

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Vliv fenofibrátu a silymarinu na vybrané enzymy v tkáních
potkaního modelu SHR-CRP**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jan Soukop
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie rostlin
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	PharmDr. Martin Poruba, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jan Soukop
Název práce	Vliv fenofibrátu a silymarinu na vybrané enzymy v tkáních potkaního modelu SHR-CRP
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Lékařská fakulta, Ústav farmakologie
Vedoucí práce	PharmDr. Martin Poruba, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Cytochromy P450 (CYP) jsou klíčovými enzymy reakcí první fáze biotransformace xenobiotik, pomocí kterých jsou zprostředkovávány transformační reakce široké škály cizorodých látek. Produkty reakcí první fáze mají hydrofilnější charakter a mohou podstupovat dalším procesům.</p> <p>P-glykoprotein (P-gp) je nescifický transportérový protein, který se podílí na exkreci mnoha léčiv a tím ovlivňuje řadu farmakokinetických dějů. Nadexprese P-gp může způsobovat tzv. mnohočetnou lékovou rezistenci, nedostatek tohoto proteinu naopak zapříčiňuje kumulaci toxických látek v tkáních, což se může projevit až fatálními následky.</p> <p>V rámci této diplomové práce byl studován vliv fenofibrátu, silymarinu a kombinace těchto látek na expresi genů <i>Abcb1a1</i>, <i>Abcb1a2</i>, <i>Cyp1a1</i>, <i>Cyp3a23</i> a <i>Nr1i2</i> v tkáních laboratorního potkana SHR-CRP pomocí metody RT-PCR. Na úrovni množství proteinu byly ve stejných tkáních stanovovány proteiny CYP1A1, CYP3A a P-gp. Výsledky ukazují statisticky významné zvýšení exprese <i>Abcb1a</i> u skupiny ošetřené silymarinem. Signifikantní snížení exprese <i>Abcb1a</i> i <i>Abcb1b</i> proběhlo ve skupině ošetřené fenofibrátem v játrech. Fenofibrát rovněž signifikantně down-reguloval expresi <i>Cyp3a23</i> a bez statistické významnosti snížil i <i>Cyp1a1</i>.</p>

Klíčová slova	Fenofibrát, silymarin, stanovení genové exprese, stanovení množství proteinu, Western blot, RT-PCR
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Jan Soukop
Title of thesis	Effect of fenofibrate and Silymarin on selected enzymes in tissues of SHR-CRP rat model
Type of thesis	Master thesis
Department	Faculty of Medicine and Dentistry, Department of Pharmacology
Supervisor	PharmDr. Martin Poruba, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>Cytochromes P450 (CYP) are essential enzymes in the first phase of metabolism, as CYPs mediate diverse transformational reactions for many xenobiotics. Products of the first biotransformational reactions have more hydrophilic character and are able to undergo further biotransformation reactions.</p> <p>P-glycoprotein (P-gp) is a transport protein participating in drug excretion and affecting pharmacokinetics. Overexpressed P-gp can cause Multi-drug resistance, on the contrary, low expression of P-gp may cause cumulation of toxic substances. In this diploma thesis, Fenofibrate, Silymarin and combination of these substances and their effect on <i>Abcb1a</i>, <i>Abcb1b</i>, <i>Cyp1a1</i>, <i>Cyp3a23</i> and <i>Nr1i2</i> genes in liver and kidney tissue was studied using RT-PCR method. Furthermore, effect of these substances on amount of ABCB1, CYP1A1 and CYP3A proteins in the same tissues was studied using Western blot method. Results show significant <i>Abcb1a</i> up-regulation in Silymarin treated group, on the contrary, fenofibrate caused significant down-regulation of <i>Abcb1a</i> and <i>Abcb1b</i> in liver. Fenofibrate also significantly down-regulated <i>Cyp3a23</i> and non-significantly down-regulated <i>Cyp1a1</i>.</p>

Keywords	Fenofibrate, Silymarin, gene expression determination, amount of protein determination, Western blot, RT-PCR
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací, její teoretickou i experimentální část, vypracoval samostatně pod odborným vedením PharmDr. Martina Poruby, Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne .

Jan Soukop

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu, PharmDr. Martinovi Porubovi, Ph.D., za jeho odborný a zároveň přátelský přístup při vedení mé diplomové práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Ivetě Zapletalové, která mi nesčetněkrát pomohla a mnohdy poradila při vypracování experimentální části této práce. V neposlední řadě děkuji celému kolektivu Ústavu farmakologie LF UP za poskytnutí přátelských podmínek pro práci. Na závěr děkuji své rodině za podporu, vřídnost a trpělivost, která mi byla poskytována po celou dobu mého studia.

Seznam zkratek

Zkratky s anglickým nebo českým výkladem:

ABC	ATP-Binding Cassette
AhR	Aryl uhlovodíkový receptor
ATP	Adenosin trifosfát
BCA	Kyselina Bicinchoninová
CAR	Constitutive Androstane receptor
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CRP	C-reaktivní protein
Ct	Cycle of Treshold
CTRL	Kontrola
CYP	Cytochrom P450
CYPOR	NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktasa
DBD	DNA Binding Domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
FXR	Farnesoidní X receptor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
HDL	High Density Lipoprotein
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LBD	Ligand Binding Domain
MDR	Multi Drug Resistence
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NF- κ B	Nukleární faktor kappa B
NLS	Nukleární lokalizační signál
NR	Nukleární receptor
P-gp	P-glykoprotein
pgPXR	Prasečí Pregnanový X receptor
PPAR α	Jaderné receptory aktivované proliferátory peroxisomů
PXR	Pregnanový X receptor
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoidní X Receptor
SDS	Dodecylsulfát sodný

SHR	Spontaneously Hypertensive Rat
SHR-CRP	Spontaneously Hypertensive Rat with Transgenous C-Reactive protein
STD	Standardní laboratorní dieta
TAG	Triacylglycerol
TBS	Tris Base Solution
UDP	Uridin difosfát
UTG	Uridin trifosfát
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Obsah

1. Úvod a cíle práce	12
2. Teoretická část	14
2.1 Biotransformace xenobiotik	14
2.1.1 Reakce první fáze biotransformace.....	15
2.1.2 Oxidace	15
2.1.3 Redukce	15
2.1.4 Hydrolýza.....	15
2.1.5 Reakce druhé fáze biotransformace	16
2.1.6 Transport xenobiotik a jejich metabolitů	16
2.2 Enzymy biotransformace xenobiotik	16
2.2.1 Cytochrom P450	17
2.2.2 Transportérové proteiny	20
2.2.3 Regulace biotransformačních enzymů	22
2.3 Studovaná léčiva	24
2.3.1 Fenofibrát.....	24
2.3.2 Silymarin.....	26
2.4 Modelové organismy ve farmakologii	28
2.4.1 Transgenní potkan SHR-CRP.....	29
2.4.2 Porovnání lidských a potkaních enzymů	29
3. Experimentální část.....	30
3.1 Biologický materiál a laboratorní vybavení	30
3.1.1 Biologický materiál a design experimentů	30
3.1.2 Chemikálie	30
3.1.3 Přístrojové vybavení	31
3.1.4 Kity	31
3.1.5 Primery.....	32
3.1.6 Protilátky.....	32
3.1.7 Spotřební materiál.....	32
3.2 Metody	33
3.2.1 Homogenizace tkání	33
3.2.2 Izolace a kvantifikace mRNA.....	33

3.2.3	Real-time PCR	33
3.2.4	Stanovení celkového proteinu.....	34
3.2.5	Kvantifikace proteinu	34
3.2.6	Statistické zpracování	36
4.	Výsledky	36
4.1	Izolace mRNA.....	36
4.2	Stanovení relativní genové exprese metodou Real-Time PCR.....	39
4.2.1	Abcb1a a Abcb1b.....	39
4.2.2	Cyp1a1	40
4.2.3	Cyp3a23	41
4.2.4	Nr1i2	42
4.3	Stanovení množství proteinu v tkáních metodou Western blot	42
4.3.1	ABCB1.....	43
4.3.2	CYP1A1	44
4.3.3	CYP3A.....	45
4.4	Diskuze.....	46
5.	Závěr	49
6.	Literatura.....	50

1. Úvod a cíle práce

V metabolismu xenobiotik existuje řada enzymů ovlivňujících absorpci, distribuci a eliminaci. Mezi takové patří například cytochromy P450 (CYP). Na tyto procesy však mohou mít vliv i jiné bílkoviny, například transportní proteiny, jejichž význam je v přenosu cizorodých látek přes plasmatickou membránu. Mezi takové patří ABC transportéry, z této skupiny zejména P-glykoprotein (P-gp), který hraje roli nejenom v rezistenci vůči farmakoterapii.

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteinové enzymy, které patří mezi jedny z nejvýznamnějších složek první fáze biotransformace xenobiotik. Jejich mechanismus spočívá v přeměně lipofilních substrátů na hydrofilnější, lépe vylučitelné produkty.

P-glykoprotein (P-gp) je prvním a zároveň nejprostudovanějším aktivním efluxovým transportérem. P-gp, kódovaný geny z podrodiny *Abcb,1* má vliv na absorpci a distribuci cizorodých látek. Jeho nadexprese může způsobit až selhání farmakoterapie vlivem relativního poddávkování léčivem.

Pregnanový X receptor je jaderným receptorem, který se od ostatních transkripčních faktorů liší svojí nízkou specifitou vůči ligandům. Aktivací tohoto nukleárního receptoru dochází ke zvýšení exprese některých cytochromů P450 i P-glykoproteinu.

Fenofibrát patří k léčivům využívaným při farmakoterapii dyslipidemií. Jedná se o syntetický derivát, jehož metabolit, kyselina fenofibrová, reguluje tvorbu enzymů podílejících se na metabolismu lipoproteinových částic.

Silymarin je extraktem z plodů ostropestřce mariánského. V praxi se využívá jako hepatoprotektivum. V různých studiích byl pozorován inhibiční vliv silymarinu na specifické cytochromy P450

Tato diplomová práce se zaměřuje na vliv fenofibrátu a silymarinu na expresi genů *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Cyp1a1*, *Cyp3a23* a *Nr1i2* v jaterní a ledvinové tkáni potkaního modelu SHR-CRP. Stanovení množství exprimované mRNA proběhlo metodou Real Time PCR (RT-PCR). Dále byl měřen vliv fenofibrátu a silymarinu na množství proteinu ABCB1, CYP1A1 a CYP3A ve stejných tkáních metodou Western blot.

Cílem teoretické části je vypracování literární rešerše na téma biotransformace xenobiotik, popis cytochromů P450 a transportních proteinů a jejich regulace. V teoretické části je dále charakterizován fenofibrát, silymarin a modelové organismy využité v experimentu. Experimentální část se věnuje vlastnímu pokusu – stanovení vlivu fenofibrátu, silymarinu a

kombinace obou substancí na expresi vybraných genů. Dále bylo stanoveno množství výše zmíněných proteinů metodou Western blot.

2. Teoretická část

2.1 Biotransformace xenobiotik

Každý existující organismus je neustále vystavován cizorodým sloučeninám, které mohou ovlivňovat jeho správnou funkci. Látky, které se v organismech běžně nevyskytují a nejsou využitelná jako zdroj energie ani pro syntézu biomolekul, se nazývají xenobiotika. Xenobiotika mohou být přírodního i syntetického původu. Přírodní xenobiotika jsou ve velké míře zastoupeny v potravě, či v nutraceuticích. Do syntetických xenobiotik lze zařadit různá léčiva či kosmetické přípravky, u kterých není aktivní látkou žádný přírodní extrakt. Jak přírodní, tak syntetická xenobiotika, mohou být organismy požívány záměrně i neúmyslně. U savců jsou cizorodé látky nejčastěji vpravovány do organismu gastrointestinálním traktem, dýchací soustavou či kůží. V každém případě představují pro organismus určitou zátěž a potenciální nebezpečí, a proto si většina eukaryotických organismů, včetně člověka, v průběhu evoluce vyvinula mechanismy odbourávání xenobiotik, bez kterých by byly cizorodé látky akumulovány v buňkách a mohly tak nevratně poškodit jejich funkci (Hodgson, 2010).

Metabolismus xenobiotik je souborem transportních a biotransformačních procesů katalyzovaných mnoha enzymy. Protože je většina xenobiotik lipofilní, v průběhu biotransformačních reakcí dochází ke změně jejich struktury a tím i charakteru. Produktem reakcí jsou, oproti původním sloučeninám, hydrofilní metabolity, které jsou, oproti lipofilním látkám, snadněji vylučovány (Skálová, 2017). U savců dochází k metabolismu xenobiotik zejména v endoplazmatickém retikulu hepatocytů, ale enzymy zprostředkovávající biotransformační reakce se vyskytují i v dalších tkáních, jako jsou buňky tenkého střeva, ledvin, či hematoencefalické bariéry (Doull a kol., 2013).

Biotransformaci xenobiotik lze rozdělit na děje první a druhé fáze. V první fázi dochází k redoxním a hydrolytickým reakcím, při kterých jsou zpřístupněny nebo přidány funkční skupiny na strukturu xenobiotika. Pokud již molekula cizorodé látky disponuje ve své struktuře volnou funkční skupinou, často rovnou podléhá reakcím druhé fáze. Příkladem takového léčiva je paracetamol, což je derivát fenolu (Švihovec, 2018). Děje druhé fáze biotransformace jsou závislé na makroergních molekulách a zahrnují reakce, při kterých xenobiotikum nebo jeho metabolit reaguje s endogenními sloučeninami za vzniku, oproti původnímu xenobiotiku, hydrofilnější konjugát (Skálová, 2017).

2.1.1 Reakce první fáze biotransformace

Děje první fáze biotransformace, také nazývány jako nesyntetické, zahrnují reakce, při nichž dochází k transformaci molekuly xenobiotika. Na cizorodé struktury vznikají, nebo jsou odhalovány, funkční skupiny, které umožňují následné navázání hydrofilních funkčních skupin ve druhé fázi biotransformace. Mezi základní reakce nesyntetické biotransformační fáze jsou řazeny reakce oxidační a redukční, dále hydrolýza, hydratace a izomerace (Skálová, 2017). Biotransformační reakce mohou probíhat pasivně, většinou jsou však katalyzovány enzymy podle typu reakce. Mezi nejdůležitější enzymatické systémy první fáze patří monooxygenasový systém cytochromů P450 (CYP), který je zodpovědný za přenesení atomu kyslíku molekulu xenobiotika, díky čemuž je produkt reakce polárnější oproti původnímu reaktantu. Dalšími enzymy podílejícími se na první fázi biotransformace jsou například flavinové monooxygenasy, aldehyddehydrogenasy, alkoholdehydrogenasy, a další (Hodgson, 2010).

