regeneracijo prostate, ki je odvisna od androgenih hormonov, preko povečanega izražanja encimov citokroma P450 in sulfotransferaze SULT(2A1). Našteta encima sta namreč odgovorna za presnovo androgenih hormonov v organizmu. Tako bi imela aktivacija PXR z agonisti veliko vlogo pri zdravljenju hormonsko odvisnega raka prostate (37). Zato menimo, da bodo potrebna nadaljnja testiranja novih učinkovin antagonistov PXR, da se opredeli vpliv modulacije PXR na AR v človeškem organizmu.

### 4.3. DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA GR

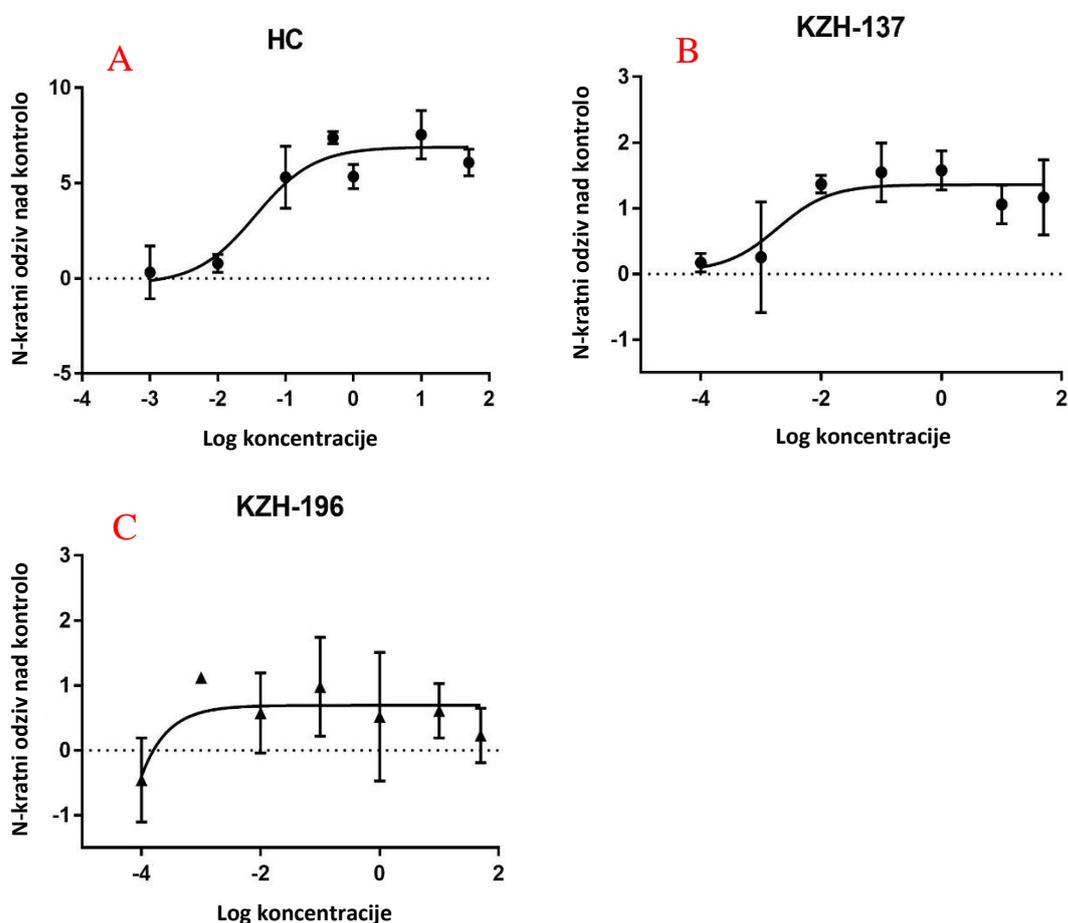
Delovanje spojin KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 na GR smo določali na celični liniji MDA-kb2, ki sicer izraža poleg GR tudi AR. Pred dodatkom testnih spojin celicam smo zato celice 30 minut inkubirali s 5  $\mu\text{M}$  FLUT, ki je antagonist AR, kar nam omogoči selektivno določanje agonističnega delovanja na GR. Antagonistično delovanje na GR smo določali glede na zmanjšanje učinka dodanega HC (agonista na GR) v koncentraciji 500 nM, ki ga celicam dodamo 30 minut po dodatku testnih spojin. Po 24-urni inkubaciji celic smo za določanje aktivnosti na GR uporabili luciferazni test po postopku, opisanem v poglavju Luciferazni test na celični liniji MDA-kb2 (3.2.3.1.). Od vrednosti meritev luciferaznega testa za posamezno spojino smo odšteli slepo vrednost medija, brez celic in rezultate normirali glede na negativno kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Rezultate smo prikazali v obliki histograma, ki prikazuje N-kratno spremembo aktivnosti glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Izračunali smo tudi standardno deviacijo in naredili Studentov T-test z stopnjo zaupanja 5 % (\*:  $p < 0,5$ ; \*\*:  $p < 0,1$ ; \*\*\*:  $p < 0,01$ ). Na sliki 22 so prikazani rezultati testiranja agonističnega delovanja izbranih spojin na GR, na sliki 24 pa so prikazani rezultati testiranja antagonističnega delovanja izbranih spojin na GR.



Slika 22: Rezultati luciferaznega testa za agonistično delovanje spojin na GR, ki so prikazani kot N-kratna vrednost nad kontrolo s standardno deviacijo. Na histogramu smo z zvezdicami označili

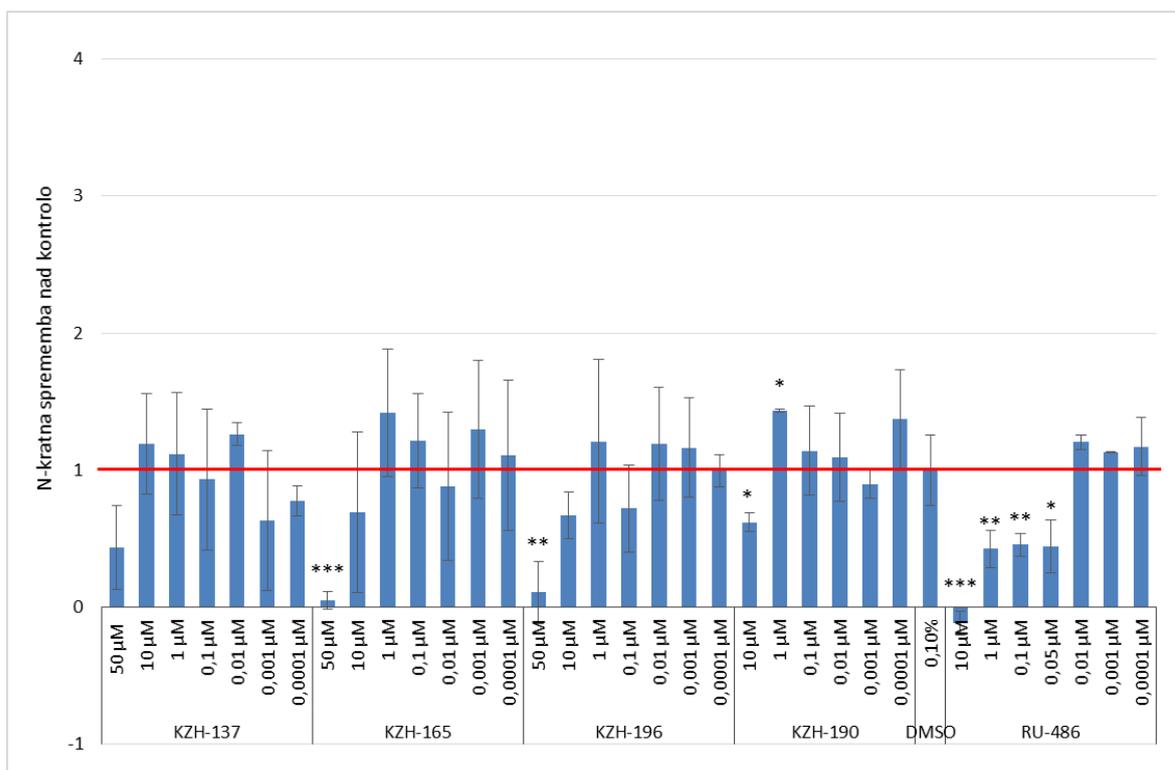
stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

S kontrolno rdečo črto smo označili vrednost 1 oz. 0 % agonistične aktivnosti na GR. Kot pozitivno kontrolo, s katero se prepričamo, da luciferazni test deluje, smo uporabili HC. HC deluje agonistično na GR, rezultati so statistično značilni pri koncentraciji 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M in 0,5  $\mu$ M. Največ, za 7,5-krat, se je povečala aktivnost luciferaze pri koncentraciji 10  $\mu$ M. Izmed ostalih testiranih spojin nismo opazili statističnega značilnega zvišanja rezultatov nad kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Največ izmed testiranih antagonistov PXR je luciferazno aktivnost nad kontrolo 0,1 % DMSO v mediju zvišala spojina KZH-190 pri koncentraciji 0,001  $\mu$ M. Z GraphPad Prism 7.0 smo izdelali grafe učinka v odvisnosti od logaritma koncentracije, ki smo jih prikazali na sliki 23 in izračunali EC<sub>50</sub> vrednosti.



