



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Stanovení exprese mRNA CYP2E1
a CYP3A u HHTg potkanů na dietě
obohacené o přírodní látky**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Veronika Žďárská**
Studijní program: **B1501 Experimentální biologie**
Studijní obor: **Experimentální biologie**
Forma studia: **Prezenční**
Vedoucí práce: **prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: **2018**

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora Veronika Žďárská
Název práce Stanovení exprese mRNA CYP2E1 a CYP3A u HHTg potkanů na dietě obohacené o přírodní látky
Typ práce Bakalářská
Pracoviště Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.
Rok obhajoby práce 2018

Abstrakt

Tato práce se zabývá vlivem přírodních látek (silymarinu a polynenasycených mastných kyselin) u metabolického syndromu, který je spojován s kardiovaskulární morbiditou a mortalitou a také vznikem diabetu II. typu. Konkrétně byl zjišťován vliv těchto látek na expresi mRNA CYP2E1, který má významnou roli při podpoře výživy a detoxikaci organismu, a CYP3A, jež se účastní metabolismu většiny léčiv. Pro tuto studii byli používáni hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, protože představují neoběžný model metabolického syndromu. Vliv výše zmíněných přírodních látek na expresi vybraných cytochromů P450 byl zjišťován metodou Real Time-PCR. Bylo zjištěno, že silymarin ani polynenasycené mastné kyseliny nezpůsobují statisticky významné změny v expresi mRNA CYP3A. U CYP2E1 bylo pozorováno mírné snížení v expresi mRNA, které bylo rovněž statisticky nevýznamné. Z pohledu lékových interakcí se užívání vybraných přírodních látek zdá tedy být bezpečné.

Klíčová slova HHTg potkan, metabolický syndrom, silymarin, PUFA, CYP2E1, CYP3A
Počet stran 39
Počet příloh 0
Jazyk Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Veronika Žďárská
Title of thesis	Determination of CYP2E1 a CYP3A mRNA expression in HHTg rats on diet with natural compounds
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

This thesis deals with the influence of natural substances (silymarin and polyunsaturated fatty acids) on the metabolic syndrome, which is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality as well as the development of diabetes type II. The effect of these substances has been investigated on CYP2E1 mRNA expression which plays an important role in nutrition supporting and detoxification of the organism, and on an expression of CYP3A mRNA which is involved in the metabolism of most drugs. Hereditary hypertriglyceridemic rats were used for this study, because they represent a non-obese model of metabolic syndrome. The effect of the natural substances on the mRNA expression of selected cytochromes P450 was determined by RT-PCR method. It was found that silymarin or polyunsaturated fatty acids cause no changes in CYP3A mRNA expression. While CYP2E1 caused mild reductions in mRNA expression, the effect was not statistically significant. The use of selected natural substances appears to be safe from the view of drug interactions.

Keywords	HHTg rat, metabolic syndrome, silymarin, PUFA, CYP2E1, CYP3A
Number of pages	39
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Rostislavu Večeřovi, Ph.D., Zuzaně Matuškové, Ph.D. a PharmDr. Martinu Porubovi za pomoc při získávání a zpracovávání výsledků. Rovněž děkuji všem blízkým, kteří mě během psaní i celého studia podporovali.

Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Metabolický syndrom.....	9
2.2. Cytochromy P450	10
2.3. CYP2E1 & CYP3A.....	13
2.3.1. CYP2E1.....	13
2.3.2. CYP3A	14
2.4. Silymarin.....	15
2.5. Polynenasycené mastné kyseliny.....	17
2.6. Hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani	18
2.7. Real-Time PCR	19
3. METODY	20
3.1. Biologický materiál	20
3.2. Použité chemikálie	20
3.3. Použité soupravy	20
3.4. Použité přístroje a zařízení.....	21
3.5. Izolace a purifikace RNA z tenkého střeva	21
3.6. Syntéza cDNA	22
3.7. Vyhodnocení výsledků metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$	26
3.8. Statistické hodnocení výsledků	28
4. VÝSLEDKY	30
5. ZÁVĚR	34
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35

Abecední seznam zkratk:

cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina

CYP – cytochrom P450

DHA – kyselina dokosahexaenová

EPA – kyselina eikosapentaenová

gDNA – genomová DNA

HDL – lipoproteiny s vysokou hustotou

HDL-ch – HDL-cholesterol

HHTg – hereditárně hypertriglycerdemický

HPRT - Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasa

Mikro - mikronizovaný

mRNA – messengerová RNA

PUFA – polynenasycená mastná kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomální RNA