2.1.2 Oxidace

V eukaryotních organismech jsou cizí látky transformovány zejména pomocí oxidačních reakcí, mezi které jsou řazeny procesy N- a S- oxidace, hydroxylace, O- a N- dealkylace, oxidační deaminace, oxidační desulfurace a epoxidace (Skálová, 2017, Hirt a Vorel, 2016).

2.1.3 Redukce

K redukci xenobiotik dochází, oproti oxidaci, v nižší míře, ale pro některé typy xenobiotik, jako jsou například nitrosloučeniny, jsou redukční reakce hlavní biotransformační cestou (Skálová, 2017).

2.1.4 Hydrolýza

Mezi xenobiotika, která mohou být metabolizována pomocí hydrolýzy, jsou řazeny estery, epoxidy, amidy, a další. Hydrolytické reakce mohou probíhat i bez katalýzy enzymem, ale většinou probíhají za přítomnosti hydrolas (Skálová, 2017).

2.1.5 Reakce druhé fáze biotransformace

Konjugální, také označována jako syntetická, je druhá fáze biotransformace, zahrnující reakce, při nichž jsou spojovány produkty první fáze biotransformace s endogenní sloučeninou. Tato molekula, tzv. konjugální činidlo, má většinou ve své struktuře jednu nebo více ionizovatelných skupin. Ke konjugaci činidla s xenobiotikem nebo jeho metabolitem je nutné dodání energie – konjugální činidlo musí být nejdříve aktivováno navázáním makroergního kofaktoru. Produktem reakce druhé biotransformační fáze, oproti původnímu xenobiotiku, zpravidla hydrofilnější, méně biologicky aktivní metabolit (Skálová, 2017). Mezi látky, které jsou obvykle využity jako konjugální činidla, patří kyselina glukuronová, glycin, cystein, acetylcystein, přičemž nejčastější jsou konjugáty xenobiotika s kyselinou glukuronovou, tzv. glukuronidy (Hirt a Vorel, 2016).

2.1.6 Transport xenobiotik a jejich metabolitů

Do nedávna se uváděla v rámci konceptu „ADMET“ (Absorpce, Distribuce, Metabolismus, Eliminace, Transport) k reakcím první a druhé fáze tzv. třetí fáze, která popisovala eliminaci a exkreci konečných produktů druhé fáze z buňky (Phang-Lyn a Llerena, 2020). V současné době se tyto procesy neřadí k metabolismu xenobiotik, nicméně se tyto děje významně podílí na absorpci, distribuci a eliminaci cizorodých sloučenin. Konjugátu z buňky představuje ochranný mechanismus organismu před nadměrnou kumulací cizorodých látek jeho buňkách. Transport je závislý na energii z makroergních molekul a je zprostředkován membránovými transportéry, mezi které patří například ATP-binding cassette transportéry (ABC). Nejznámějším příkladem ABC transportéru v této fázi je P-glykoprotein (P-gp) (Döring a Petzinger, 2014, Švihovec, 2018).

2.2 Enzymy biotransformace xenobiotik

Ve výše uvedeném textu již bylo nastíněno, že téměř všechny biotransformační reakce, kterými jsou xenobiotika metabolizována, jsou katalyzovány enzymy. Existují cizorodé látky, které se strukturně podobají molekulám organismem využívaných jako zdroj živin. Metabolismus takových látek může být katalyzován enzymy pro živiny či endogenní substráty. Jiná xenobiotika jsou metabolizována pomocí tzv. biotransformačních enzymů, které jsou určeny k usnadnění eliminace a detoxifikaci takových xenobiotik. V praxi se však

oba druhy enzymů podílí na odbourávání jak endogenních látek a živin, tak i na metabolismu xenobiotik, a proto se lépe biotransformační enzymy dělí podle fází, na kterých se podílí (Skálová, 2017). V rámci diplomové práce byly sledovány dva vybrané cytochromy P450 podílející se v první fázi metabolismu xenobiotik. Dále byl pozorován jeden ABC transportér, který ovlivňuje absorpci a distribuci cizorodých látek.

2.2.1 Cytochrom P450

Cytochromy P450 (CYP) zahrnují rozsáhlou skupinu hemoproteinů s monooxygenázovou aktivitou, s molekulovou hmotností kolem 45 kDa a jsou přítomny ve všech živých organismech, od archebakterií až po živočichy (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). Skupina získala označení P450 díky specifickému, tzv. Soretovu, absorpčnímu maximu redukované formy cytochromu v komplexu s oxidem uhelnatým při 450 nm, kterým se liší oproti jiným hemoproteinům, které mají absorpční maximum kolem 420 nm. CYP byly poprvé nalezeny v tkáních potkaních jater v roce 1954 jako buněčné pigmenty (Klingenberg, 1958; Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001), jejich mechanismus byl pak objasněn v roce 1963. CYP jsou klíčovými enzymy v metabolismu endogenních látek a xenobiotik (Cooper a kol., 1965). CYP jsou evolučně vysoce konzervované v sekvencích u vazebného místa pro hem. Enzym je složen z polypeptidového řetězce s navázaným protoporfyrinem IX, který obsahuje jako centrální atom železitý kation Fe^{3+} (Skálová, 2017).

CYP jsou monooxidázové enzymy, které jsou schopny vázat a štěpit vzdušný kyslík s tím, že jeden atom kyslíku je zabudován do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody. Zdrojem molekuly kyslíku ale nemusí být pouze vzdušný kyslík, nýbrž i různé organické hydroxyperoxydy, v jejichž přítomnosti CYP vykazují peroxidasovou aktivitu (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Skálová, 2017). Při reakcích CYP a substrátu jsou zapojeny i další proteiny. Za zmínku stojí například cytochrom b₅, či NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktasa (CYPOR). Tyto enzymy, společně s CYP, tvoří monooxygenasový systém (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

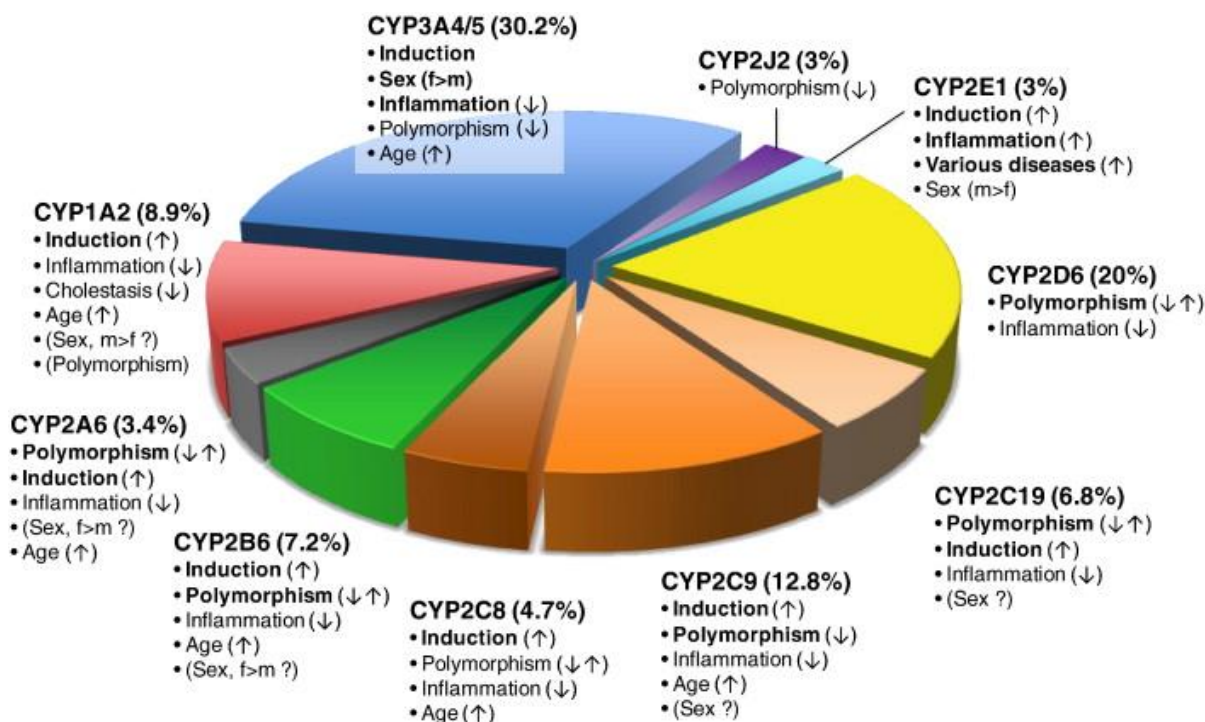
Množství a aktivitu CYP v buňkách lze ovlivnit podáním látky, se kterou daný enzym interaguje. Existují substance indukující expresi enzymů, nebo naopak inhibitory aktivity a exprese. Inhibující látky mohou a nemusí být substrátem pro daný enzym. Inhibice CYP je obvykle zvrtná, kdy dochází jen k dočasnému zastavení aktivity enzymu. V některých případech dochází k ireversibilní inhibici CYP, kdy vznikají metabolity schopné se pevně

navázat na daný CYP, čímž je způsobena nevratná ztráta enzymatické aktivity příslušného proteinu. Indukce exprese je způsobená aktivací transkripčních faktorů pro dané geny. Zvýšení mRNA zapříčiňuje zvýšení syntézy proteinu, což má za následek zrychlení metabolismu indukujících látek. Indukce metabolismu může zkomplikovat léčbu, protože zvýšením clearance lze hůře dosáhnout terapeutické koncentrace pro dané farmakum. Tento efekt nabírá účinnosti v řádu hodin až dní, protože je nutná syntéza nových enzymů. Naopak, k inhibici dochází téměř ihned, což vede k až toxické kumulaci léčiva v cytoplasmě (Lynch a Price, 2007).

Do dnešního dne je známo několik tisíc genů kódujících CYP. V lidském genomu jich bylo nalezeno 57, v lidských buňkách bylo identifikováno 35 isoform cytochromů P450, z čehož 18 je zapojeno do metabolismu xenobiotik (Skálová, 2017). Mnoho různých forem CYP se nachází v rostlinách, kde hrají roli v tvorbě sekundárních metabolitů (Bathe a Tissier, 2019). Vzhledem k faktu, že počet nově identifikovaných forem CYP stále roste, byla v roce 1996 zavedena nomenklatura založená na podobnosti primární struktury molekuly, následně jsou enzymy děleny do tzv. rodin. Existuje nadrodina CYP, kam patří všechny cytochromy. Následuje rodina, která je značena arabskou číslicí. Skupiny jsou zařazeny do stejné rodiny, pokud vykazují alespoň 40% homologii v aminokyselinové sekvenci apoproteinu. Do stejné podrodiny, která se značí velkým písmenem, patří cytochromy P450, jejichž aminokyselinová sekvence se shoduje z více než 60-70 %. Poslední podmnožinou je tzv. isoforma, která se opět značí arabskou číslicí a vyjadřuje rozdíly v aminokyselinové sekvenci (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). Isoformy enzymů se mohou lišit v selektivitě pro daný substrát, ale jen zřídka je daný substrát metabolizovatelný jen jednou isoformou cytochromu P450, v takovém případě jde o tzv. specifický substrát. Důležité je také zmínit, že zastoupení jednotlivých isoform se u různých organismů liší (Skálová, 2017).

V eukaryotických organismech se CYP vyskytují ve formě membránových proteinů, zejména na hladkém endoplasmatickém retikulu a v menší míře na membránách mitochondrií. Na úrovni tkání jsou u obratlovců CYP exprimovány zejména v hepatocytech, vyskytují se však i v dalších tkáních, jako jsou plíce, tkáň gastrointestinálního traktu, ledviny, buňky hematoencefalické bariéry, aj. (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). Dle Skálové se na metabolismu xenobiotik u člověka podílí 18 isoform CYP. Téměř všechny cizorodé látky jsou metabolizovány vlivem cytochromů rodiny 1-3, v menší míře ještě

CYP4. (Nebert a Russell, 2002). V rámci této diplomové práce byly vybrány dva cytochromy z podrodin 1A a 3A.



Obr. 1: Grafické znázornění procentuálního rozdělení významných isoform CYP v lidských hepatocytech. Faktory, které mají vliv na CYP. (Převzato z článku od Zangera a Schwaba, 2013). Symbol ↑ značí zvýšení aktivity, ↓ snížení aktivity, ↑↓ zvýšení a zároveň snížení aktivity. Překlad: Induction, indukce; inflammation, zánět; cholestasis, cholestáza; age, věk; sex, pohlaví; polymorphism, polymorfismus; various diseases, různé onemocnění.

2.2.1.1 CYP1A

Cytochromy z podrodiny 1A se u většiny savců vyskytují ve dvou formách, hepatální CYP1A2 a extrahepatální CYP1A1. Tvorbu CYP1A1 lze v hepatocytech indukovat cizorodými látkami, které obsahují polycyklické aromatické uhlovodíky. Tyto aromatické látky aktivují aryl-uhlovodíkový receptor (AhR), což je transkripční faktor pro genovou expresi CYP1. Vysoké množství CYP1A1 lze pozorovat například u kuřáků cigaret. V metabolismu léčiv je významnější CYP1A2, pomocí kterého je metabolizováno několik v praxi často užívaných léčiv. Patří sem aromatické aminy a heterocyklické sloučeniny, jako je například kofein, teofylin nebo paracetamol. Rodina CYP1A rovněž figuruje v metabolismu polutantů životního prostředí. Metabolity takových látek mohou být toxické a kancerogenní, a proto indukce enzymů CYP1A není žádána (Anzenbacher a Anzenba-

cherová, 2001). Nadměrná exprese CYP1A se projevuje zrychleným metabolismem některých léčiv transformovaných CYP1A, což má za efekt jejich slabší účinek (Skálová, 2017).