Slika 23: Grafi prikazujejo agonistično učinkovanje spojin (A) HC, (B) KZH-137, (C) KZH-196 na GR glede na logaritem koncentracije (v  $\mu$ M). Učinek je prikazan kot N-kratna sprememba vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolo 0,1 % DMSO v mediju.

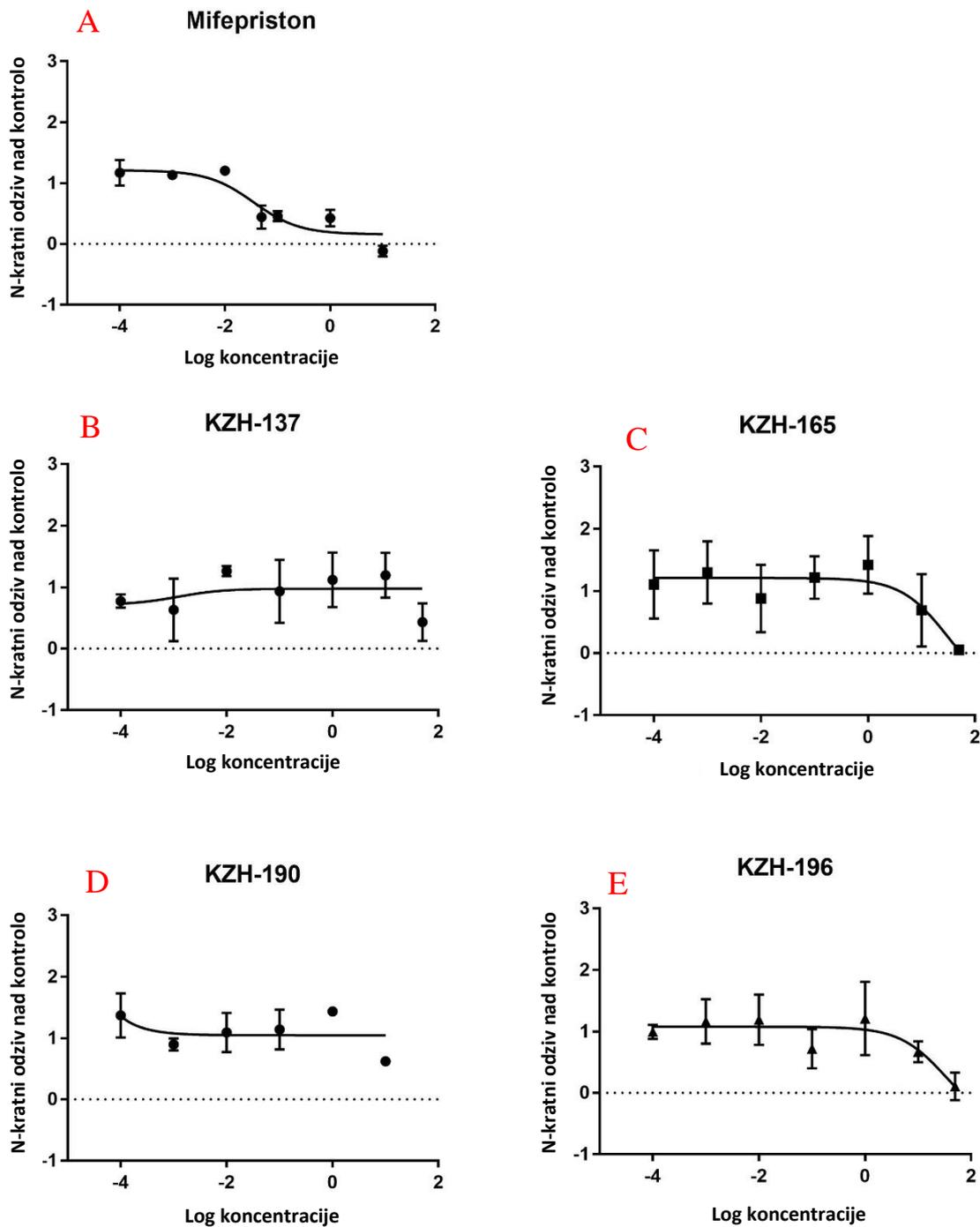
EC<sub>50</sub> vrednost HC smo izračunali pri 0,03574 μM, kar je podobno vrednosti, dobljeni z raziskavo na enaki celični liniji 0,09 μM (35) in manj od druge literaturne vrednosti na enaki celični liniji 0,5 μM (33). Za spojini KZH-165 in KZH-190 grafa učinka v odvisnosti od logaritma koncentracije ni bilo mogoče narediti in izračunati vrednosti EC<sub>50</sub>. Spojina KZH-196 ne izkazuje tipične krivulje učinka od odvisnosti od koncentracije, iz krivulje nismo opazili agonističnega učinkovanja. Pri spojini KZH-137 vidimo, da ima rezultat pri koncentraciji 0,001 μM veliko standardno deviacijo, zaradi katere nismo prepričani v pravilno odčitavanje vrednosti EC<sub>50</sub> iz krivulje. Prav tako zaradi odsotnosti statistično značilnih podatkov v rezultat ne moremo biti prepričani. Za potrditev rezultata bi potrebovali najmanj tri neodvisne biološke ponovitve testiranja. Tako brez ponovitve testiranja za spojine KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 ne moremo trditi, da delujejo ali ne delujejo agonistično na GR.



Slika 24: Rezultati luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin na GR, ki so prikazani kot N-kratna vrednost nad kontrolo s standardno deviacijo. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Na sliki 24 smo prikazali histogram z rezultati našega testiranja antagonističnega delovanja spojin na GR. Z rdečo črto smo označili kontrolo 0,1 % DMSO v mediju, ki predstavlja vrednost 1 oz. 100 % agonistične aktivnosti na GR. Za pozitivno kontrolo, s katero smo se

prepričali, da luciferazni test deluje, smo uporabili RU-486, ki je znan antagonist na GR. Pri tem smo opazili statistično značilno zmanjšanje aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO pri koncentracijah 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  in 0,05  $\mu\text{M}$ . Zmanjšanje aktivnosti luciferaze glede na kontrolo smo opazili tudi pri začetnih testiranih koncentracijah testnih antagonistov PXR. Statistično značilne rezultate smo opazili pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  spojin KZH-165, KZH-196 ter KZH-190. Najbolj izmed testiranih antagonistov PXR je aktivnost luciferaze zmanjšala spojina KZH-165, kjer je aktivnost luciferaze dosegla 0,05 (5 %) glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. To je tudi rezultat, v katerega smo najbolj prepričani, saj smo s Studentovim T-testom primerjali vrednosti testirane spojine in kontrole 0,1 % DMSO v mediju, ter ugotovili, da obstaja le 0,38 % možnosti, da sta si testirana in kontrolna spojina enaki. Spojina KZH-196 je pri 50  $\mu\text{M}$  koncentraciji dosegla vrednost luciferazne aktivnosti 0,11 (11 %) glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Kljub statistični značilnosti rezultata pa bi bilo potrebno testiranje ponoviti pri nižji koncentraciji spojine, saj smo z MTS testom zaznali citotoksičnost spojine na celice MDA-kb2 pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$ . Izdelali smo tudi grafe učinka v odvisnosti od logaritma koncentracije (Slika 25) s programom GraphPad Prism 7.0 in odčitali  $\text{IC}_{50}$  vrednosti testiranih spojin ter kontrole RU-486.