RT-PCR – polymerasová řetězová reakce v reálném čase

STD – standardní laboratorní dieta

UV – ultrafialové světlo

1. ÚVOD

Hereditární hypertriglyceridemičtí potkani představují zvířecí neoběžní model pro metabolický syndrom. Pojmem metabolický syndrom se označuje soubor příbuzných abnormalit souvisejících s kardiovaskulární morbiditou a mortalitou a vznikem diabetu II. typu. Navzdory rozsáhlému výzkumu v této oblasti ještě neexistuje přesná a obecně přijatelná definice, která by popisovala, co je součástí tohoto syndromu. Bylo však navrženo několik doporučení na definice popisující, co je součástí tohoto onemocnění. V předchozích studiích bylo zjištěno, že jedním z podpůrných prostředků na léčbu metabolického syndromu je silymarin pocházející ze semen rostliny *Silybum marianum* (ostropestřec mariánský). Podobně vhodné se také jeví užívání polynenasycených mastných kyselin, které jsou běžně dostupné v dietě.

Cílem této práce bylo seznámení se s biologickým materiálem a jeho zpracováním za účelem stanovení exprese mRNA cytochromů P450, enzymů důležitých pro metabolismus cizorodých i endogenních látek v organismu. Dále také vypracování literární rešerše zabývající se problematikou související s tématem práce. Hlavním cílem praktické části bylo stanovení exprese mRNA CYP2E1 a CYP3A v tkáních HHTg potkanů pomocí real-time PCR (RT-PCR) a statistické zpracování získaných výsledků a jejich porovnání mezi jednotlivými skupinami potkanů, lišícími se podávanou dietou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Metabolický syndrom

Jedná se o soubor příbuzných abnormalit, který se nejprve označoval jako syndrom X a až později byl nazván metabolickým syndromem nebo také syndromem inzulínové rezistence (Zicha et al., 2006). Historie existence metabolického syndromu má svůj počátek ve dvacátých letech minulého století. Navzdory rozsáhlému výzkumu v této oblasti ještě neexistuje přesná a obecně přijatelná definice, která by popisovala, co je součástí tohoto syndromu (Federspil et al., 2006). Nedávno bylo navrženo několik doporučení pro definici metabolického syndromu. Ve studii Národního vzdělávacího programu byla navržena následující kritéria: abdominální obezita (muži: obvod pasu > 102 cm, ženy: obvod pasu ≥ 89 cm), glukosa nalačno (≥ 6,1 až < 7,0 mmol/l), krevní tlak (≥ 130/80 mm Hg), koncentrace triglyceridů (1,7 mmol/l) a HDL-cholesterol (HDL-ch; muži: < 1,04 mmol/l, ženy: < 1,3 mmol/l). Mezinárodní organizace pro léčbu diabetu doporučila podobnou definici. Pokud jsou přítomny tři nebo více z těchto pěti kritérií, lze hovořit o metabolickém syndromu. (Zicha et al., 2006). Tyto faktory jsou spojeny s kardiovaskulární morbiditou a mortalitou a vznikem diabetu II. typu (Galassi et al., 2006; Mottillo et al., 2010)

V současné době neexistují žádná léčiva, která by mohla ovlivnit všechny složky týkající se metabolického syndromu. Například hypertriglyceridémie je obvykle léčena fibráty, jež stimulují receptory aktivující enzymy, které se podílejí na katabolismu triglyceridů. V případě hypercholesterolemie je první volbou léku statin. Statiny jsou skupina léčiv, o kterých je známo, že inhibují *de novo* syntézu cholesterolu v játrech. Pacienti trpící diabetem typu II jsou obvykle závislí na léčivých přípravcích, které stimulují sekreci inzulínu nebo jsou senzibilizátory inzulínu či si pacienti přímo aplikují exogenní inzulín nebo jeho analogy. Z bylinných prostředků dostupných pro podpůrnou léčbu metabolického syndromu lze zařadit extrakty z rostlin bohatých na polyfenoly. Jednou z léčivých bylin bohatých na polyfenolové sloučeniny je ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.) (Valenzuela & Garrido, 1994)