2.2.1.2 CYP3A

Proteiny podrodiny CYP3A jsou u člověka nejvýznamnějšími enzymy nadrodiny CYP. Proteiny jsou zapojeny do metabolismu většiny léčiv a steroidních látek. V lidském těle jsou nejvíce zastoupenými cytochromy P450, nacházejícími se zejména v játrech a GIT (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Nebert a Russell, 2002). Podle některých studií se CYP3A4 podílí na metabolismu až 50 % léčiv zavedených do klinické praxe (Shinkyo a Guengerich, 2011; Skálová, 2017). U člověka je nejsignifikantnějším enzymem právě CYP3A4, který disponuje obsáhlým spektrem léčiv. Zároveň jeho množství v játrech je ze všech cytochromů P450 nejvyšší a indukci exprese lze množství CYP3A4 navýšit až přes 60 % celkového proteinu (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

2.2.2 Transportérové proteiny

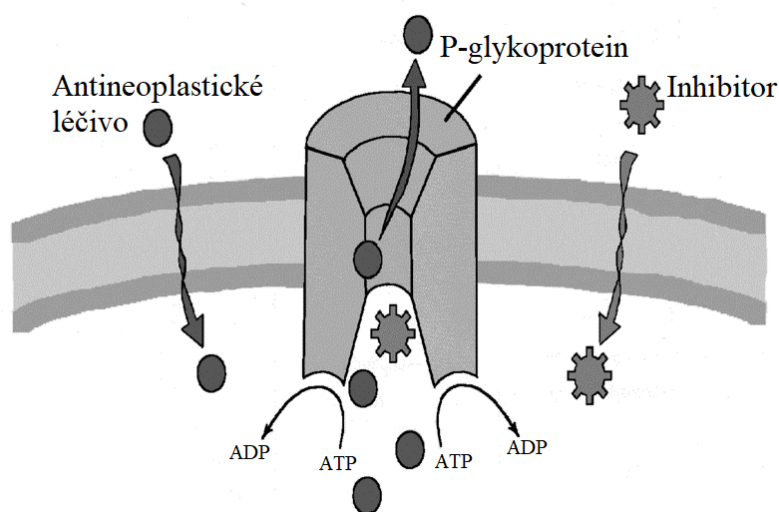
Většina lipofilních léčiv překonává membrány a vstupuje do buňky pomocí mechanismu volné difuze, kdy molekula farmaka prochází přes plasmalemu ve směru koncentračního gradientu. Tento proces probíhá nezávisle na energii. Existují však výjimky, které mají příliš velkou molekulu, či vysokou polaritu (např. penicilin). Mnoho léčiv také musí překonávat membránu proti koncentračnímu gradientu, a proto potřebují k jejímu překonání specifické proteiny, tzv. přenašeče. Přenašeče, nazývané také transportéry, jsou schopné přenosu látek přes plasmalemu za spotřeby energie (Švihovec, 2018). Mezi hlavní přenašečové proteiny patří tzv. ABC efluxní přenašeče (ATP-Binding Cassette transporters). Tyto proteiny jsou schopny přenášet substrát proti koncentračnímu gradientu transportované látky. ABC transportéry exportují xenobiotika ven z buněk, a protože se jedná o aktivní přenos, je při něm spotřebovávána energie ve formě ATP (Skálová, 2017). Do dnes bylo objeveno sedm skupin ABC proteinů označených ABCA až ABCG, které mají široké spektrum substrátů, steroidní látky, aminokyseliny a peptidy, léčiva, toxiny a jejich metabolity. Spektra podrodin ABC proteinů se vzájemně překrývají, xenobiotické substráty mohou rovněž kompetovat s endogenními látkami o vazebné místo na přenašeči. Významnou úlohou ABC přenašečů je efekt na absorpci, distribuci a exkreci xenobiotik a jejich

metabolitů (Dostálek, 2006). Prvním popsáním ABC proteinem byl v roce 1976 P-glykoprotein (Juliano a Ling, 1976). Tento protein byl také vybrán pro experimentální část této diplomové práce.

2.2.2.1 P-glykoprotein

P-glykoprotein (P-gp) je na ATP závislá transmembránová pumpa o velikosti 170 kDa. P-gp je kódovaný genem Multidrug Resistance 1 (MDR1), rovněž nazývaným ABCB1. P-gp je nejprostudovanějším, a jedním z nejvýznamnějších transportérů pro řadu xenobiotik. Název MDR1 vychází ze silné indukce exprese P-gp u nádorových buněk, které byly rezistentní vůči cytostatikům (Juliano a Ling, 1976). U člověka se vyskytují dva geny MDR1 a MDR2, ale za eflux léčiv je zodpovědný zejména MDR1. U hlodavců se nachází geny označované jako *mdr1a*, *mdr1b* a *mdr2*, ze kterých se na transportu léčiv účastní hlavně *mdr1a* a *mdr1b* (Potschka a kol., 2002).

Molekula P-gp je složena ze dvou symetrických polovin, které obsahují transmembránové domény složené z šesti α -šroubovicových úseků. Obě poloviny disponují hydrofilní doménou, kam je vázána molekula ATP. P-gp má tvar válcovitého kanálu, který je uzavřen na straně cytoplasmy. Xenobiotikum je navázáno na intracelulární doménu a poté je exkretováno dutinou ven z buňky (Callaghan, 1997).



Obr. 2: Schéma funkce P-gp. Některá léčiva mohou procházet plasmalemou difúzí nebo pomocí specializovaných influxních transportérů. Prvním krokem exkrece farmaka je rozpoznání xenobiotické látky, následuje hydrolyza ATP, která dodává energii efluxu substrátu pro P-gp (Převzato a přeloženo z článku Wal a kol., 2013).

Ze studií na myších, které byly alespoň na jeden z genů *mdr1* deficientní, byly pozorovány změny ve farmakokinetice a distribuci substrátů pro P-gp. Deficience neměla vliv na jiné aspekty, jako je délka života nebo celková životaschopnost pokusných jedinců. P-gp pomáhá eliminovat pro buňky toxické látky a předpokládá se, že hlavní fyziologickou funkcí P-gp je, společně s CYP, ochrana a detoxifikace buněk v tkáních po celém organismu podílejícím se na biotransformaci široké škály xenobiotik (Finch a Pillans, 2014).

P-glykoprotein je regulován v případě indukce prostřednictvím interakce xenobiotika s příslušnými jadernými receptory, k inhibici dochází vlivem zablokování vazebného místa na přenašeči. Xenobiotikum inhibující P-gp je obvykle substrátem pro transportér. Některé substráty pro P-gp mohou zároveň inhibovat CYP3A4, který je schopný vázat látky v podobném strukturním spektru, jako P-gp (Hanigan a kol., 2020).

2.2.3 Regulace biotransformačních enzymů

Ke správnému fungování metabolismu cizorodých látek je nutné, aby všechny procesy byly přísně regulovány. Výjimkou nejsou ani cytochromy P450, jejichž regulace probíhá několika mechanismy. Mezi významné mechanismy patří regulace translace mRNA, na úrovni proteinu pak aktivace nebo inhibice enzymu. Nejvýznamnějším mechanismem je však regulace exprese genů prostřednictvím transkripčních faktorů (Hodgson, 2010). Regulace exprese však neprobíhá pouhou vazbou transkripčního faktoru a sekvence nukleové kyseliny, ale vazbou proteinů, tzv. transkripčních kofaktorů, na vazebná místa transkripčního faktoru. Transkripční kofaktory mají regulační potenciál, ale nejsou schopny samy vázat specifické sekvence genetické informace (Bhattacharjee a kol., 2013). Mezi nejvýznamnější transkripční faktory patří tzv. jaderné receptory (Hodgson, 2010).

2.2.3.1 Jaderné receptory

Jaderné receptory, také nazývány jako nukleární (NR), jsou skupinou transkripčních faktorů aktivovatelných lipofilními ligandy. Funkce NR zahrnuje regulaci několika biologických procesů, do kterých patří metabolismus, homeostáza vývoj a reprodukce (Zuo a Wan, 2017).

Struktura bílkoviny NR sestává ze čtyř částí, modulátorové domény, DNA binding domény (DBD) na N-konci, ligand binding domény (LBD) na C-konci, a spojovací struktury mezi doménami, která nese nukleární lokalizační signál (NLS) (Giguère, 1999).

V současnosti je v lidském genomu známo 48 genů pro NR, z nichž několik reguluje expresi cytochromů P450 (Mangelsdorf a kol. 1995). Je známo, že exprese rodiny CYP1 je aktivována aryl uhlovodíkovým receptorem (AhR) exprese CYP3 může být aktivována několika NR, jako je například konstitutivní androstanový receptor (CAR) nebo pregnanový X receptor (PXR) (Pávek a Dvořák, 2008).

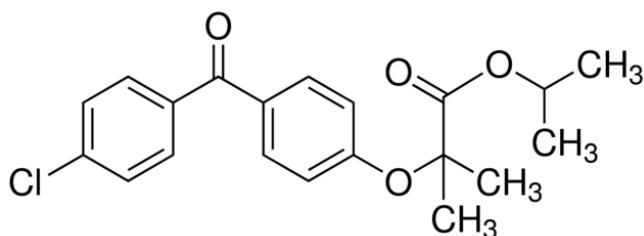
2.2.3.1.1 Pregnanový X receptor

Pregnanový X receptor, kódovaný genem Nr1i2, je klíčovým transkripčním faktorem pro lidský CYP3A4 a P-Gp. Společně s CAR se často označují jako „sirotčí“ NR, neboť u nich dosud nebyl identifikován fyziologický ligand, který by působil primárně přes CAR nebo PXR (Wilson a Kliewer, 2002). Na buněčné úrovni se vyskytuje zejména v jádře, v inaktivní formě se však může vyskytovat i v cytoplasmě. Na úrovni tkání se PXR vyskytuje hlavně v játrech, v menší míře pak v ledvinách, či tkáních tenkého a tlustého střeva. Oproti ostatním NR se PXR odlišuje nízkou specifitou vůči ligandům, které mohou mít různorodou chemickou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti. (Kliewer a kol. 2002). Při aktivaci PXR dochází ve většině případů k indukci exprese CYP a částečně i P-Gp, čímž je ovlivněn metabolismus i exkrece cizorodých látek (Pfrunder a kol. 2003).

2.3 Studovaná léčiva

2.3.1 Fenofibrát

Fenofibrát je syntetický derivát kyseliny fenoxi-isomáselné, podle nomenklatury IUPAC nazývaný jako propan-2-yl 2-[4-(4-chlorobenzoyl)fenoxi]-2-methylpropanoát, se sumárním vzorcem $C_{20}H_{21}ClO_4$. Molekula fenofibrátu s molární hmotností 360,8 g/mol spadá do skupiny fibrátů, které jsou obecně využívány ve farmakoterapii dyslipidemií (Pubchem, 2021). Fenofibrát patří do 3. generace fibrátových léčiv a v současnosti je nejčastěji předepisovaným fibrátem při farmakoterapii dyslipidemií, primární hypercholesterolemií, či hypertriglyceridemií (Sidhu a Tripp, 2020).



Obr. 3: Strukturální vzorec fenofibrátu

2.3.1.1 Fyzikální vlastnosti

Fenofibrát je pevná látka vyskytující se ve formě bílého prášku s bodem tání při 79-82 °C. Je dobře rozpustný v nepolárních rozpouštědlech, jako je aceton či chloroform, s rostoucí polaritou rozpouštědel se schopnost rozpustit se zhoršuje a ve vodě je téměř nerozpustný (Pubchem, 2021). Jako léčivo je fenofibrát podáván perorálně ve formě tablet či kapslí (Sidhu a Tripp, 2020). Kvůli velmi nízké biologické dostupnosti bývá fenofibrát často technologicky upravován, využívá se například tzv. supermikronizace. (Gajdová a Urbánek, 2013).

2.3.1.2 Metabolismus fenofibrátu

Fenofibrát má nízkou biologickou dostupnost, protože je špatně rozpustný ve vodě, naopak je dobře rozpustný v nepolárních rozpouštědlech, a proto jeho absorpci ovlivňuje strava (Gajdová a Urbánek, 2013). Fenofibrát rozpuštěný v tucích je rovnoměrně absorbován

v celém gastrointestinálním traktu. V játrech je při první fázi biotransformace zcela hydrolyzován na farmakologicky aktivní formu, kyselinu fenofibrovou. Kyselina fenofibrová je v druhé fázi konjugována s kyselinou glukuronovou, nebo je karbonylová skupina kyseliny fenofibrové nejdříve redukována. Redukovaná forma kyseliny fenofibrové je poté glukuronidována (Caldwell, 1989). Studie metabolismu fenofibrátu a kyseliny fenofibrové nenaznačují interakce s CYP3A4 ani CYP1A2. Kyselina fenofibrová může interagovat s cyklosporinem, čímž může dojít ke vzniku nežádoucích nefrotoxických produktů (Tziomalos a Athyros, 2006).

2.3.1.3 Mechanismus účinku fenofibrátu

Fenofibrát je schopný vazby s PPAR α (angl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha) a jeho následné aktivace. Aktivovaný PPAR α se váže na transkripční faktor nazývaný retinoid-X-receptor (RXR). Vazbou PPAR α na RXR vzniká heterodimer, který se váže na PPAR α rozpoznanou sekvencí DNA. Důsledkem těchto vazeb je potlačení nebo indukce syntézy proteinů podílejících se na metabolismu lipidů. K nejvýznamnějším inhibičním efektům fibrátů obecně patří útlum syntézy *apolipoproteinu C III*, inhibitoru lipoproteinových lipáz. K efektům fibráty indukované exprese patří zvýšení syntézy lipoproteinové lipázy, díky čemuž jsou rychleji odbourávány lipoproteinové částice s vysokým podílem triacylglyceridů (VLDL). Důsledkem zvýšené syntézy těchto enzymů je snížení triacylglyceridů (TAG) v krevním oběhu. Zároveň dochází ke snížení koncentrace tzv. Low Density Lipoproteins (LDL). Dalším signifikantním efektem fibráty indukované exprese je zvýšení syntézy *apolipoproteinů A I*, který je klíčovou složkou tzv. High Density Lipoprotein (HDL). Částice HDL na sebe v krevním řečišti váží volný cholesterol (Soška, 2006).

2.3.1.4 Indikace

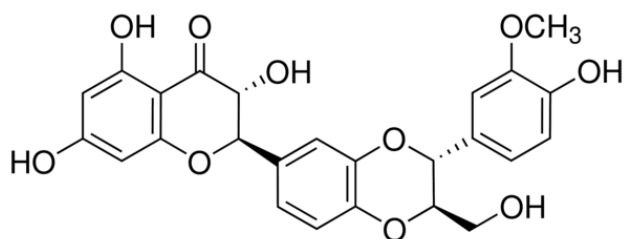
Fenofibrát je indikován pacientům s hypertriglyceridemií, dyslipidemií a hypercholesterolemii. K optimálnímu efektu je vhodné, aby pacient pravidelně cvičil a udržoval si stravu s nízkým obsahem cholesterolu a živočišných tuků (Sidhu a Tripp, 2020). Často bývá pacientům předepisována kombinace fenofibrátu se statinem, která má cílit na zvýšení HDL a snížit TAG (Gajdová a Urbánek, 2013).