Slika 25: Grafi prikazujejo antagonistično učinkovanje spojin (A) RU-486, (B) KZH-137, (C) KZH-165, (D) KZH-190 in (E) KZH-196 na GR glede na logaritem koncentracije (v  $\mu\text{M}$ ). Učinek je prikazan kot N-kratna sprememba vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolno 0,1 % DMSO v mediju.

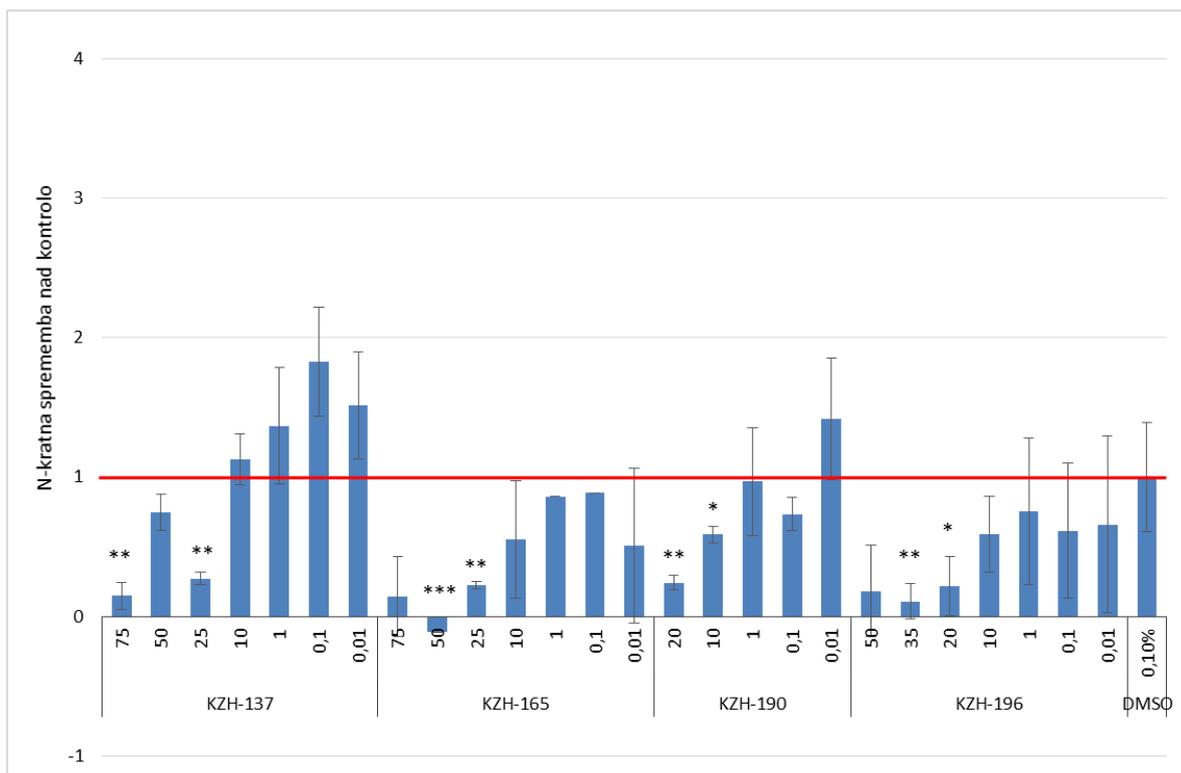
Za RU-486 smo odčitali vrednost  $IC_{50}$ , ki znaša  $0,03518 \mu\text{M}$ . Ta vrednost je primerljiva z literaturnima vrednostnima  $IC_{50}$   $0,0977 \mu\text{M}$  (34) in  $8,8 \text{ nM}$  (35), narejenima na enaki celični liniji MDA-kb2. Videli smo, da tudi sam izbrani postopek, gostota celic in podobno vpliva

na rezultate testiranja, saj smo raziskavo izvedli po istem postopku in uporabili isto opremo kot v raziskavi (34) ter dobili podoben rezultat  $IC_{50}$  vrednosti RU-486. Iz grafov B in D za spojini KZH-137 in KZH-190 nismo opazili značilne krivulje učinka v odvisnosti od koncentracije za antagonist. Iz krivulj tako nismo mogli odčitati vrednosti  $IC_{50}$ . Pri spojinah KZH-165 in KZH-196 pa smo iz krivulj opazili antagonističen učinek na GR.  $IC_{50}$  vrednost spojine KZH-165 smo izračunali pri 30,3  $\mu\text{M}$ , kar pomeni 861-krat šibkejše delovanje od RU-486. Spojina KZH-196 je delovala v podobnem rangu, 932-krat šibkeje kot RU-486, z  $IC_{50}$  vrednostjo 32,8  $\mu\text{M}$ . Vrednosti  $IC_{50}$  testiranih spojin smo zapisali v preglednici XII.

Preglednica XII: Vrednosti  $EC_{50}$  in  $IC_{50}$  testnih spojin na GR.

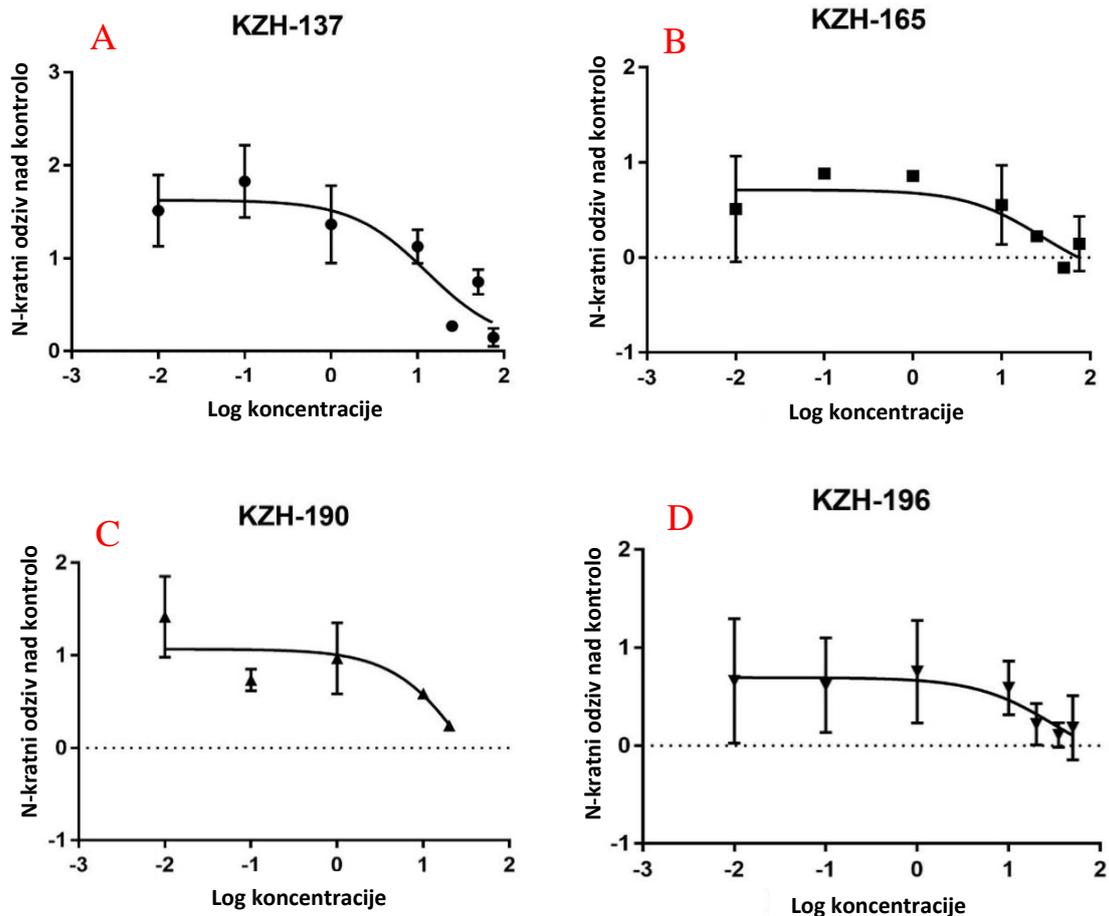
	VREDNOSTI $EC_{50}$	VREDNOSTI $IC_{50}$
<b>KZH-137</b>	/	/
<b>KZH-165</b>	/	30,3 $\mu\text{M}$
<b>KZH-190</b>	/	/
<b>KZH-196</b>	/	32,8 $\mu\text{M}$

Zaradi izkazane antagonistične aktivnosti testiranih antagonistov PXR smo se odločili, da test antagonistične aktivnosti na GR ponovimo za vse štiri antagoniste PXR. Testiranje smo izvedli po enakem postopku, a smo za testiranje uporabili tudi višje koncentracije (pri katerih smo izločili možnost citotoksičnosti), s katerimi smo pridobili več podatkov in oblikovali boljše grafe učinka v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultate smo prikazali na slikah 26 in 27.



Slika 26: Rezultati ponovnega luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojin na GR, ki so prikazani kot N-kratna vrednost nad kontrolo s standardno deviacijo. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Iz histograma na sliki 26 smo opazili, da so vse testirane spojine pri določenih koncentracijah statistično značilno znižale aktivnost luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju, kar smo sumili že v prejšnjem poizkusu. Ponovno je aktivnost luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju najbolj izmed testiranih spojin znižala spojina KZH-165 pri koncentraciji 50 µM. Spojine so dosegle statistično značilno znižanje aktivnosti luciferaze glede na kontrolo pri dveh koncentracijah: spojina KZH-137 pri koncentraciji 75 µM in 25 µM, spojina KZH-165 pri 50 µM in 25 µM, spojina KZH-190 pri 20 µM in 10 µM, spojina KZH-196 pa pri 35 µM in 20 µM. Izdelali smo tudi grafe učinka glede na logaritem koncentracije (Slika 27) in odčitali vrednosti  $IC_{50}$  testiranih spojin.



Slika 27: Grafi prikazujejo antagonistično učinkovanje spojin (A) KZH-137, (B) KZH-165, (C) KZH-190 in (D) KZH-196 na GR glede na logaritem koncentracije (v  $\mu\text{M}$ ). Učinek je prikazan kot N-kratna sprememba vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolo 0,1 % DMSO v mediju.

Iz krivulj vseh testiranih spojin smo opazili antagonistični učinek na GR. Izmed testiranih antagonistov PXR smo najmočnejše antagonistično učinkovanje na GR ugotovili pri spojini KZH-137, kateri smo določili vrednost  $\text{IC}_{50}$  pri koncentraciji  $12,76 \mu\text{M}$ . Določena vrednost  $\text{IC}_{50}$  spojine KZH-137 je tako v podobnem rangu kot  $\text{IC}_{50}$  na PXR ( $11 \mu\text{M}$ ). Za primerjavo med aktivnostjo na GR in PXR izračunamo indeks selektivnosti 1,16, ki pomeni slabo selektivnost spojine KZH-137 na PXR. Vrednost  $\text{IC}_{50}$  za spojino KZH-196 smo izračunali pri koncentraciji  $31,89 \mu\text{M}$ , kar je zelo podobno vrednosti, dobljeni v prvem preizkusu ( $32,8 \mu\text{M}$ ), s čimer se prepričamo tudi o pravilnosti dela. Podobno vrednost  $\text{IC}_{50}$  kot v prejšnjem poizkusu smo določili tudi za spojino KZH-165, in sicer pri koncentraciji  $28,36 \mu\text{M}$ . Spojini sta delovali antagonistično na GR v primerjavi z RU-486 906-krat, oziroma 806-krat šibkeje. V primerjavi z delovanjem omenjenih spojin na PXR lahko ovrednotimo selektivnost delovanja spojin. Spojina KZH-165 deluje na PXR agonistično pri koncentraciji  $10 \mu\text{M}$ ,

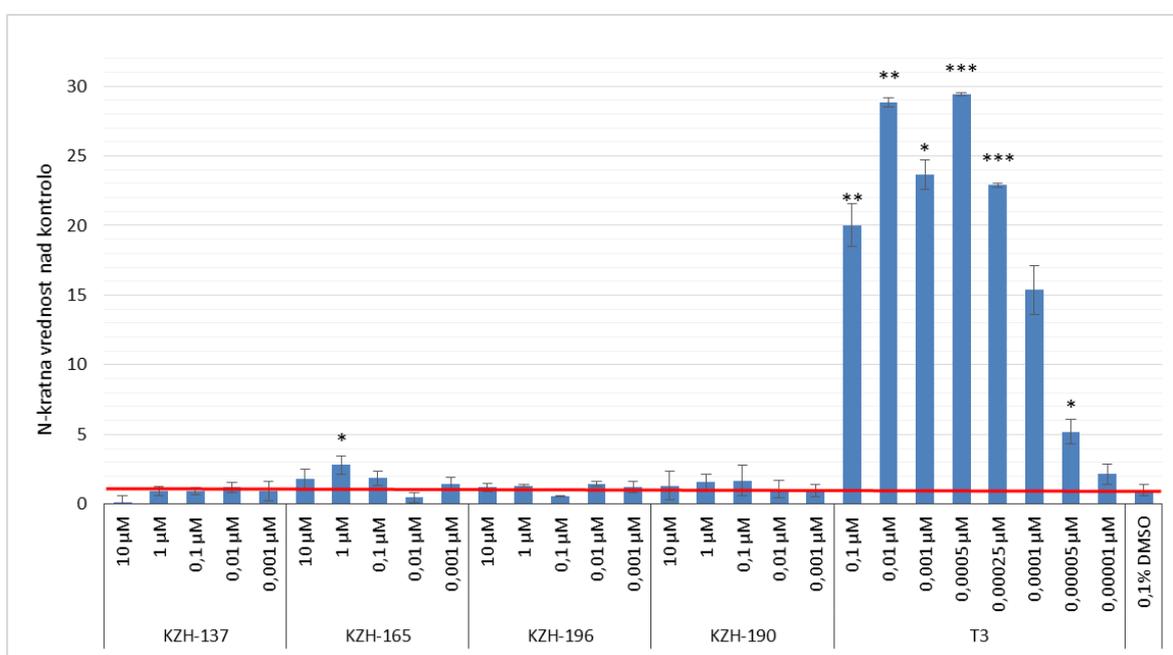
medtem ko je delovala antagonistično na GR pri višjih koncentracijah 50  $\mu\text{M}$  in 25  $\mu\text{M}$ . Tudi spojina KZH-196 je izkazala pri nižji koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  antagonistično učinkovanje na PXR, medtem ko smo antagonistično učinkovanje na GR določili pri koncentracijah, višjih od 20  $\mu\text{M}$ . Spojina KZH-190, ki je pri koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  izkazala tako agonistično kot antagonistično delovanje na PXR, je pri isti koncentraciji delovala antagonistično tudi na GR, kar priča o neselektivnem delovanju spojine KZH-190 na PXR. Na GR je omenjena spojina v primerjavi z RU-486 delovala 995-krat šibkeje, določili smo ji  $\text{IC}_{50}$  vrednost pri koncentraciji 35,02  $\mu\text{M}$ .

Za potrditev rezultatov bi potrebovali še najmanj eno biološko ponovitev testiranja. A iz dosedanjih izsledkov lahko sklepamo, da so vsi testirani antagonisti PXR aktivni na GR in lahko posegajo v homeostazo GR. Tudi sam PXR preko nadzora metabolizma glukokortikoidnih hormonov vpliva na homeostazo glukokortikoidnih hormonov. Zhai s sodelavci je v poizkusih na transgenih miškah med drugim odkril, da genetična ali farmakološka aktivacija PXR z agonisti in vivo namreč poveča sproščanje kortikosterona in aldosterona, glavnega glukokortikoidnega in mineralokortikoidnega hormona pri glodalcih. Predlagan mehanizem tega delovanja je preko večje aktivacije encimov P450 ter  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze, ki so odgovorni za presnovo glukokortikoidnih hormonov (38). Zato je možno, da bi tudi testirani antagonisti PXR z zaviranjem delovanja PXR in z ugotovljenim direktnim antagonističnim delovanjem na GR imeli določen vpliv na homeostazo glukokortikoidnih hormonov pri človeku, za oceno teh vplivov pa so potrebna nadaljnja testiranja.