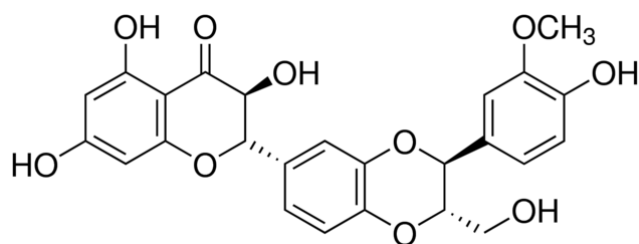
2.3.1.5 Nežádoucí účinky fenofibrátu

Studie zabývající se terapií fibráty prokázaly, že se jedná o bezpečná farmaka. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou potíže gastrointestinálního traktu, průjem a žaludeční nevolnost, zvýšené riziko elevace transamináz, cholestázy a vznik pankreatidy. Dalším nežádoucím účinkem je svalová slabost, či ve vzácných případech úbytek svalové hmoty, protože dochází k indukci kreatinkinázy. K méně častým negativním efektům fenofibrátu patří bolest hlavy a ztráta libida (Gajdová a Urbánek, 2013).

2.3.2 Silymarin

Silymarin je přírodní extrakt z plodů ostropestřce mariánského *Silybum marianum*. Extrakt se skládá ze směsi flavanolignanů, kde hlavní aktivní složkou je silybin, který se zde vyskytuje ve dvou diastereoizomerech značených A a B. Molekula silybinu, dle názvosloví IUPAC nazývána (2R,3R)-2-[(2R,3R)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-4H-chroman-4-on, s molekulárním vzorcem $C_{25}H_{22}O_{10}$, má molekulární hmotnost 482,4 g/mol. V praxi je silybin využíván právě jako součást standardizovaného extraktu silymarinu pro jeho hepatoprotektivní účinky. Mnohá studia *in vitro* i *in vivo* potvrzují hepatoprotektivní vlastnosti silybinu. V některých *in vitro* studiích byl dokonce demonstrován pozitivní vliv na proliferaci rakovinných buněk, a to v případě rakovinných buněk lidské prostaty, děložního čípku, tlustého střeva aj. (Pubchem, 2021).





Obr. 5: Strukturální vzorec Silybinu B

2.3.2.1 Fyzikální vlastnosti

Silymarin je pevná látka ve formě bílého prášku s bodem tání kolem 167 °C (Pubchem, 2021). Rozpustnost je dobrá v nepolárních rozpouštědlech, jako je chloroform nebo dimethylsulfoxid (DMSO), v polárních rozpouštědlech, například ve vodě, je téměř nerozpustný (Pubchem, 2021). Nízká rozpustnost se projevuje i na nízké hodnotě biologické dostupnosti. V praxi se využívají pro zlepšení biologické dostupnosti různé metody, jako je například mikronizace nebo konjugace extraktu s fosfolipidem za vzniku fytosomu (Das a kol., 2013).

2.3.2.2 Metabolismus silymarinu

Silymarin se užívá perorálně a podléhá biotransformaci, zejména její druhé fázi. V první fázi dochází k přeměně silybinu na jeho O-demethylované metabolity, která je zprostředkována cytochromem CYP2C8 z rodiny cytochromů P450. Silybin a produkty první fáze poté podléhají reakcím druhé fáze biotransformace, mezi které patří glukuronizace a sulfatace. Glukuronizace je zprostředkována UDP-glukuronosyltransferázami (UGT) 1A1, 1A6, 1A7, 1A9, 2B7 a 2B15, a sulfatace probíhá pomocí enzymů sulfotransferáz. Rozsáhlá a zejména rychlá druhá fáze biotransformace silymarinu a jeho špatná rozpustnost ve vodě je považována, za hlavní příčinu jeho nízké biologické dostupnosti (Xie a kol., 2019).

Eliminace volného i konjugovaného silymarinu *in vivo* probíhá zejména v enterohepatickém oběhu. Glukuronizovaný silybin je ve střevě rozštěpen v β -glykosidových vazbách a je znovu absorbován do oběhu (Wen a kol., 2008).

2.3.2.3 Mechanismus účinku silymarinu

Silymarin je využíván zejména jako hepatoprotektivum a antioxidant. V *in vitro* experimentech byla zjištěna schopnost silymarinu inhibovat cytochromy P450 v lid-

ských jaterních mikrozomech, kde nejvýraznější inhibice probíhala u cytochromů CYP3A4 a CYP2C9, avšak ve studii nebyly použity klinicky relevantní koncentrace do 1,5 μM (Beckmann-Knopp a kol., 2000). V *in vitro* podmínkách byla prokázána inhibice exprese mRNA genu pro protein ABCB1 v buněčných liniích KCL22 a K562. Podle této studie silymarin ovlivňuje biologickou dostupnost některých protirakovinných léčiv (Delmas a kol., 2020)

2.3.2.4 Indikace

Silymarin byl využíván pro jeho léčivé účinky již ve starověkém Egyptě a dodnes je užíván při terapiích gastrointestinálního traktu a jater. Využívá se jako hepatoprotektivum při intoxikaci alkoholem či jinými toxiny (Křen a kol., 2005).

Silymarin je možné užívat bez předpisu jako doplněk stravy pro prevenci před jaterními obtížemi ve formě čajů, drcených semen, či tablet, jako je například Flavobion nebo Legalon (Pubchem, 2021).

2.3.2.5 Nežádoucí Účinky

Mezi nežádoucí účinky silymarinu patří zejména gastrointestinální obtíže, jako je nevolnost či průjem. Mezi velmi vzácné nežádoucí účinky patří astmatický záchvat (Karimi a kol., 2011).

2.4 Modelové organismy ve farmakologii

Modelové organismy jsou významným prostředkem ke studiu biologických fenoménů. Z poznatků získaných podrobným zkoumáním jevů na modelových organismech lze vyvodit mechanismy a vlastnosti i na jiných organismech. Ideální modelový organismus disponuje vlastnostmi, které umožňují získání reprezentativních dat v krátkém časovém rozmezí. Důležitý je tedy například krátký životní cyklus organismu, vysoké množství potomků, finanční nenáročnost pro chov jedinců v laboratorních podmínkách, aj. Podstatným aspektem je vhodnost modelu pro zkoumaný fenomén. Farmakologie je obor zabývající se vlivem léčiv na živé organismy, potažmo na člověka. Vzhledem k časté homologii lidských genů s geny modelových organismů jsou často využívány modelové organismy z podkmene obratlovců, a to hlavně hlodavci či primáti (Ankeny a Leonelli, 2021). V rámci této diplomové práce bylo využito tkání unikátního modelového organismu,

transgenního spontánně hypertenzního potkana s exprimovaným lidským genem pro C-reaktivní protein CRP (SHR-CRP).

2.4.1 Transgenní potkan SHR-CRP

Spontánně hypertenzní potkan (SHR) je laboratorní zvíře, které má geneticky podmíněný vysoký krevní tlak. Model bývá často využíván ke studiu kardiovaskulárních chorob a metabolického syndromu. SHR má původ v Japonsku, konkrétně v Kyotu, kde v roce 1963 publikovali článek o chovu kmene SHR. SHR byl vytvořen opakovaným inbredním pářením potkanů z kmene Wistar. Výsledkem byl kmen SHR. Samcům SHR starých 25 týdnů byl naměřen průměrný systolický tlak 206 mmHg, u samic 193 mmHg. U SHR potkanů byl také pozorován nárůst hodnot krevního tlaku s přibývajícím věkem, což u původních potkanů Wistar pozorováno nebylo (Okamoto a Aoki, 1963).

Transgenní kmen SHR-CRP má navíc exprimován lidský gen pro CRP. CRP bývá u lidí využíván jako marker pro akutní fázi zánětu. V současnosti bývá CRP spojován i s dalšími fyziologickými procesy, jako je vznik kardiovaskulárních chorob, aj. (Torzewski a kol., 2014). CRP se podílí na vzniku metabolického syndromu zvyšováním oxidativního stresu na tkáně, jejichž nesprávná funkce metabolický syndrom způsobuje (Pravenec a kol. 2011).

2.4.2 Porovnání lidských a potkaních enzymů

Proteiny modelových organismů jsou do jisté míry homologní s proteiny lidskými. Tato práce je zaměřena na CYP1A1, CYP3A a P-Gp. Potkaní protein CYP1A1 sdílí podobnost s lidským CYP1A1 83 % a rovněž se vyskytuje v různých tkáních v poměrech podobných distribuci CYP1A1 u člověka. U potkana se CYP1A1 vyskytuje zejména v tenkém střevě. Do podrodiny CYP3A patří u potkana enzymy s označením CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23 a 3A62. z těchto isoform vyniká CYP3A23, který je identický s potkaním CYP3A1. Další isoformy CYP3A jsou u potkanů specifické podle pohlaví. U samců jsou specifickými enzymy CYP3A2 a CYP3A18, kdežto u samic je dominantní isoformou CYP3A9 (Martignoni a kol., 2006). V roce 2004 byla u potkanů objevena nová isoforma, CYP3A62, která sdílí vysokou homologii s lidským CYP3A4 (Matsubara a kol, 2004).

3. Experimentální část

3.1 Biologický materiál a laboratorní vybavení

3.1.1 Biologický materiál a design experimentů

V rámci experimentální části této diplomové práce bylo pracováno jaterními a ledvinnými tkáněmi samců spontánně hypertenzních potkana s transgenním C-reaktivním proteinem (SHR-CRP).

3.1.1.1 Design experimentů

V experimentu figurovalo celkem 31 vzorků tkání získaných ze samců potkana SHR-CRP. Před extrakcí orgánů byli jedinci rozděleni do čtyř skupin. Sedm zvířat (Ctrl, n=7) bylo krmeno standardní laboratorní dietou (STD). Další, osmičlenné skupiny, byly živeny experimentální dietou. Experimentální dieta byla vždy složena z STD, navíc obohacena o 1) fenofibrát 25 mg/kg tělesné hmotnosti (t. h.) 2) mikronizovaný silymarin 300 mg/kg t. h. 3) kombinaci látek. Chov zvířat probíhal 4 týdny, po uplynutí doby byla zvířata utracena a jejich orgány byly odebrány pro analýzu exprese mRNA a proteinu.

3.1.2 Chemikálie

- Deionizovaná voda
- RNase free voda
- 2-merkaptoetanol (Sigma–Aldrich, Německo), Lot.: BCBF9538V
- Bromfenolová modř (Sigma–Aldrich, Německo), Lot.: 37H3708
- BCA Protein Assay Reagent A (Thermo–Fischer, USA), Lot.: HE103444
- BCA Protein Assay Reagent B (Thermo–Fischer, USA), Lot.: HE104697
- Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (Bio-Rad, USA), Lot.: L001649A
- Protease inhibitor cocktail tablety (Roche Diagnostics, Německo), Lot.: 10618200
- RIPA Lysis Buffer System VIAL 1 (Santa Cruz, USA), Lot.: J2017
- RIPA Lysis Buffer System VIAL 2 (Santa Cruz, USA), Lot.: G1318
- Tris Base Solution (TBS) (Santa Cruz, USA), Lot.: C1519
- Tris Base Solution + Tween (TBS+T) (Santa Cruz, USA), Lot.: G1919

3.1.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy XP205 Delta Range (Mettler Toledo, USA)
- Třepačka OS-10 (Biosan, Lotyšsko)
- Homogenizátor Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA)
- Laminární box biohazard (Merci, Česká Republika)
- Laminární box (Biotech, Česká republika)
- Spektrofotometr INFINITE M200 (TECAN, Švýcarsko)
- Spektrofotometr NanoPhotometer® N60 (Implen, Německo)
- Automatizovaný Termocykler LightCycler 1536 (Roche, Německo)
- pH metr RS-232C (SHOTT, Česká Republika)
- Temná komora s ccd kamerou G:Box (Syngene, Velká Británie)
- Vortex IKA MS3 Basic (Sigma–Aldrich, Německo)
- Trans-blot® turbo™ (BIO-RAD, USA)
- Inkubátor DRY BATH INCUBATOR (Major Science, USA)
- Míchačka Sunflower mini shaker (P-LAB a.s., Česká Republika)
- Centrifuga Eppendorf mini spin (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5804R (Eppendorf, Německo)
- Chlazená centrifuga Z323K (Hermle LaborTechnik, Německo)
- Chlazená centrifuga BR4i (Jouan, Francie)

3.1.4 Kity

- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA)
- QIAshredder (Qiagen, USA)
- EvoScript Universal cDNA Master (Roche, Německo),
- LightCycler® 1536 DNA Probes Master (Roche, Německo)
- Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- BCA Protein Assay Reagent Kit (ThermoFischer Scientific, USA)

3.1.5 Primery

- Abcb1a TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo-Fischer, USA), kat. č. Rn01639253_m1
- Abcb1b TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo-Fischer, USA), kat. č. Rn01636836_m1
- Cyp1a1 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo-Fischer, USA), kat. č. Rn00487218_m1
- Cyp3a23 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo-Fischer, USA), kat. č. Rn03062228_m1
- Nr1i2 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo-Fischer, USA), kat. č. Rn00583887_m1
- Hprt1 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo-Fischer, USA), kat. č. Rn01527840_m1

3.1.6 Protilátky

- ABCB1 Rabbit monoclonal (Abcam, Velká Británie), Lot.: GR217576-38
- CYP1A1 Rabbit monoclonal (Abnova, Tchaj-wan), Lot.:060497SK
- CYP3A Mouse monoclonal (Santa Cruz, USA), Lot.: C1411
- GAPDH Mouse monoclonal (Santa Cruz, USA), Lot.: K0113
- Sekundární protilátka Goat anti Rabbit (Sigma-Aldrich, Německo), Lot.: A05H5
- Sekundární protilátka Rabbit anti Mouse (Sigma-Aldrich, Německo), Lot.: 063K4813

3.1.7 Spotřební materiál

- Mikrozkušavky Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Falkonky 12ml a 50 ml VWR® (VWR international, Česká Republika)
- Mini-PROTEAN® TGX™ gely (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Špičky Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad Laboratories, USA)

- Homogenizační zkumavky Precellys CK28 (Bertin Technologies, USA), Lot.: 190423-804
- Homogenizační zkumavky Precellys CK14 (Bertin Technologies, USA), Lot.: 190916-859

3.2 Metody

3.2.1 Homogenizace tkání

Ze zamražené tkáně byl odebrán vzorek, pro stanovení proteinu asi 1 g, který byl rozmražen, promyt a vložen do RIPA pufru (Santa Cruz Biotechnology, USA) v případě izolace proteinu. Pro izolaci RNA bylo odebráno cca 30 mg tkáně, která byla promyta a vložena do RLT pufru, jenž je součástí kitu RNeasy Plus Mini (Qiagen, USA). Homogenizace vzorku byla provedena v homogenizátoru Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA) a homogenát byl stočen v centrifuze. Ze stočeného homogenátu byl následně využit supernatant pro další zpracování.