#### 4.4. DOLOČANJE AKTIVNOSTI NA TR

Aktivnost spojin KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 na TR smo določali na celični liniji GH3.TRE-Luc z luciferaznim testom, ki je opisan v poglavju Luciferazni test na celični liniji GH3.TRE-Luc (3.2.3.2.). Agonistično delovanje na TR smo določali direktno, kontrola 0,1 % DMSO v PMC mediju je v tem primeru predstavljala 0 % aktivnosti na TR. Antagonistično aktivnost na TR smo določali posredno preko inhibicije dodanega agonista na TR 0,25 nM T3, kontrola 0,1 % DMSO v PMC mediju je v tem primeru predstavljala 100 % agonistične aktivnosti na TR. Od vrednosti meritev luciferaznega testa za posamezno spojino smo odšteli slepo vrednost PMC medija, brez celic in rezultate normirali glede na negativno kontrolo 0,1 % DMSO v PMC mediju. Luciferazni test na celični liniji GH3.TRE-

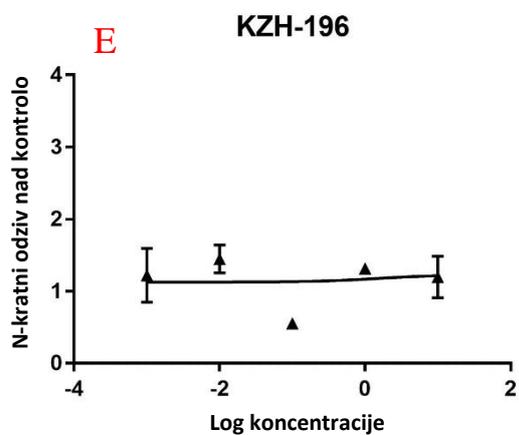
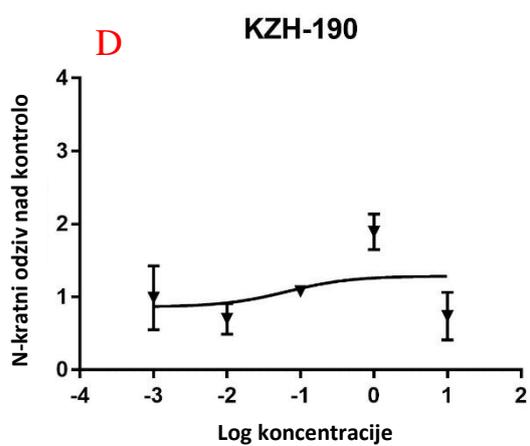
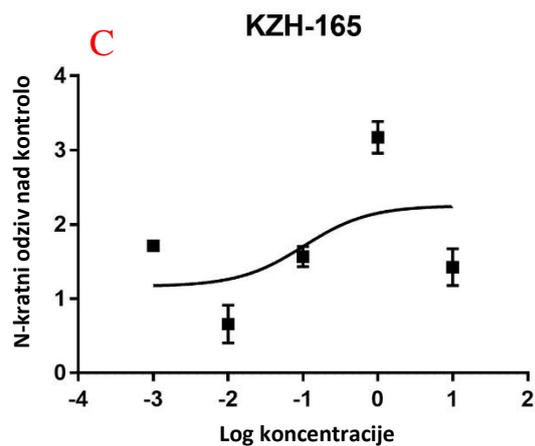
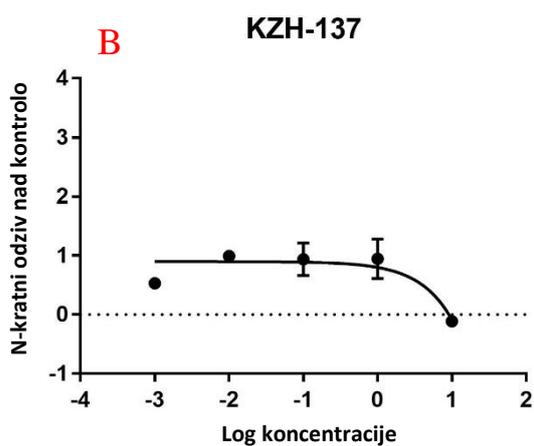
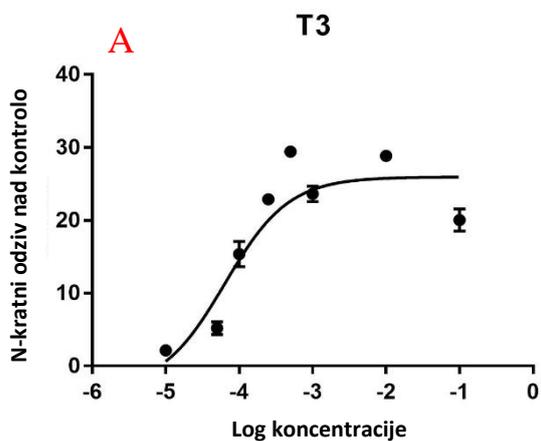
Luc smo izvajali takoj za testom živosti celic z resazurinom, zato rezultata preživetja celic po tretiranju s testnimi spojinami ob izvajanju luciferaznega testa še nismo imeli. Z vizualnim preverjanjem smo dobili približno predstavo o citotoksičnosti spojin. Ker smo pri testiranju antagonizma na TR ugotovili, da večina testiranih spojin ne dosega postavljene meje metabolične aktivnosti celic (80 %), smo rezultate luciferaznega testa preračunali na 100 % metabolične aktivnosti celic, da bodo rezultati primerljivi med seboj. Rezultate smo prikazali v obliki histograma, ki prikazuje N-kratno spremembo aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v PMC mediju. Izračunali smo tudi standardno deviacijo in naredili Studentov T-test s stopnjo zaupanja 5 %. Rezultate testiranja agonističnega delovanja spojin na TR smo prikazali na sliki 28, rezultate testiranja antagonističnega delovanja izbranih spojin na TR pa na sliki 30.



Slika 28: Rezultati luciferaznega testa za agonistično delovanje spojin na TR, ki so prikazani kot N-kratna vrednost nad kontrolo s standardno deviacijo. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

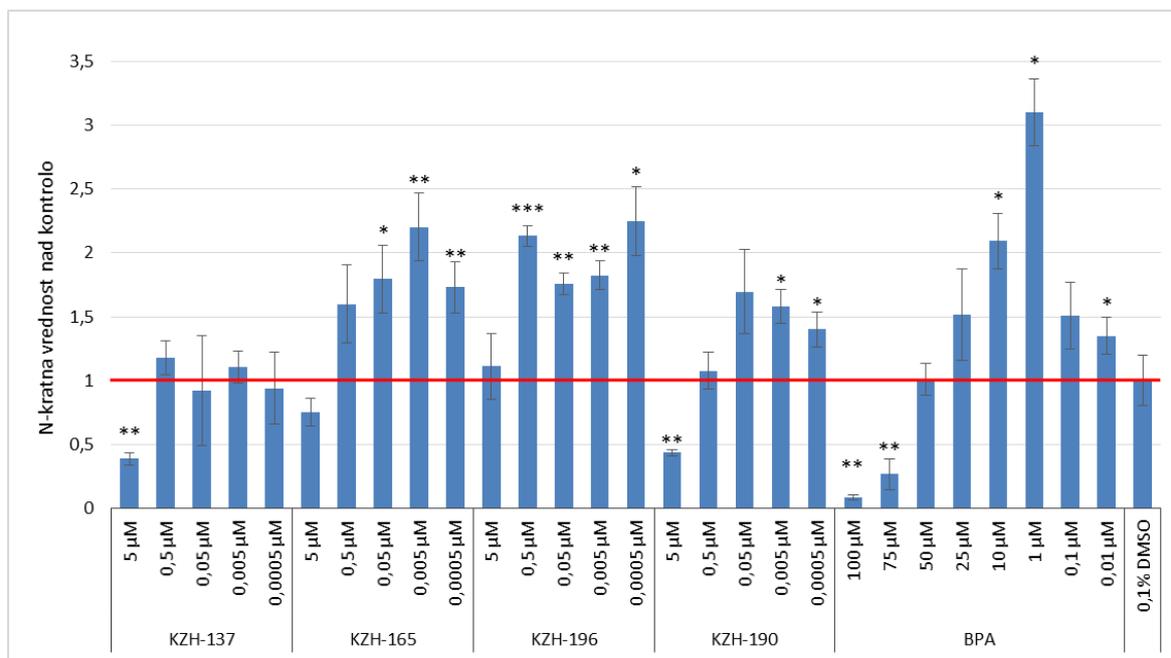
Pri testiranju agonističnega delovanja spojin KZH-137, KZH-190 in KZH-196 na TR nismo opazili statistično značilnega povečanja aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Statistično značilno povečanje aktivnosti luciferaze smo opazili pri spojini KZH-165 v koncentraciji 1 µM in 0,1 µM, in sicer največ za 3,2-krat glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju. Kot pozitivno kontrolo, s katero smo se prepričali, da luciferazni test deluje, smo testirali T3. Ta izkazuje statistično značilne rezultate pri skoraj vseh testiranih

koncentracijah. Največ (29,4-krat) se aktivnost luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju poveča pri koncentraciji 0,5 nM spojine T3. Z GraphPad Prism 7.0 smo izdelali grafe učinka glede na logaritem koncentracije, ki so prikazani na sliki 29 in odčitali vrednosti EC<sub>50</sub> testiranih spojin, kjer je bilo to mogoče.



Slika 29: Grafi prikazujejo agonistično učinkovanje spojine (A) T3, (B) KZH-137, (C) KZH-165, (D) KZH-190 in (E) KZH-196 na TR glede na logaritem koncentracije (v  $\mu\text{M}$ ). Učinek smo izračunali kot N-kratno spremembo vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolo 0,1 % DMSO v PMC mediju.

Iz krivulj za spojine KZH-137, KZH-190 in KZH-196 nismo opazili antagonističnega učinka na TR. Iz krivulj za našete spojine tako ni bilo mogoče odčitati vrednosti  $\text{EC}_{50}$ . Spojina KZH-165, ki je edina izmed testiranih učinkovin na PXR izkazala statistično značilne rezultate, ima nepopolno krivuljjo, s katero ne moremo biti prepričani o pravilnosti rezultata o  $\text{EC}_{50}$ . Potrebovali bi še vsaj dve biološki ponovitvi testa, da se prepričamo o pravilnosti rezultata. Selektivnost spojine KZH-165 na PXR lahko ovrednotimo s primerjanjem najnižje koncentracije, pri kateri je spojina aktivna na PXR in TR. Spojina KZH-165 tako deluje agonistično na TR že pri 0,1  $\mu\text{M}$ , agonistično na PXR pa deluje pri 100-krat višji koncentraciji 10  $\mu\text{M}$ . Za pozitivno kontrolo T3 smo izračunali vrednost  $\text{EC}_{50}$  0,0639 nM, kar nakazuje na veliko občutljivost luciferaznega testa na celični liniji GH3.TRE-Luc.

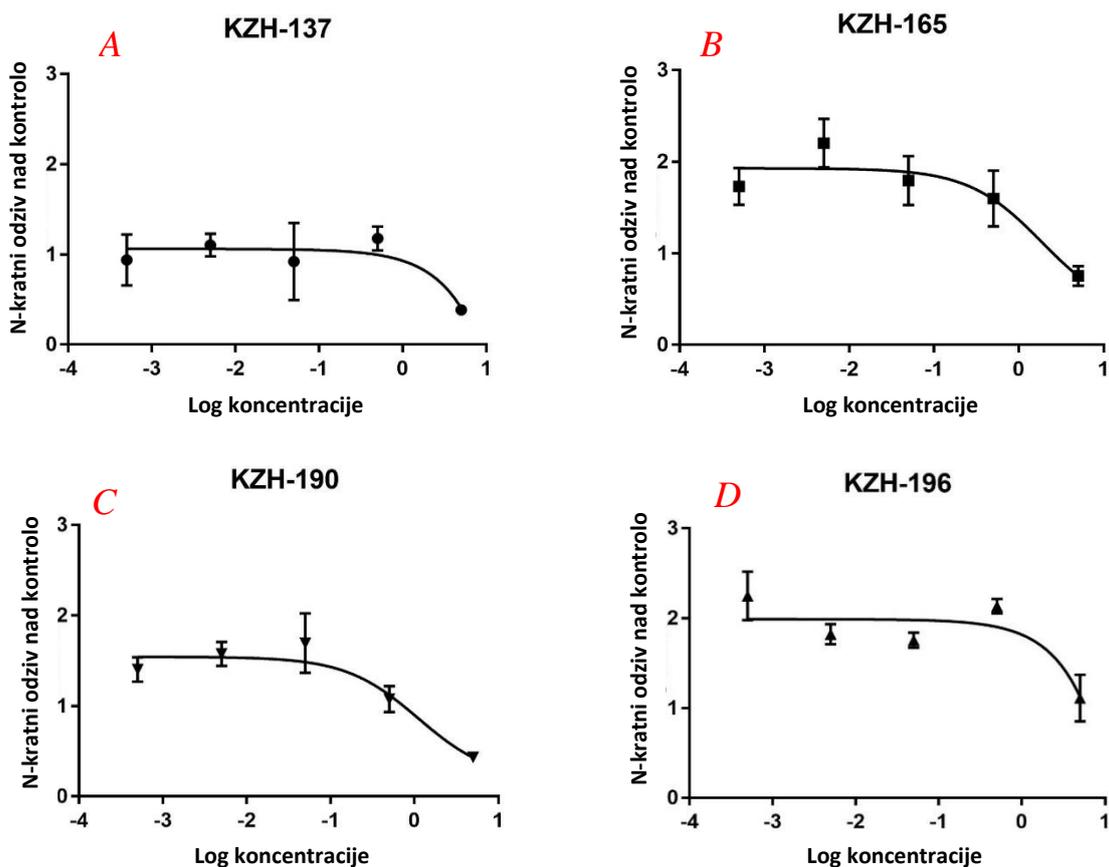


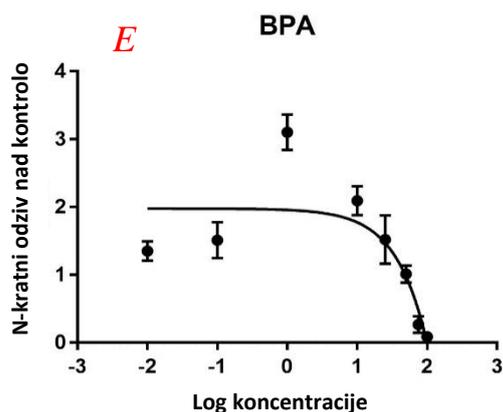
Slika 30: Rezultati luciferaznega testa za antagonistično delovanje spojine na TR, ki so prikazani kot N-kratna vrednost nad kontrolo s standardno deviacijo. Na histogramu smo z zvezdicami označili stolpce, pri katerih smo s T-testom izračunali statistično značilno odstopanje testiranih vzorcev od kontrole - 0,1 % DMSO v gojitvenem mediju (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Z rdečo črto smo označili vrednost 1 kontrolnega vzorca 0,1 % DMSO v PMC mediju, z dodatkom 0,25 nM T3, ki predstavlja 100 % agonistične aktivnosti na TR. Da luciferazni test deluje, smo se prepričali s testiranjem BPA, ki je znan antagonist na TR. Pri testiranju BPA smo opazili statistično značilno zmanjšanje aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju pri 100  $\mu\text{M}$  in 75  $\mu\text{M}$  koncentracije, pri katerih zavre 91,5 % oz. 72,1 %

agonistične aktivnosti T3. S histograma na sliki 30 smo razbrali, da spojine KZH-137, KZH-165 in KZH-190 izkazujejo antagonistično aktivnost na TR pri določenih koncentracijah. Statistično značilno zmanjšanje aktivnosti luciferaze glede na kontrolo 0,1 % DMSO v mediju smo opazili pri spojinah KZH-137 in KZH-190 v koncentraciji 5  $\mu$ M. Največ je aktivnost luciferaze glede na kontrolo zmanjšala spojina KZH-137, kjer je ohranjene 38,6 % aktivnosti luciferaze. V podobnem območju je delovala tudi spojina KZH-190, pri kateri je ohranjene 43,4 % aktivnosti luciferaze.

Ob tem spomnimo, da so vse testirane spojine izkazale citotoksične lastnosti pri večini testiranih koncentracij, in da so rezultati preračunani na 100 % metabolne aktivnosti celic, zato da so medsebojno primerljivi. Da se prepričamo o pravilnosti rezultata, bi potrebovali še vsaj dve biološki ponovitvi testa. Z GraphPad Prism 7.0 smo izdelali grafe učinka glede na logaritem koncentracije in jih prikazali na sliki 31, ter izračunali vrednosti  $IC_{50}$  testiranih spojin, kjer je bilo to mogoče.