3.2.2 Izolace a kvantifikace mRNA

Ze zhomogenizovaného a stočeného vzorku byla izolována mRNA pomocí RNeasy Plus Mini Kitu (Qiagen, USA) se standardním postupem, dle protokolu výrobce. Pomocí spektrofotometru NanoPhotometer N60 (Implen, Německo) byla změřena koncentrace a čistota získané mRNA, která dále byla využita pro reverzní transkripci na cDNA. Proces reverzní transkripce byl proveden dle postupu uvedeného výrobcem pomocí EvoScript Universal cDNA Master kitu (Roche, Německo). Výsledné vzorky cDNA byly ihned zamrazeny, aby nedošlo k jejich denaturaci.

3.2.3 Real-time PCR

V rámci této diplomové práce byla pro stanovení množství mRNA využita technologie PCR v reálném čase (RT-PCR), která je založena na řetězové polymerázové reakci cDNA. RT-PCR disponuje, kromě klasického termocykleru, fluorometrem, který vždy na konci cyklu zaznamenává fluorescenčně značené sondy navázané na amplifikovanou sekvenci

DNA (ThermoFischer Scientific, 2021). V rámci experimentu byly zvoleny TaqMan sondy, které disponují vysokou specifitou.

Metoda RT-PCR je založena na opakujícím se cyklu replikace cDNA, na jehož konci je zaznamenán nárůst fluorescence, nazývaný Cycle of Treshold (Ct). Ct je zaznamenáváno k následnému výpočtu relativního množství cDNA, potažmo mRNA. V rámci tohoto experimentu bylo množství počítáno relativně, tj. porovnávala se fluorescence skupin ovlivněných experimentální dietou vůči kontrolní skupině. Výpočet rozdílů v expresi mRNA byl proveden metodou delta-delta Ct (Livak a Schmittgen, 2001).

3.2.4 Stanovení celkového proteinu

Celkový protein v homogenátu byl stanoven bicinchoninovou metodou v 96jamkových destičkách. Homogenát byl ředěn 100krát fosfátovým pufrém. 25 μ l naředěného vzorku homogenátu bylo v jedné jamce smícháno s činidly BCA Protein Assay Reagent Kit (ThermoFischer Scientific, USA) o objemu 200 μ l. Destička se vzorky a směsí z kitu byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut v inkubátoru Dry bath inkubátor (Major Science, USA). Po uplynutí 30 minut byla stanovena absorbance na spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko). Koncentrace proteinu byla odečtena z kalibrační křivky stanovené ze standardu bovinního sérového albuminu (BSA). Vzorky s proteinem byly následně naředěny v pufru (62,5 mM TRIS, 10 % glycerol, 4 % merkaptoethanol, 2 % SDS, bromfenolová modř, pH 6,8), tak, aby množství proteinu ve vzorku odpovídalo 1 mg/ml.

3.2.5 Kvantifikace proteinu

Kvantitativní stanovení proteinů pro vybrané enzymy a transportér, společně s porovnáním jejich množství mezi skupinami, bylo provedeno metodou založenou na separaci proteinů pomocí tzv. SDS-PAGE elektroforézy. Při separaci proteinů touto metodou byly použity komerční gely s přídavkem dodecylsírany sodného (SDS), který mění pH separovaných proteinů. Proteiny ve vzorku získávají záporný náboj a při zapojení elektrického proudu putují směrem k anodě (kladné elektrodě). Rychlost pohybu proteinů v gelu závisí na jejich elektroforetické mobilitě v gelové matici, která zahrnuje zejména velikost molekuly. Rychlost přesunu molekul je také ovlivněna hustotou použitého gelu (Kurien and Scofield, 2006).

Po ukončení elektroforézy byly gely s rozseparovanými proteiny vyjmuty z elektroforetické vany a proteiny byly přeneseny na membránu. Membrána s proteiny je poté několikrát promyta od nečistot (zbytků gelu, aj.). Následně je membrána inkubována v roztoku se specifickou primární protilátkou pro stanovovaný protein. Množství navázané protilátky závisí na množství proteinu ukotveného na membráně a také na množství primární protilátky v roztoku. Na primární protilátku je následně navázána sekundární protilátka, která je většinou konjugována s enzymem, který umožňuje vizualizaci celkového komplexu. Většinou se jedná o křenovou peroxidázu. Vizualizace probíhá přidáním chemiluminiscenčního substrátu pro křenovou peroxidázu a signál je detekován pomocí vhodného zařízení. Množství proteinu je vypočítáno na základě intenzity a velikosti zóny, tzv. bandu, kde se protein nachází. Obvykle je výpočet prováděn pomocí vhodného softwaru (Kurien a Scofield, 2006). V rámci této diplomové práce byla metoda kvantifikace cílových proteinů doplňková pro data exprese mRNA.

V rámci tohoto experimentu byla separace proteinů provedena v elektroforetickém systému Mini-PROTEAN Tetra Cell s komerčními gely Mini-PROTEAN® TGX™ gely (Bio-Rad Laboratories, USA). Elektroforéza byla zahájena s počátečním napětím 100 V a po uplynutí doby 10 minut bylo napětí zvýšeno na cca 140 V. Napětí bylo regulováno tak, aby výsledný proud oscilloval kolem 0,08 A. Separace proteinů byla ukončena, až čelo elektroforézy doputovalo asi 0,5 cm od hranice gelu. Okamžitě po vypojení elektrického proudu byly gely vyjmuty a přeneseny na membránu Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, USA). Přenos proteinů na membránu byl proveden pomocí přístroje Trans Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, USA), který disponuje programem přímo pro daný typ membrány. Membrány byly nastříhány podle velikosti gelu, tak, aby nebyl odstříhnut žádný proteinový band, a následně promyty v TBS pufru na míchačce. TBS bylo během 15 minut 3krát měněno. Po promytí v TBS byly membrány blokovány v odstředěném mléce po dobu dvou hodin. Po uplynutí doby byly membrány řádně promyty v TBS+tween pufru a následně inkubovány v příslušné primární protilátce. Membrány byly inkubovány při 4 °C na míchačce až do dalšího dne. Po ukončení inkubace byly membrány několikrát propláchnuty v TBS+Tween a poté inkubovány 30 minut v sekundární protilátce. Po ukončení inkubace v sekundární protilátce byly membrány v TBS+Tween. Promytá membrána byla nanášena na podložku a na její povrch byl rovnoměrně nanášen Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, USA). Okamžitě po nanášení luminolového substrátu byla podložka vložena do temné komory s ccd kamerou G-box a pomocí programu GeneSys

(Syngene, Velká Británie) byla zhotovena fotografie. Kvantifikace proteinových bandů byla stanovena pomocí programu GeneTools from Syngene (Syngene, Velká Británie).

3.2.6 Statistické zpracování

Statistická analýza byla zpracována pomocí parametrického testu ANOVA v softwaru Statistica 14.0 (Tibco, USA). Významnost mezi kontrolou a jednotlivými skupinami byla porovnána pomocí post hoc Bonferonniho testu. Statisticky významné hodnoty byly při hodnotě $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1 Izolace mRNA

mRNA byla z homogenizovaných tkání potkanů SHR-CRP izolována za využití kitu RNeasy® Plus Mini (Qiagen, USA) a její čistota a koncentrace byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoPhotometer® N60 (Implen, Německo) viz. tabulka 1 v jaterní tkáni, tabulka 2 zobrazuje hodnoty z ledvin.

Tabulka 1: Čistota a koncentrace izolované mRNA z jaterní tkáně potkanů SHR-CRP. Stanovení parametrů proběhlo použitím spektrofotometru N60 (Implen, Německo).

Skupina	Č. vzorku	A _{260/280}	A _{260/230}	Koncentrace [ng/ul]
Kontrola	1	2,10	2,323	920,48
	2	2,144	2,235	2053,1
	3	2,164	1,951	2876,1
	4	2,135	2,215	2880,8
	17	2,138	2,325	1234,5
	18	2,182	2,399	2404,7
	19	2,184	2,142	2089,9
Fenofibrát	5	2,128	2,291	2376
	6	2,157	2,324	3040,9
	7	2,075	2,405	1269,5
	8	2,253	2,218	987,76
	20	2,203	2,258	4297,2
	21	2,212	2,298	831,6
	22	2,209	2,254	833
	23	2,198	1,922	490,84
Silymarin	9	2,162	2,315	2080,8
	10	2,185	2,432	1930,8
	11	2,158	2,314	1704,9
	12	2,184	2,173	2091,3
	24	2,169	1,984	311,88
	25	2,147	2,219	1028,8
	26	2,188	2,192	1379,1
	27	2,295	1,737	1076,6
Fenofibrát + Silymarin	13	2,196	2,089	3393,4
	14	2,19	2,345	3460
	15	2,169	2,183	3328,4
	16	2,181	2,376	2658,2
	28	2,167	2,289	831,64
	29	2,167	1,906	1423,9
	30	2,183	1,922	1279,2
	31	2,176	2,27	1405,6

Tabulka 2: Čistota a koncentrace izolované mRNA z ledvinné tkáně potkanů SHR-CRP. Stanovení parametrů proběhlo použitím spektrofotometru N60 (Implen, Německo).

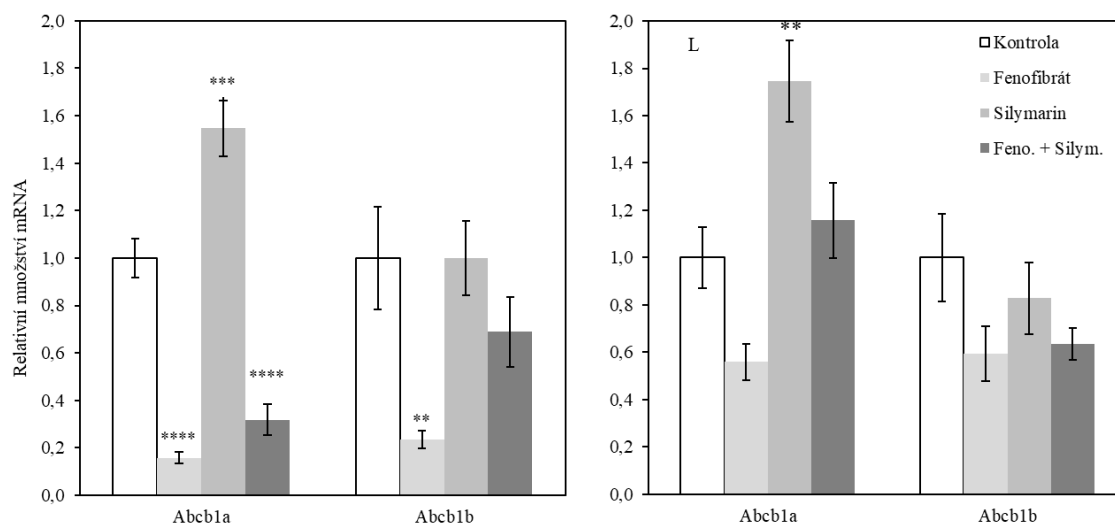
Skupina	č. vzorku	A _{260/280}	A _{260/230}	Koncentrace [ng/ul]
Kontrola	1	2,18	2,107	513,16
	2	2,179	2,274	463,16
	3	2,167	2,032	255,52
	4	2,151	2,282	278,8
	17	2,194	2,18	716,44
	18	2,148	2,332	1540,8
	19	2,234	2,267	1072,3
Fenofibrát	5	2,149	2,308	384,16
	6	2,192	2,346	640,08
	7	2,189	2,26	681,52
	8	2,131	1,989	319,24
	20	2,141	1,934	2259
	21	2,189	2,204	907,2
	22	2,158	2,087	666,36
Silymarin	23	2,106	2,314	1077,8
	9	2,122	2,236	332,96
	10	2,178	2,331	906,76
	11	2,121	2,23	326,24
	12	2,122	2,15	355,32
	24	2,184	2,103	573,2
	25	2,137	1,981	320,4
Fenofibrát + Silymarin	26	2,188	1,784	388,32
	27	2,184	2,272	893,68
	13	2,168	1,842	379,24
	14	2,189	1,994	665,44
	15	2,162	2,012	299,84
	16	2,17	1,828	421,32
	28	2,174	2,301	790,32
29	2,169	2,205	795,84	
30	2,15	1,966	454,72	
31	2,038	2,215	1155,2	

Izolovaná mRNA byla podstoupena reverzní transkripci na cDNA za využití kitu EvoScript Universal cDNA Master. Z roztoku s izolovanou mRNA bylo na reverzní transkripci použito takové množství, aby byl přepsán 1 µg mRNA. Získaná cDNA byla využita pro RT-PCR experimenty prováděnými za použití automatizovaného termocyklu LightCycler 1536 (Roche, Německo). Přístroj detekoval změny v hodnotách fluorescence, které byly zapsány v hodnotách Ct. Získané Ct hodnoty byly využity pro výpočet relativního množství mRNA metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak a Schmittgen, 2001). Výsledné hodnoty byly vztaženy a normalizovány ke kontrolnímu genu Hprt1.

4.2 Stanovení relativní genové exprese metodou Real-Time PCR

Při experimentu byl testován vliv fenofibrátu, silymarinu a kombinace těchto látek na změnu exprese mRNA genů pro P-gp (Abcb1a, Abcb1b), vybrané CYP (Cyp1a1, Cyp3a23), a genu pro pregnanový X receptor (Nr1i2) v jaterní a ledvinové tkáni potkanů SHR-CRP. Vybrané enzymy a transportér se podílejí na biotransformaci xenobiotik.

4.2.1 Abcb1a a Abcb1b



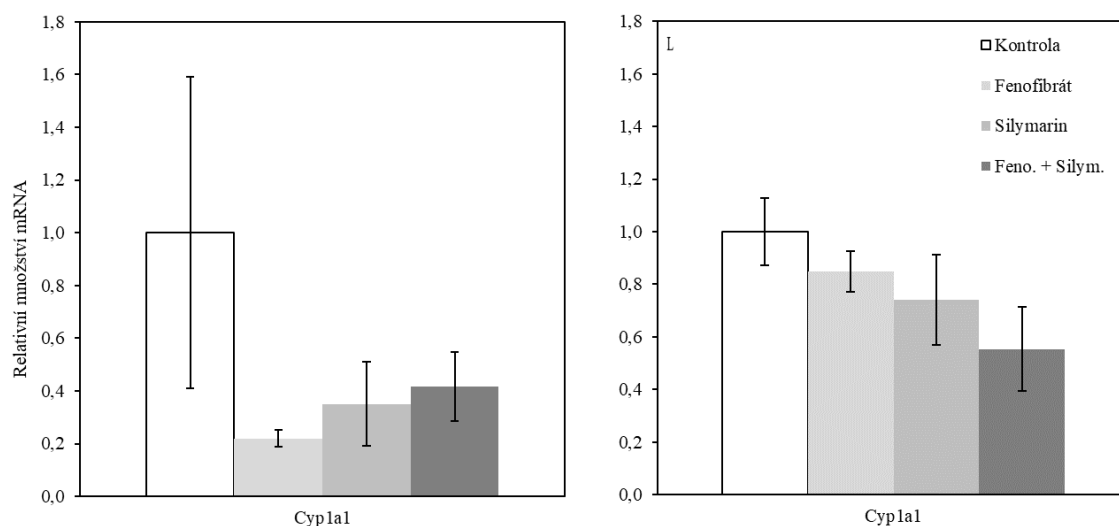
Graf 1: Expese mRNA transportéru Abcb1a a Abcb1b v jaterní tkáni (vpravo) a v ledvinné tkáni (vlevo, označeno písmenem L). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní chyba průměru, $n \geq 7$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vůči kontrolní skupině. Fen. + Silym. – kombinace fenofibrátu a silymarinu.