Slika 31: Grafi prikazujejo antagonistično učinkovanje spojin (A) KZH-137, (B) KZH-165 in (C) KZH-196, (D) KZH-190 in (E) BPA na TR glede na logaritem koncentracije (v  $\mu\text{M}$ ). Učinek smo izračunali kot N-kratno spremembo vrednosti aktivnosti luciferaze nad kontrolo 0,1 % DMSO v PMC mediju.

Z grafov na sliki 31 lahko vidimo, da testirani spojin KZH-137 in KZH-196 ne izkazujeta učinka, ki je odvisen od koncentracije. Manjši antagonistični učinek, ki je odvisen od koncentracije, smo opazili pri spojinah KZH-165, kjer smo lahko določili vrednost  $\text{IC}_{50}$  1,875  $\mu\text{M}$ , ter pri spojini KZH-190, ki smo ji določili vrednost  $\text{IC}_{50}$  1,111  $\mu\text{M}$ . Selektivnost omenjenih spojin na PXR ovrednotimo s primerjanjem najnižje koncentracije, pri kateri je spojina aktivna na PXR in TR. Spojini KZH-165 in KZH-190 delujeta antagonistično na TR pri koncentraciji 5  $\mu\text{M}$ , medtem ko učinkujeta na PXR pri višji koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  in tako nista selektivni na PXR. S programom GraphPad Prism 7.0 smo pozitivni kontroli BPA določili zelo dvoumne rezultate in bi potrebovali najmanj tri biološke ponovitve, da se prepričamo o pravilnosti rezultatov. V literaturi najdemo podatek o visoki vrednosti  $\text{IC}_{50}$  na celični liniji GH3.TRE-Luc 52,70  $\mu\text{M}$  (39). Dvoumni rezultati so lahko tudi posledica izkazane citotoksičnosti spojin na celice linije GH3.TRE-Luc in posledično testiranih le nizkih koncentracij spojin.

Določene vrednosti  $\text{EC}_{50}$  in  $\text{IC}_{50}$  testiranih antagonistov PXR na TR smo prikazali v spodnji preglednici XIII.

Preglednica XIII: Vrednosti  $\text{EC}_{50}$  in  $\text{IC}_{50}$  testiranih spojin na TR.

	VREDNOSTI $\text{EC}_{50}$	VREDNOSTI $\text{IC}_{50}$
<b>KZH-137</b>	/	/
<b>KZH-165</b>	/	1,875 $\mu\text{M}$
<b>KZH-190</b>	/	1,111 $\mu\text{M}$
<b>KZH-196</b>	/	/

Za potrditev rezultatov o delovanju testiranih antagonistov PXR na TR bi potrebovali še vsaj dve biološki ponovitvi poizkusa. Tudi področje vplivanja PXR na homeostazo tiroidnih hormonov je dokaj neraziskano. V raziskavi bakteriostatika triklosana z *in vitro* testom aktivnosti na jedrne receptorje PXR in CAR živalske in človeške variante receptorjev je Paul s sodelavci opisal vpliv triklosana na regulacijo jetrnega katabolizma in homeostazo tiroidnih hormonov. Triklosan je aktiviral PXR na človeškem modelu in s tem aktiviral večjo transkripcijsko aktivnost kataboličnih encimov in znižal serumske koncentracije tiroksina (40). Tako bi lahko tudi naše testirane spojine, ki so antagonisti PXR imele določene učinke na homeostazo tiroidnih hormonov, zaradi vpliva na transkripcijo metaboličnih encimov. Za oceno teh vplivov pa so potrebne nadaljnje raziskave.

## 5. SKLEP

V magistrski nalogi smo poskušali ovrednotiti vpliv antagonistov PXR KZH-137, KZH-165, KZH-190 in KZH-196 na AR, GR in TR ter s tem preveriti selektivnost izbranih spojin na PXR. S pomočjo eksperimentalnega dela smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Pri spojini KZH-137 smo opazili statistično značilno zmanjšanje aktivnosti luciferaze na AR pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$ . V ponovljenem poskusu smo določili vrednost  $\text{IC}_{50}$  13,63  $\mu\text{M}$ , a brez statistično značilnih rezultatov v podatek nismo prepričani. Indeks selektivnosti glede na PXR znaša 1,239 in pomeni slabo selektivnost delovanja na PXR. Pri testiranju na GR smo opazili, da je spojina KZH-137 delovala statistično značilno antagonistično pri koncentraciji 75  $\mu\text{M}$  in 25  $\mu\text{M}$ , ob temu smo določili vrednost  $\text{IC}_{50}$  12,76  $\mu\text{M}$ . Indeks selektivnosti glede na PXR znaša 1,16 in pomeni slabo selektivnost delovanja na PXR. Z rezultati luciferaznega testa za aktivnost na AR, GR in TR smo dokazali, da spojina KZH-137 ne deluje selektivno na PXR in s tem potrdili 1. hipotezo.
- Pri spojini KZH-165 nismo opazili delovanja na AR. Ob določanju aktivnosti na GR smo ugotovili antagonistično delovanje. Statistično značilno znižanje aktivnosti luciferaze smo zasledili pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$ , v ponovljenem poizkusu pa tudi pri koncentraciji 25  $\mu\text{M}$ . Za primerjavo, spojina KZH-165 učinkuje na PXR pri nižji koncentraciji 10  $\mu\text{M}$ . V obeh poizkusih smo določili podobne  $\text{IC}_{50}$  vrednosti – prvič 30,3  $\mu\text{M}$  in drugič 28,36  $\mu\text{M}$ . S testom aktivnosti na TR pa smo odkrili agonistično aktivnost pri koncentracijah 1  $\mu\text{M}$  in 0,1  $\mu\text{M}$ , kot tudi antagonistično delovanje ( $\text{IC}_{50}=1,875$   $\mu\text{M}$ ) na TR. Selektivnost delovanja spojine KZH-165 na PXR je slaba, saj na TR učinkuje že pri nižjih koncentracijah (agonistično pri 0,1  $\mu\text{M}$  in antagonistično pri 5  $\mu\text{M}$ ) kot na PXR (10  $\mu\text{M}$ ). Izsledki raziskav nam potrdijo 2. hipotezo, saj spojina KZH-165 izkazuje aktivnost na GR in TR, s čimer dokažemo neselektivno delovanje te učinkovine.
- Spojina KZH-190 deluje antagonistično na GR in TR. Statistično značilno znižanje aktivnosti luciferaze glede na kontrolo smo opazili pri koncentraciji 20  $\mu\text{M}$  in 10  $\mu\text{M}$  pri določanju antagonističnega delovanja na GR in 5  $\mu\text{M}$  pri določanju antagonističnega delovanja na TR. Pri antagonizmu na GR smo z določeno

vrednostjo  $IC_{50}$  35,02  $\mu$ M ugotovili najmanj potentno antagonistično delovanje na GR izmed testiranih antagonistov PXR. Na TR pa smo določili vrednost  $IC_{50}$  1,111  $\mu$ M, kar je v podobnem območju kot pri spojini KZH-165. Selektivnost delovanja spojine KZH-190 smo določili s primerjanjem najnižje koncentracije, pri kateri spojina učinkuje na PXR in testirane receptorje. Ta koncentracija znaša 5  $\mu$ M za antagonistično delovanje na TR ter 10  $\mu$ M za antagonistično delovanje na PXR in GR, kar priča o neselektivnem delovanju spojine na PXR. Z dokazi o delovanju testiranega antagonistu PXR KZH-190 na GR in TR lahko potrdimo 3. hipotezo, ter tako zavrneemo možnost selektivnega delovanja spojine na PXR.

- Spojini KZH-196 smo določali delovanje na AR v dveh poizkusih. V prvem smo opazili statistično značilne odstopne od kontrole, tako pri agonističnem delovanju, kot pri antagonističnem, ki pa jih v drugem poizkusu nismo uspeli potrditi. Statistično značilno antagonistično deluje spojina na GR pri koncentracijah 50  $\mu$ M pri prvem poizkusu, ter 35  $\mu$ M in 20  $\mu$ M pri drugem poizkusu. V obeh poizkusih smo določili zelo podobni  $IC_{50}$  vrednosti 32,8  $\mu$ M in 31,89  $\mu$ M. Selektivnost učinkovanja spojine KZH-196 na PXR v primerjavi z učinkovanjem na GR je slaba, saj se najnižji koncentraciji, pri katerih spojina učinkuje na PXR in GR, razlikujeta le za faktor 2. Na celični liniji GH3.TRE-Luc nismo opazili statistično značilne aktivnosti na TR. Vseeno pa moramo zavrniti možnost selektivnega delovanja spojine na PXR, saj smo v raziskavi dokazali antagonistično aktivnost spojine KZH-196 na GR, ter s tem potrdili 4. hipotezo.

V magistrski nalogi smo torej potrdili vse 4 hipoteze, kar pomeni, da so vsi testirani antagonisti PXR izkazali aktivnost na AR, GR ali TR in niso selektivni na PXR. Toda za dokončno potrditev bi bila potrebna nadaljnja testiranja vsaj s tremi biološkimi ponovitvami preizkusa. Ponovitev preizkusa bi bila smiselna na celični liniji, ki vsebuje le en tip receptorjev, saj uporabljena celična linija MDA-kb2 vsebuje tako AR kot GR, kar lahko vpliva na rezultate. Morebitna *in vivo* testiranja bi nam pomagala pri oceni vplivov antagonistov PXR na organizem ter nudila podrobnejši vpogled na vpliv PXR na homeostazo androgenih, glukokortikoidnih in tiroidnih hormonov.

## 6. LITERATURA

- (1) Zhuo W, Hu L, Lv J, Wang H, Zhuo H, Fan L: Role of pregnane X receptor in chemotherapeutic treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014, 74(2): 217-227.
- (2) <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-system>  
Dostopano:30.6.2017.
- (3) Guyton AC, Hall JE: Textbook of medical physiology, 12<sup>th</sup> Edition, Elsevier Inc., Philadelphia, 2011: 881-986.
- (4) <http://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=507> Dostopano: 30.6.2017.
- (5) Ramamoorthy S, Cidlowski JA: Exploring the Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action from Sensitivity to Resistance. *Endocr Dev.* 2013, 24: 41–56.
- (6) McKay LI, Cidlowski JA: Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids. *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6<sup>th</sup> Edition, BC Decker Inc., 2013, Chapter 62.
- (7) Ramamoorthy S, Cidlowski JA: Corticosteroids-Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016, 42(1): 15–31.
- (8) Tan MH, Li J, Xu E, Melcher K, Yong E: Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015, 36(1): 3–23.
- (9) Birkman AO: Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders, *Endocrinology of male reproduction*, Rotterdam, 2013.  
<http://www.endotext.org/chapter/androgen-physiology-receptor-and-metabolic-disorders/>  
Dostopano: 12.3.2018.
- (10) Davey RA, Grossmann M: Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev.* 2016, 37(1): 3–15.
- (11) Schroeder AC, Privalsky ML: Thyroid Hormones, T3 and T4, in the Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5(40): 1–6.
- (12) Hammes SR, Davis PJ: Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015, 29(4): 581–593.
- (13) Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ: Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocr Rev.* 2010, 31(2): 139–170.

- (14) Wang J, Dai S, Guo Y, Xie W, Zhai Y: Biology of PXR: role in drug-hormone interactions. *EXCLI J.* 2014, 13: 728–739.
- (15) Zhuo W, Hu L, Lv J, Wang H, Zhou H, Fan L: Role of pregnane X receptor in chemotherapeutic treatment. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014, 74(2): 217–227.
- (16) Qiao E, Ji M, Wu J, Ma R, Zhang X, He Y, Zha Q, Song X, ZHU LW, Tang J: Expression of the PXR gene in various types of cancer and drug resistance. *Oncol Lett.* 2013, 5(4): 1093–1100.
- (17) Banerjee M, Robbins D, Chen T: Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases. *Drug Discov Today* 2015, 20(5): 618-628.
- (18) Mani S, Dou W, Redinbo MR: PXR antagonists and implication in drug metabolism. *Drug Metab Rev.* 2013, 45(1): 60–72.
- (19) Biswas A, Mani S, Redinbo MR, Krasowski MD, Li H, Ekins S: Elucidating the 'Jekyll and Hyde' Nature of PXR: The Case for Discovering Antagonists or Allosteric Antagonists. *Pharm Res.* 2009, 26(8): 1807–1815.
- (20) Gupta D, Venkatesh M, Wang H, Kim S, Sinz M, Goldberg GL, Whitney K, Longley C, Mani S: Expanding the roles for pregnane X receptor in cancer: proliferation and drug resistance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2008,14(17): 5332-40.
- (21) Wang H, Venkatesh M, Li H, Goetz R, Mukherjee S, Biswas A, Zhu L, Kaubisch A, Wang L, Pullman J, Whitney K, Kuro-o M, Roig AI, Shay JW, Mohammadi M, Mani S: Pregnane X receptor activation induces FGF19-dependent tumor aggressiveness in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011, 121(8): 3220–3232.
- (22) Masuyama H, Nakatsukasa H, Takamoto N, Hiramatsu Y: Down-regulation of pregnane X receptor contributes to cell growth inhibition and apoptosis by anticancer agents in endometrial cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2007, 72(4): 1045-53.
- (23) Hodnik Ž, Peterlin Mašič L, Tomašič T, Smodiš D, D'Amore C, Fiorucci S, Kikelj D: Bazedoxifene-Scaffold-Based Mimetics of Solomonsterols A and B as Novel Pregnane X Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* 2014, 57(11): 4819–4833.

- (24) Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE Jr.: A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological Sciences* 2002; 66: 69-81.
- (25) Freitas J, Cano P, Craig-Veit C, Goodson ML, Furlow JD, Murk AJ: A detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicol In Vitro*. 2011, 25(1): 257-66.
- (26) Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook [https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/101902/ecacc\\_lab\\_handbook.pdf](https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/101902/ecacc_lab_handbook.pdf) Dostopano: 10.4.2017.
- (27) Gibco Cell Culture Basics: Cell Culture Protocols: Freezing Cells <https://www.thermofisher.com/si/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/freezing-cells.html> Dostopano: 10.4.2017.
- (28) Gibco Cell Culture Basics: Cell Culture Protocols: Thawing Cells <https://www.thermofisher.com/si/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/thawing-cells.html> Dostopano: 10.4.2017.
- (29) Experimental Biosciences Resources: Laboratory Methods: Principles of microscopy: Using a Counting Chamber. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html> Dostopano: 22.4.2017.
- (30) CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf> Dostopano: 9.5.2017.
- (31) Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L: Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual [Internet]. Dostopano: 9.5.2017.
- (32) CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Promega Corporation Cat.# G7570 <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf?la=en> Dostopano: 10.5.2017.

- (33) Kolšek K, Gobec M, Raščan Im, Dolenc MS: Screening of bisphenol A, triclosan and paraben analogues as modulators of glucocorticoid and androgen receptor activities. *Toxicology In Vitro* 2015, 29: 8-15.
- (34) Aït-Aïssa S, Laskowski S, Laville N, Porcher JM, Brion F: Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line. *Toxicol In Vitro*. 2010, 24(7): 1979-85.
- (35) Colja I: Magistrska naloga: Proučevanje vpliva mešanic spojin avobenzola, butiliranega hidroksianizola in 2-metilresorcinola na moduliranje androgenega in glukokortikoidnega sistema, Fakulteta za farmacijo 2015, 36-38.
- (36) Kumar S, Jaiswal B, Kumar S, Negi S, Tyagi RK: Cross-talk between androgen receptor and pregnane and xenobiotic receptor reveals existence of a novel modulatory action of anti-androgenic drugs. *Biochem Pharmacol*. 2010, 80(7): 964-76
- (37) Zhang B, Cheng Q, Ou Z, Lee JH, Xu M, Kochhar U, Ren S, Huang M, Pflug BR, Xie W: Pregnane X receptor as a therapeutic target to inhibit androgen activity. *Endocrinology*. 2010, 151(12): 5721-9.
- (38) Zhai Y, Pai HV, Amico JA, Vollmer RR, Xie W: Activation of Pregnane X Receptor Disrupts Glucocorticoid and Mineralocorticoid Homeostasis. *Mol Endocrinol*, 2007, 21 (1): 138-147.
- (39) Kelp J: Magistrska naloga: Ugotavljanje tiroidnega delovanja izbranih nesteroidnih protivnetnih učinkovin na celice GH3.TRE-Luc, Fakulteta za farmacijo 2015, 40-41.
- (40) Paul KB, Thompson JT, Simmons SO, Vanden Heuvel JP, Crofton KM: Evidence for triclosan-induced activation of human and rodent xenobiotic nuclear receptors. *Toxicol In Vitro* 2013, 27(7): 2049-60.