V grafu 1 jsou zobrazeny změny v množství mRNA genů *Abcb1a* a *Abcb1b* v jaterní a ledvinné tkáni. Nejvýraznější změny byly pozorovány v experimentální dietě obohacené o fenofibrát, který v jaterní tkáni statisticky signifikantně snížil expresi *Abcb1a* o 84 % oproti kontrolní skupině ($p < 0,0001$), exprese *Abcb1b* byla snížena o 76 % ($p < 0,01$). V ledvinách byla rovněž pozorována downregulace fenofibrátem oproti kontrole, ale výsledky nejsou statisticky významné.

U skupiny ošetřené silymarinem byla v játrech pozorována statisticky významná upregulace genu *Abcb1a*, jehož exprese byla zvýšena o 55 % oproti kontrole ($p < 0,001$). Tento trend byl pozorován i v ledvinách, kde množství exprimované mRNA oproti kontrole vzrostlo o 75 % ($p < 0,01$). V expresi genu *Abcb1b* neproběhla v případě jaterní tkáně žádná změna, v ledvinách došlo k down-regulaci o 17 % oproti kontrole, naměřené hodnoty jsou však statisticky insignifikantní.

Kombinace látek způsobila statisticky významné snížení množství mRNA jaterního genu *Abcb1a* o 68 % ($p < 0,0001$). V ledvinách došlo ke statisticky nevýznamnému vzrůstu mRNA o 16 %. Gen *Abcb1b* byl v obou tkáních statisticky nevýznamně down-regulován, v játrech o 31 % a v ledvinách o 37 % oproti kontrolním skupinám.

4.2.2 Cyp1a1



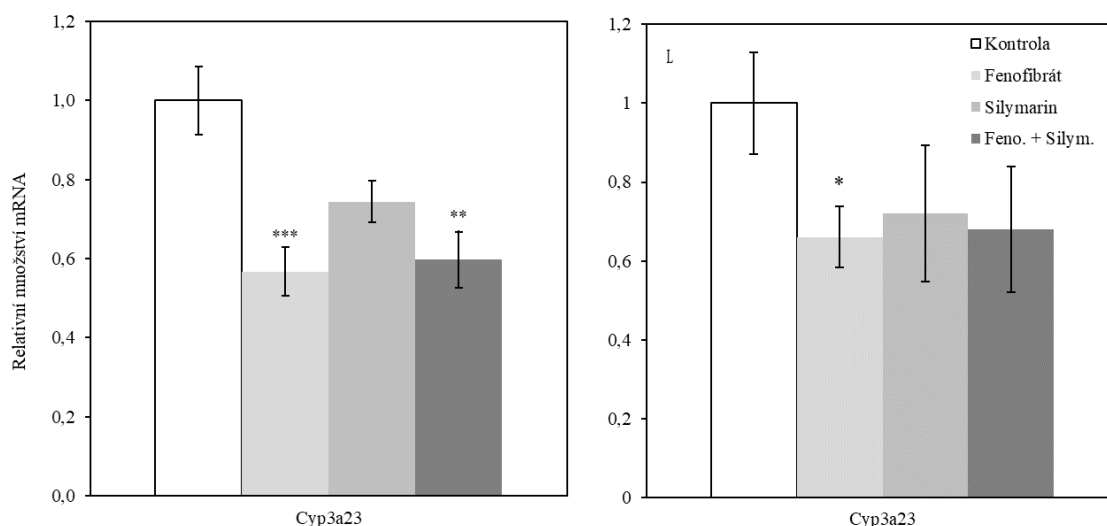
Graf 2: Expresie mRNA cytochromu P450 Cyp1a1 v jaterní tkáni (vpravo) a v ledvinné tkáni (vlevo, označeno písmenem L). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm standardní chyba průměrů, $n \geq 7$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vůči kontrolní skupině. Feno. + Silym. – kombinace fenofibrátu a silymarinu.

V grafu 2 jsou zobrazeny hodnoty mRNA genu Cyp1a1 v játrech (vpravo) a v ledvinách (vlevo). V grafu lze pozorovat nejvýraznější down-regulaci Abcb1a v jaterní tkáni ošetřené fenofibrátem o 78 %, oproti tomu v ledvinách proběhlo pouze mírné snížení exprese o 15 %.

Množství mRNA Cyp1a1 v tkáních ošetřených silymarinem bylo v játrech sníženo o 65 % oproti kontrole a v ledvinách o 26 %.

Kombinace fenofibrátu a silymarinu způsobila v játrech, oproti samostatně podávaným látkám, nejmírnější down-regulaci o 58 % oproti kontrole. V ledvinné tkáni naopak došlo k největšímu poklesu exprese Cyp1a1 o 45 %. Žádná z naměřených hodnot mRNA genu Cyp1a1 však nevykazovala statistickou významnost.

4.2.3 Cyp3a23



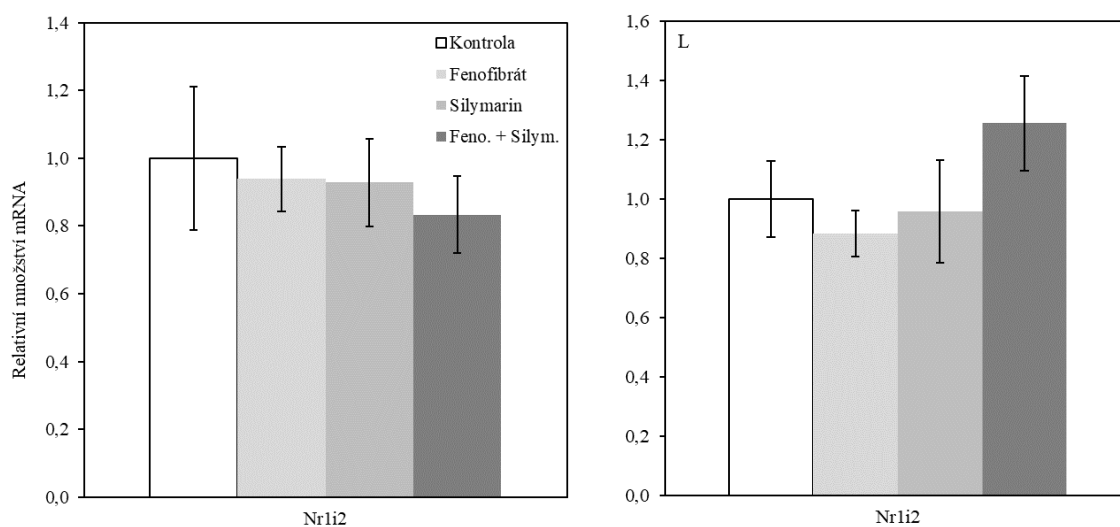
Graf 3: Exprese mRNA cytochromu P450 Cyp3a23 v jaterní tkáni (vpravo) a v ledvinné tkáni (vlevo, označeno písmenem L). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní chyba průměrů, $n \geq 7$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vůči kontrolní skupině. Fen. + Silym. – kombinace fenofibrátu a silymarinu.

V grafu 3 jsou zobrazeny změny v množství mRNA genu Cyp3a23 v jaterní a ledvinné tkáni. Nejvýraznější změny byly pozorovány v experimentální dietě obohacené o fenofibrát, který v jaterní tkáni statisticky signifikantně snížil expresi Cyp3a23 o 44 % oproti kontrolní skupině ($p < 0,001$), V ledvinách došlo ke statisticky významnému snížení exprese mRNA fenofibrátem o 34 % ($p < 0,05$).

Tkáně ošetřené silymarinem vykazovaly téměř stejnou down-regulaci Cyp3a23, konkrétně v játrech o 26 % a v ledvinách o 28 % oproti kontrole. Získané hodnoty nejsou statisticky významné.

Kombinace fenofibrátu a silymarinu způsobila statisticky významné snížení množství mRNA jaterního Cyp3a23 o 40 % ($p < 0,01$). V ledvinách došlo ke statisticky nevýznamnému poklesu mRNA o 32 %.

4.2.4 Nr1i2



Graf 4: Expresa mRNA jaderného receptoru Nr1i2 v jaterní tkáni (vpravo) a v ledvinné tkáni (vlevo, označeno písmenem L). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm standardní chyba průměrů, $n \geq 7$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vůči kontrolní skupině. Feno. + Silym. – kombinace fenofibrátu a silymarinu.

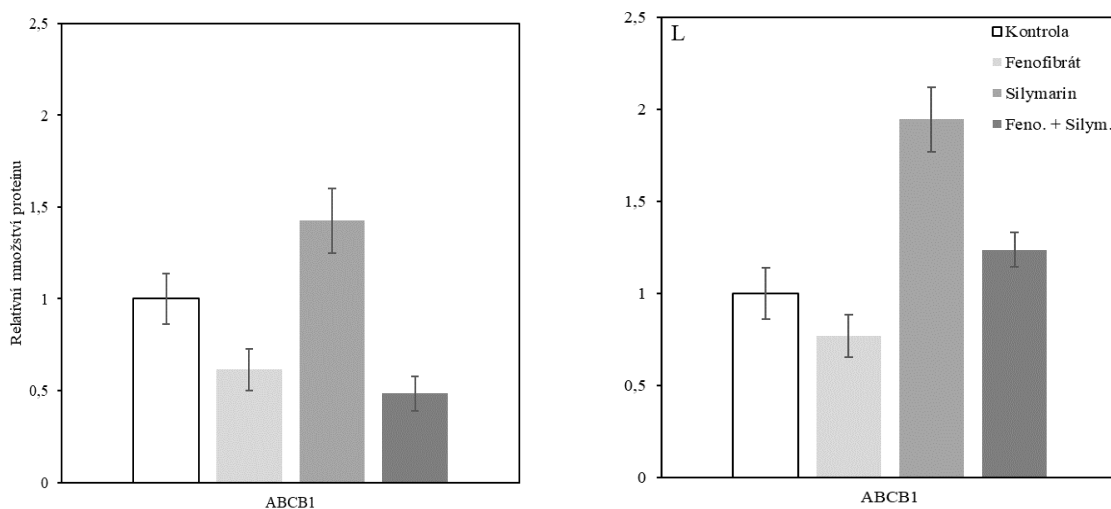
V grafu 4 jsou znázorněny vypočítané hodnoty exprese mRNA genu pro jaderný receptor Nr1i2. Hodnoty nevykazují statistickou signifikanci a rovněž nevykazují výrazné změny vůči kontrole.

4.3 Stanovení množství proteinu v tkáních metodou Western blot

V rámci této diplomové práce bylo provedeno stanovení množství proteinu ABCB1, CYP1A1, CYP3A v jaterních a ledvinových tkáních potkaního modelu SHR-CRP, jakožto doplnění dat z RT-PCR. Jako referenční protein byl zvolen Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), jehož množství se mezi skupinami ošetřenými různými

dietami neliší. V datech získaných touto metodou nebyla pozorována žádná statistická signifikance.

4.3.1 ABCB1

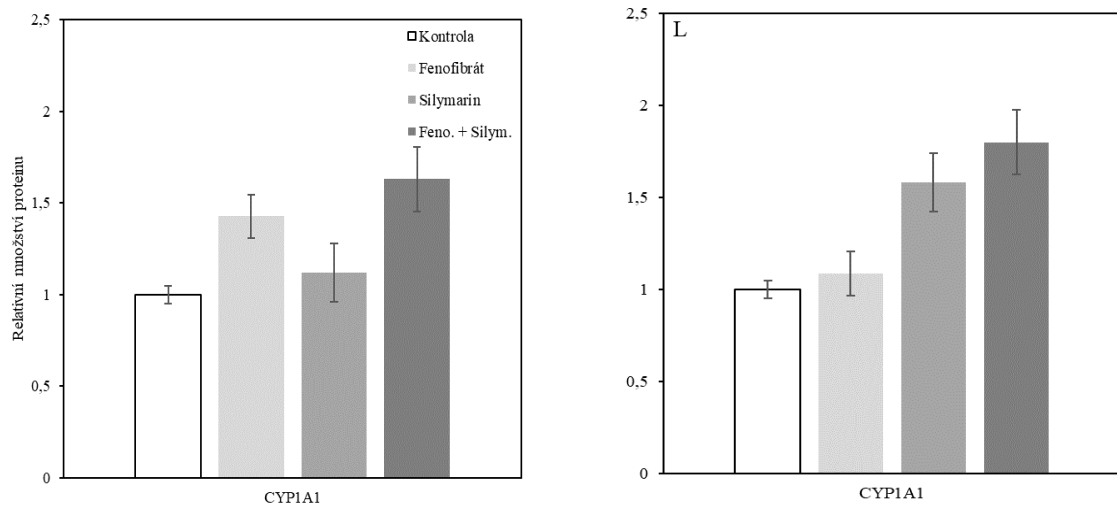


Graf 5: Množství proteinu ABCB1 v játrech (vpravo) a ledvinách (vlevo, označeno písmenem L). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní chyba průměru, $n \geq 7$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vůči kontrolní skupině. Feno. + Silym. – kombinace fenofibrátu a silymarinu.

V grafu 5 je znázorněno relativní množství proteinu ABCB1 získaného z homogenátu jaterní tkáně (vpravo) a ledvinné tkáně (vlevo, označené písmenem L). Výsledné hodnoty nejsou statisticky významné. V grafech je patrný podobný efekt použitých látek na množství jaterního ABCB1 a ledvinného ABCB1. Množství proteinu bylo podáváním fenofibrátu sníženo o 39 % v játrech a o 23 % v ledvinách.

Experimentální dieta obohacená o silymarin množství proteinu ABCB1 zvýšila v játrech o 42 % a v ledvinách o 94 % oproti kontrole. Ve skupině ošetřené kombinací látek došlo ke snížení množství proteinu ABCB1 v játrech o 52 %, v ledvinách naopak došlo k 23% zvýšení množství proteinu ABCB1 oproti kontrolní skupině. Ani jedna hodnota však není statisticky významná.

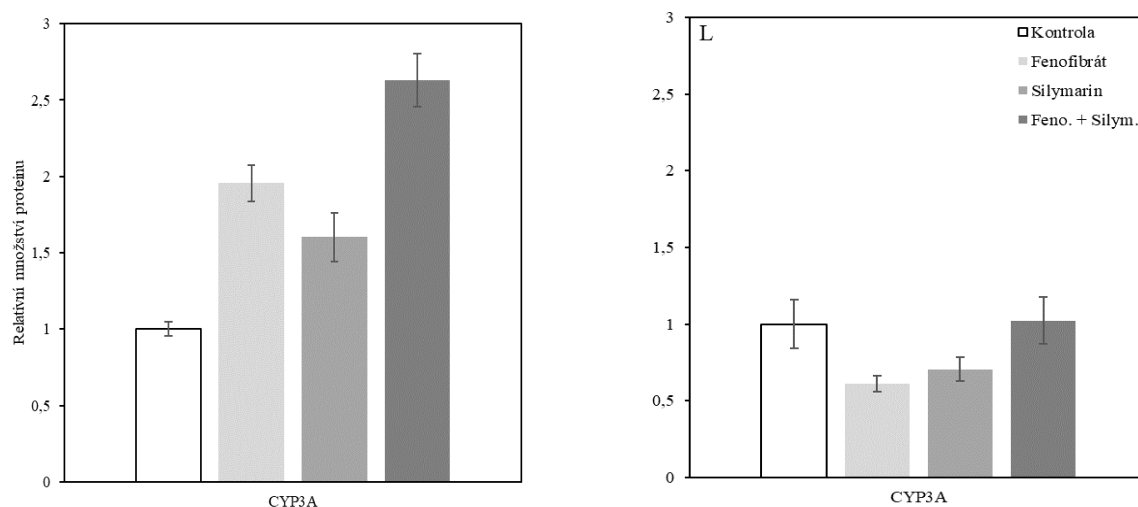
4.3.2 CYP1A1



Graf 6 Množství proteinu CYP1A1 v játrech (vpravo) a ledvinách (vlevo, označeno písmenem L). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm standardní chyba průměrů, $n \geq 7$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vůči kontrolní skupině. Feno. + Silym. – kombinace fenofibrátu a silymarinu.

V grafu 6 jsou vyobrazena stanovená množství proteinu CYP1A1 v játrech a v ledvinách, viz. legenda. Skupina ošetřená fenofibrátem vykazuje statisticky nevýznamný nárůst množství CYP1A1 o 42 % v játrech a o 8 % v ledvinách oproti kontrole. Množství CYP1A1 bylo naopak více ovlivněno v ledvinách, kde vzrostlo o 58 % oproti kontrole. U skupiny ošetřené kombinací látek byl pozorován nárůst CYP1A1 u obou tkání, v játrech o 62 % a v ledvinách o 79 % oproti kontrole. Získané hodnoty však nedisponují statistickou významností.

4.3.3 CYP3A



Graf 7: Množství proteinu CYP3A v játrech (vpravo) a ledvinách (vlevo, označeno písmenem L). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm standardní chyba průměrů, $n \geq 7$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vůči kontrolní skupině. Fenofibrát + Silymarin – kombinace fenofibrátu a silymarinu.

V grafu 7 lze pozorovat markantní, avšak statisticky insignifikantní, rozdíl mezi množstvím proteinu CYP3A v játrech a ledvinách. Fenofibrát způsobil v játrech zvýšení množství CYP3A o 95 % oproti kontrole, naopak v ledvinách došlo k úbytku proteinu o 39 %. V jaterní tkáni došlo u skupiny ošetřené silymarinem k nárůstu množství proteinu CYP3A o 60 % oproti kontrole, v ledvinách došlo k 30% úbytku proteinu. Kombinace látek v obou tkáních způsobila nárůst množství proteinu. V jaterní tkáni došlo k nárůstu o 162 % oproti kontrole.

4.4 Diskuze

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovení vlivu fenofibrátu, silymarinu a kombinace těchto látek na expresi mRNA a proteinu vybraných cytochromů P450, které se podílí na biotransformaci xenobiotik, a transportéru P-glykoproteinu, ovlivňujícím absorpci, distribuci a eliminaci toxických látek v organismu. Pro experiment byla zvolena metoda RT-PCR pro měření exprese mRNA a Western blot pro stanovení množství proteinu v tkáních. Pro experiment byly zvoleny tkáně potkaního modelu SHR-CRP, konkrétně jaterní a ledvinová tkáň.

ABCB1 transportní protein, často nazývaný P-glykoprotein, který významně ovlivňuje biologickou dostupnost, distribuci a také exkreci cizorodých látek. U potkanů je kódován geny *Abcb1a* a *Abcb1b*. V rámci diplomové práce na pokusných SHR-CRP potkanech byl pozorován významný vliv fenofibrátu na expresi jaterní mRNA *Abcb1a*, u kterého došlo k 84% snížení exprese ($p < 0,0001$). Pozorována byla i down-regulace *Abcb1b* o 76 % ($p < 0,01$). Snížení exprese těchto genů byla pozorována i v případě ledvinové tkáně, ale získané hodnoty postrádají statistickou významnost. Jak fenofibrát samotný, tak v kombinaci se silymarinem, došlo k významné down-regulaci sledované mRNA. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky pracoviště pozorovanými na HHTg potkanech. V rámci citované studie byl samcům hereditárně hypertriglyceridemickým potkanům podáván fenofibrát v dávce 100 mg a 25 mg na kg tělesné hmotnosti (Poruba a kol., 2019). Dosavadní studie neprokázaly u P-gp významné inhibiční účinky vlivem fenofibrátu. Některé studie, hlavně ty, kde jsou předmětem studia buněčné linie, však poukazují na mírnou down-regulaci ABCB1 transportéru (Yamazaki a kol., 2008). Účinek fenofibrátu na P-gp může být klinicky významný, kvůli podstatnému efektu P-gp na omezení biologické dostupnosti, distribuci a exkreci léčiv (Montesinos a kol., 2014). Některé recentní studie poukazují i na exkreci lipidů prostřednictvím P-gp (Aye a kol., 2009). Zjištěné výsledky mohou mít významný dopad na souběžné podávání fenofibrátu s jinými léčivy, která jsou substráty P-gp. Teoreticky může docházet ke zvýšení jejich biologické dostupnosti a kumulace vlivem snížené exkrece. Potenciálně může docházet také k distribuci léčiv do jinak oddělených kompartmentů, jako např. CNS. Avšak pro posouzení klinického dopadu, je potřeba provést ideálně farmakokinetické studie při souběžném podávání obou léčiv.

U skupiny ošetřené silymarinem byla pozorována up-regulace exprese genu *Abcb1a* o 55 % oproti kontrolní skupině ($p < 0,001$), u genu *Abcb1b* neproběhla oproti kontrole žádná

statisticky významná změna. V předchozích studiích na potkanech Wistar byl pozorován indukční efekt silymarinu na různé ABC transportéry (Večeřa a kol., 2011). Ve skupině ošetřené kombinací obou látek došlo ke statisticky významnému snížení exprese mRNA v genu *Abcb1a*, jehož detekované množství mRNA bylo o 68 % méně, než u kontrolní skupiny ($p < 0,0001$). Měření exprese mRNA v ledvinách ukázalo statisticky významné změny exprese genů *Abcb1a* ve skupině ošetřené silymarinem, jehož mRNA vzrostlo o 75 % oproti kontrole ($p < 0,01$). Důsledkem up-regulace těchto genů může být změna farmakokinetiky jiných léčiv interagujících s P-gp, omezení distribučních procesů a případně zvýšená exkrece. Avšak klinická významnost tohoto nálezu se zdá být malá. V rámci diplomové práce byla provedena analýza změny množství proteinu P-gp metodou Western blot. Naměřené hodnoty proteinu ABCB1 nejsou statisticky významné, avšak v grafu lze pozorovat podobnost mezi množstvím mRNA *Abcb1a* a množstvím proteinu ABCB1 v jednotlivých skupinách. Rozdíl byl pozorován v ledvinách ošetřených kombinací látek, kde došlo k mírnému zvýšení množství ABCB1.

CYP1A1 je enzym, který je zapojen do reakcí první fáze metabolismu xenobiotik, jehož substráty jsou látky obsahující ve své molekule aromatické uhlovodíky. CYP1A1 se účastní například metabolismu teofylinu, různých flavonoidů, či polynenasycených mastných kyselin. V experimentu na buněčné linii lidského prsního adenokarcinomu MDA-MB-231 ošetřených fenofibrátem bylo pozorováno snížení aktivity enzymu CYP1A1, z čehož se dá předpokládat, že v jaterní tkáni dojde ke změnám v expresi mRNA (Nguyen a kol., 2017). Hodnoty získané v experimentální části diplomové práce ukazují u genu *Cyp1a1* 78% pokles u skupiny ošetřené fenofibrátem, ale výsledky jsou statisticky nevýznamné. Důvodem je vysoká biologická variabilita mezi zkoumanými jedinci. U skupiny ošetřené silymarinem došlo ke snížení exprese genu *Cyp1a1*, podobně jako byla pozorována down-regulace proteinu CYP1A1 v jaterní tkáni potkaního modelu Wistar (Kiruthiga a kol., 2013). Snížení exprese *Cyp1a1* a snížení množství jeho proteinu může být významné pro farmakokinetiku léčiv (např. riociguat nebo granisetron), které jsou substrátem pro CYP1A1 (Lang a kol., 2019). Získaná data nejsou statisticky významná kvůli vysoké biologické variabilitě vzorků. U stanoveného množství proteinu CYP1A1 nebyla pozorována korelace mezi expresí mRNA, zároveň nebyly ani získány statisticky významné výsledky.

Gen *Cyp3a23* je u potkanů identický s genem *Cyp3a1* a kóduje protein CYP3A1. Jedná se o hlavní jaterní formu cytochromů P450 3A. V RT-PCR experimentu byla pozorována statisticky významná down-regulace genu *Cyp3a23* u skupiny ošetřené fenofibrátem o

43 % ($p < 0,001$) a kombinací léčiv o 40 % ($p < 0,01$) v játrech. Ve studii vlivu kyseliny fenofibrové na farmakokinetiku a farmakodynamiku warfarinu byl pozorován inhibiční vliv na CYP2C6 a CYP1A2, přičemž došlo i k omezení metabolismu warfarinu (Guo a kol., 2018). Existují články o možných inhibičních účincích fenofibrátu na cytochromy P450, ale dosud nebylo známo o statisticky významné down-regulaci mRNA Cyp3a23. V ledvinné tkáni došlo k statisticky významné down-regulaci Cyp3a23 ve skupině ošetřené fenofibrátem, kde došlo k down-regulaci o 34 % oproti kontrole ($p < 0,05$). U ostatních hodnot nebyla pozorována žádná statisticky významná změna. Podobně, jako u Cyp1a1 a jeho proteinu, může být fenofibrát významný v kombinaci s jiným léčivem, které je substrátem pro CYP3A1. Může dojít ke zvýšení biologické dostupnosti a zpomalení jeho exkrece.

Gen Nr1i2 kóduje nukleární pregnanový X receptor (PXR), který se podílí na regulaci exprese genů biotransformačních enzymů a transportérů. Mezi nejvýznamnější enzymy regulovanými PXR patří lidský CYP3A4, který patří k nejdůležitějším, léčiva metabolizujícím, enzymům v lidském těle, dále pak CYP2B6, či CYP2C9 (Chen a kol., 2015). K významným transportním proteinům regulovaným PXR patří P-gp. Indukce exprese P-gp prostřednictvím PXR byla prokázána například ve studii prasečího PXR (pgPXR) v hematoencefalické bariéře, kde byla pozorována up-regulace P-gp aktivací pgPXR Rifampicinem a Hyperforinem (Ott a kol., 2009). Interakcí xenobiotika s PXR dochází většinou k up-regulaci genů biotransformačních enzymů a částečně i transportních proteinů, čímž může dojít k významnému ovlivnění farmakokinetických interakcí léčiva v organismu (Pávek a Dvořák, 2008). V této diplomové práci nebyly pozorovány statisticky významné změny v expresi Nr1i2 oproti kontrolní skupině. Fenofibrát ani Silymarin nejsou, dle literatury, ligandy PXR. Fenofibrát je ligandem jaderného receptoru PPAR α (Toda a kol., 2003) a Silymarin interaguje s farnesoidním X receptorem (FXR) a nukleárním faktorem kappa B NF- κ B (Gu a kol., 2016).

5. Závěr

Cíle, které byly stanoveny, byly splněny. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše, jejíž tématy byly procesy a enzymy zapojené do biotransformace xenobiotik, další proteiny ovlivňující distribuci xenobiotik, popis fenofibrátu, silymarinu a popis laboratorních modelů využívaných ve farmakologii.

Experimentální část byla členěna na stanovení změn exprese mRNA genů *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Cyp1a1*, *Cyp3a23* a *Nr1i2* v jaterní a ledvinné tkáni metodou RT-PCR, a dále stanovení množství proteinu ABCB1 (P-gp), CYP1A1 a CYP3A metodou Western blot. Výsledky ukazují, že fenofibrát snižuje v játrech i ledvinách expresi mRNA všech sledovaných genů. Silymarin snižuje množství exprimované mRNA genů pro oba pozorované cytochromy P450, ale statisticky významně zvyšuje expresi genu *Abcb1a*. Zvýšením exprese P-gp může dojít ke změnám farmakokinetiky jeho substrátů a tím ke změně jejich farmakokinetických vlastností. Důsledkem může být riziko lékových interakcí. Kombinací fenofibrátu a silymarinu byla statisticky významně snížena exprese mRNA genů *Abcb1a* a *Cyp3a23* v játrech, ale inhibice proběhla mírněji než v experimentální dietě obohacené o samotný fenofibrát.

6. Literatura

ANKENY, Rachel A. a Sabina LEONELLI. *Model Organisms: Elements in the Philosophy of Biology* [online]. Cambridge: Cambridge University Press, 2021 [cit. 2021-7-12]. ISBN 9781108742320. Dostupné z: doi:DOI: 10.1017/9781108593014

ANZENBACHER, P. a E. ANZENBACHEROVÁ. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001, **58**(5), 737-747. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/PL00000897

AYE, Irving L.M.H., Ambika T. SINGH a Jeffrey A. KEELAN. Transport of lipids by ABC proteins: Interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2009, **180**(3), 327-339 [cit. 2021-8-2]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2009.04.012

BATHE, Ulschan a Alain TISSIER. Cytochrome P450 enzymes: A driving force of plant diterpene diversity: A driving force of plant diterpene diversity. *Phytochemistry*. 2019, **161**, 149-162. ISSN 0031-9422.

Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.003>

BECKMANN-KNOPP, Svane, Stephan RIETBROCK, Roland WEYHENMEYER, Ronald H. BOCKER, K. Tobias BECKURTS, Werner LANG, Miriam HUNZ a Uwe FUHR. Inhibitory Effects of Silibinin on Cytochrome P-450 Enzymes in Human Liver Microsomes. *Pharmacology and Toxicology* [online]. 2000, **86**(6), 250-256 [cit. 2021-7-12]. ISSN 0901-9928. Dostupné z: doi:10.1111/j.0901-9928.2000.860602.x

BHATTACHARJEE, Soumya, Kaushik RENGANAATH, Rajesh MEHROTRA a Sandhya MEHROTRA. Combinatorial Control of Gene Expression. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**(2013), 1-11 [cit. 2021-7-26]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/407263

- CALDWELL, John. The Biochemical Pharmacology of Fenofibrate. *Cardiology* [online]. 1989, **76**(1), 33-44 [cit. 2021-7-12]. ISSN 1421-9751. Dostupné z: doi:10.1159/000174545
- CALLAGHAN, Richard. Structure of the Multidrug Resistance P-glycoprotein to 2.5nm Resolution Determined by Electron Microscopy and Image Analysis. *Journal of Biological Chemistry - J BIOL CHEM.* 1997/04/18, **272**, 10685-10694. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.16.10685
- COOPER, D. Y., S. LEVIN, S. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL a R. W. ESTABROOK. Photochemical Action Spectrum of the Terminal Oxidase of Mixed Function Oxidase Systems. *Science* [online]. 1965, **147**(3656), 400-402 [cit. 2021-7-7]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.147.3656.400
- DAS, Malay K a Bhupen KALITA. PHYTOSOME: AN OVERVIEW. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation* [online]. 2013, **2**(3), 7-11 [cit. 2021-7-12]. ISSN 22774572. Dostupné z: doi:10.7897/2277-4572.02322
- DELMAS, Dominique, Jianbo XIAO, Anne VEJUX a Virginie AIRES. Silymarin and Cancer: A Dual Strategy in Both in Chemoprevention and Chemosensitivity. *Molecules* [online]. 2020, **25**(9) [cit. 2021-7-22]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25092009
- DÖRING, Barbara a Ernst PETZINGER. Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 2014, **46**(3), 261-282 [cit. 2021-7-4]. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.3109/03602532.2014.882353
- DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1464-7.
- DOULL, John, Louis J. CASARETT a Curtis D. KLAASSEN. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons / editor Curtis D. Klaassen*. 2013. ISBN 9780071769242.

FINCH, Andrew a Peter PILLANS. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. *Australian Prescriber* [online]. 2014, **37**(4), 137-139 [cit. 2021-7-12]. ISSN 03128008. Dostupné z: doi:10.18773/austprescr.2014.050

GAJDOVÁ, Jaromíra a Karel URBÁNEK. Fenofibrát a jeho lékové formy. *Internal Medicine for Practice*. 2013, **15**(1), 5-10. ISSN 12127299.

Dostupné také z: <https://www.internimedica.cz/artkey/int-201301-0002.php>

GIGUÈRE, Vincent. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function*. *Endocrine Reviews* [online]. 1999, **20**(5), 689-725 [cit. 2021-7-26]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/edrv.20.5.0378

GU, Ming, Ping ZHAO, Jinwen HUANG, et al. Silymarin Ameliorates Metabolic Dysfunction Associated with Diet-Induced Obesity via Activation of Farnesyl X Receptor. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2016, **7** [cit. 2021-8-2]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2016.00345

GUO, Chaorui, Siqi XUE, Xiufen ZHENG, Yang LU, Di ZHAO, Xijing CHEN a Ning LI. The effect of fenofibric acid on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats. *Xenobiotica* [online]. 2018, **48**(4), 400-406 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.1080/00498254.2017.1306760

HANIGAN, Sarah, Jessica DAS, Kristen POGUE, Geoffrey D. BARNES a Michael P. DORSCH. The real world use of combined P-glycoprotein and moderate CYP3A4 inhibitors with rivaroxaban or apixaban increases bleeding. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* [online]. 2020, **49**(4), 636-643 [cit. 2021-7-14]. ISSN 0929-5305. Dostupné z: doi:10.1007/s11239-020-02037-3

HIRT, Miroslav a František VOREL. *Soudní lékařství*. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-5680-6.

HODGSON, Ernest. *A textbook of modern toxicology*. 4th ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2010. ISBN 978-0-470-46206-5.

CHEN, Qun, Hai-tang XIE, Yan LI, Guo WANG, Zhe XU, Zhi-chen PU a Hua HU. Transcriptional Regulation of CYP3A4/2B6/2C9 Mediated via Nuclear Receptor PXR by Helicid and Its Metabolites. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2015, **2015**, 1-9 [cit. 2021-8-3]. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2015/797496

JULIANO, R.L. a V. LING. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1976, **455**(1), 152-162. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)

KARIMI, Gholamreza, Maryam VAHABZADEH, Parisa LARI, Marziyeh RASHEDINIA a Mohammad MOSHIRI. "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iranian journal of basic medical sciences*. Mashhad University of Medical Sciences, 2011/07/, **14**(4), 308-317. ISSN 2008-3866.

Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23492971>

KIRUTHIGA, PV, K KARTHIKEYAN, G ARCHUNAN, S Karutha PANDIAN a K Pandima DEVI. Silymarin prevents benzo(a)pyrene-induced toxicity in Wistar rats by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes. *Toxicology and Industrial Health* [online]. 2013, **31**(6), 523-541 [cit. 2021-8-2]. ISSN 0748-2337.

Dostupné z: doi:10.1177/0748233713475524

KLIEWER, Steven A., Bryan GOODWIN a Timothy M. WILLSON. The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews* [online]. 2002, **23**(5), 687-702 [cit. 2021-7-26]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2001-0038

KLINGENBERG, Martin. Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1958, **75**(2), 376-386 [cit. 2021-7-6]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/0003-9861(58)90436-3

KŘEN, Vladimír a Daniela WALTEROVÁ. Silybin and silymarin - new effects and applications. *Biomedical papers*. 2005, **149**(1), 29-41. ISSN 12138118. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2005.002

KURIEN, B a R SCOFIELD. Western blotting. *Methods* [online]. 2006, **38**(4), 283-293 [cit. 2021-7-17]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2005.11.007

LANG, Dieter, Martin RADTKE a Michaela BAIRLEIN. Highly Variable Expression of CYP1A1 in Human Liver and Impact on Pharmacokinetics of Riociguat and Granisetron in Humans. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2019, **32**(6), 1115-1122 [cit. 2021-8-2]. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.8b00413

LIVAK, Kenneth J. a Thomas D. SCHMITTGEN. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* [online]. 2001, **25**(4), 402-408 [cit. 2021-7-17]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1006/meth.2001.1262

LIVAK, Kenneth J. a Thomas D. SCHMITTGEN. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* [online]. 2001, **25**(4), 402-408 [cit. 2021-7-31]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1006/meth.2001.1262

LYNCH, Tom a Amy PRICE. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *American family physician*. 2007/09/01, **76**, 391-6.

MANGELSDORF, D J, C THUMMEL, M BEATO, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade: the second decade. *Cell*. 1995/12/15, **83**(6), 835-839. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(95)90199-x

MARTIGNONI, Marcella, Geny M M GROOTHUIS a Ruben DE KANTER. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. 2006, **2**(6), 875-894 [cit. 2021-7-12]. ISSN 1742-5255.

Dostupné z: [doi:10.1517/17425255.2.6.875](https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875)

MATSUBARA, T., H. J. KIM, M. MIYATA, M. SHIMADA, K. NAGATA a Y. YAMAZOE. Isolation and Characterization of a New Major Intestinal CYP3A Form, CYP3A62, in the Rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2004, **309**(3), 1282-1290 [cit. 2021-7-12]. ISSN 0022-3565.

Dostupné z: [doi:10.1124/jpet.103.061671](https://doi.org/10.1124/jpet.103.061671)

MONTESINOS, Rita Nieto, Brice MOULARI, Jessica GROMAND, Arnaud BEDUNEAU, Alf LAMPRECHT a Yann PELLEQUER. Coadministration of P-Glycoprotein Modulators on Loperamide Pharmacokinetics and Brain Distribution. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2014, **42**(4), 700-706 [cit. 2021-8-2]. ISSN 0090-9556.

Dostupné z: [doi:10.1124/dmd.113.055566](https://doi.org/10.1124/dmd.113.055566)

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 1548994, Milk thistle. Retrieved July 12, 2021

Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Milk-thistle>.

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 31553, Silibinin. Retrieved July 12, 2021

Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silibinin>.

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 3339, Feno-fibrate. Retrieved July 12, 2021

Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fenofibrate>.

NEBERT, Daniel W a David W RUSSELL. Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet* [online]. 2002, **360**(9340), 1155-1162 [cit. 2021-7-7]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(02)11203-7

NGUYEN, Chi Huu, Nicole HUTTARY, Atanas G. ATANASOV, et al. Fenofibrate inhibits tumour intravasation by several independent mechanisms in a 3-dimensional co-culture model. *International Journal of Oncology* [online]. 2017, **50**(5), 1879-1888 [cit. 2021-8-2]. ISSN 1019-6439. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.2017.3956

OTT, Melanie, Gert FRICKER a Björn BAUER. Pregnane X Receptor (PXR) Regulates P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Functional Similarities between Pig and Human PXR. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2009, **329**(1), 141-149 [cit. 2021-8-3]. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.108.149690

PÁVEK, Petr a Zdeněk DVORŮÁK. Xenobiotic-Induced Transcriptional Regulation of Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues. *Current Drug Metabolism* [online]. 2008, **9**(2), 129-143 [cit. 2021-7-26]. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/138920008783571774

PFRUNDER, Arabelle, Heike GUTMANN, Christoph BEGLINGER a Jürgen DREWE. Gene expression of CYP3A4, ABC-transporters (MDR1 and MRP1-MRP5) and hPXR in three different human colon carcinoma cell lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2003, **55**(1), 59-66 [cit. 2021-7-26]. ISSN 0022-3573. Dostupné z: doi:10.1111/j.2042-7158.2003.tb02434.x

PHANG-LYN, Simone a Valerie A. LLERENA. Biochemistry, Biotransformation. *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2020 [cit. 2021-7-4]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544353/>

PORUBA, Martin, Zuzana MATUSKOVA, Martina HÜTTL, et al. Fenofibrate Decreases Hepatic P-Glycoprotein in a Rat Model of Hereditary Hypertriglyceridemia. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2019, **10** [cit. 2021-7-20]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2019.00056

PRAVENEK, Michal, Takashi KAJIYA, Václav ZÍDEK, et al. Effects of Human C-Reactive Protein on Pathogenesis of Features of the Metabolic Syndrome. *Hypertension* [online]. 2011, **57**(4), 731-737 [cit. 2021-7-12]. ISSN 0194-911X.

Dostupné z: doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164350

SHINKYO, Raku a F. Peter GUENGERICH. Inhibition of Human Cytochrome P450 3A4 by Cholesterol*. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, **286**(21), 18426-18433. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M111.240457

SIDHU, G. a J. TRIPP. Fenofibrate. *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2021-7-12].

Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559219/

SKÁLOVÁ, Lenka. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, uprav. a rozšíř. vyd. Praha: Karolinum, 2017. Učební texty Univerzity Karlovy. ISBN 978-80-246-3733-4.

SOŠKA, V. Jaderné receptory PPAR α . *Vnitřní lékařství*. 2006, **52**(6), 628-631. ISSN 0042773X. Dostupné také z: https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/artkey/vnl-200606-0015.php

TODA, Katsumi, Teruhiko OKADA, Chisata MIYAURA a Toshiji SAIBARA. Fenofibrate, a ligand for PPAR γ , inhibits aromatase cytochrome P450 expression in the ovary of mouse. *Journal of lipid research*. 2003/03/01, **44**, 265-70.

Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M200327-JLR200

TORZEWSKI, Michael, Ahmed Bilal WAQAR a Jianglin FAN. Animal models of C-reactive protein. *Mediators of inflammation*. Hindawi Publishing Corporation, 2014, **2014**, 683598-683598. ISSN 1466-1861. Dostupné z: doi:10.1155/2014/683598

TZIOMALOS, Konstantinos a Vasilios G ATHYROS. Fenofibrate: a novel formulation (Triglide) in the treatment of lipid disorders: a review: a novel formulation (Triglide) in the treatment of lipid disorders. *International journal of nanomedicine*. Dove Medical Press, 2006, **1**(2), 129-147. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/nano.2006.1.2.129

WAL, Pranay, Verma ATUL, Yadav SANJAY a Ankita WAL. *Role of P-Glycoprotein Protein*. 2013/09/16, **4**.

WEN, Zhiming, Todd E. DUMAS, Sarah J. SCHRIEBER, Roy L. HAWKE, Michael W. FRIED a Philip C. SMITH. Pharmacokinetics and Metabolic Profile of Free, Conjugated, and Total Silymarin Flavonolignans in Human Plasma after Oral Administration of Milk Thistle Extract. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2007, **36**(1), 65-72 [cit. 2021-7-12]. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.107.017566

WILLSON, Timothy M. a Steven A. KLIOWER. Pxr, car and drug metabolism. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2002, **1**(4), 259-266 [cit. 2021-7-26]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd753

XIE, Ying, D. ZHANG, J. ZHANG a Jialu YUAN. Metabolism, Transport and Drug–Drug Interactions of Silymarin. *Molecules* [online]. 2019, **24**(20) [cit. 2021-7-12]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24203693

YAMAZAKI, M., B. LI, S. W. LOUIE, et al. Effects of fibrates on human organic anion-transporting polypeptide 1B1-, multidrug resistance protein 2- and P-glycoprotein-mediated transport. *Xenobiotica* [online]. 2008, **35**(7), 737-753 [cit. 2021-8-2]. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.1080/00498250500136676

ZANGER, Ulrich M. a Matthias SCHWAB. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013, **138**(1), 103-141. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007

ZUO, Hao a Yihong WAN. Nuclear Receptors in Skeletal Homeostasis. *Nuclear Receptors in Development and Disease* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 71-107 [cit. 2021-7-26]. Current Topics in Developmental Biology. ISBN 9780128021729. Dostupné z: doi:10.1016/bs.ctdb.2017.01.002