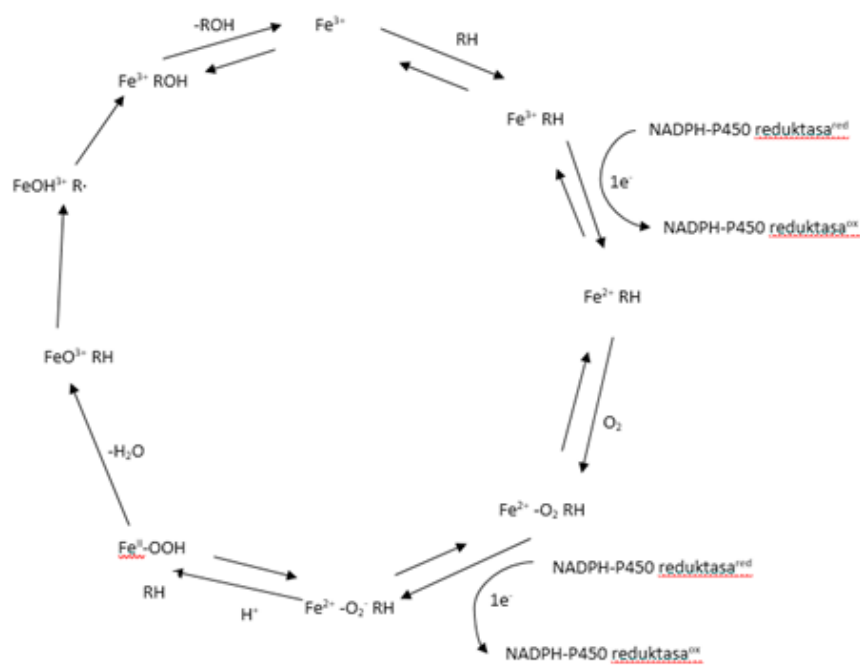
2.2. Cytochromy P450

Cytochromy P450 tvoří nadřazenou skupinu hem enzymů nacházejících se od bakterií až po lidi. Své jméno enzymy dostaly díky svému umístění na membráně uvnitř buňky (cyto) a obsahu hem pigmentu (chrom a P), který po vystavení působení oxidu uhelnatého absorbuje světlo při vlnové délce 450 nm. Převážně jsou exprimovány v játrech, ale vyskytují se také v ostatních tkáních, jako jsou například tenké střevo, ledviny, či plíce. (Lynch & Price, 2007). Rodina lidských cytochromů P450 obsahuje 57 genů. Tyto geny kódují enzymy, které mohou ovlivňovat metabolismus léků, různých chemikálií, kyseliny arachidonové a eikosanoidů; metabolismus cholesterolu a biosyntézu žlučových kyselin; steroidní syntézu a metabolismus; syntézu a metabolismus vitamínu D3; hydroxylaci kyseliny retinové a mnoho dalších (Nebert & Russell, 2002). V souvislosti s metabolickým syndromem se do popředí dostává právě metabolismus cholesterolu a jeho možné ovlivnění lékovými interakcemi.

Jednotlivé enzymy a jejich příslušné geny jsou označovány zkratkou CYP, která je následována arabskou číslicí vyjadřující číslo rodiny. Toto číslo může být spojeno s funkcí enzymu nebo může být zvoleno libovolně. Cytochromy P450, které tvoří rodinu, by měly mít ze 40 % podobné sekvence. Pokud je třeba rodinu dále rozdělit, vytváří se podskupina založená na vyšší podobnosti sekvence (až 55 %). Podskupiny v jedné rodině jsou označeny postupně jako např. CYP3A, CYP3B atd. Jednotliví členové podskupin jsou opět označeni arabskými číslicemi (např. CYP3A4) (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Cytochromy P450 se tradičně označují jako hydroxylasy, oxidasy s kombinovanou funkcí a monooxygenasy. Jejich hlavním úkolem je aktivovat molekulární kyslík za vzniku reaktivních forem. Ty mohou napadat relativně inertní chemická místa, aby došlo k zavedení hydroxylové skupiny do struktur s málo reaktivními nebo nereaktivními uhlovodíkovými řetězci a aromatickými kruhy. To slouží k usnadnění biotransformace sloučenin, které nemají funkční skupiny vhodné pro konjugaci. Mechanismus působení enzymů CYPs je zobrazen na Obr. 1 a reakce jsou následující. Během katalytického cyklu se substrát naváže na CYP, přičemž se mění konformace spinového stavu hemového železa z nízkospinového na vysokospinový. V přítomnosti NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktasy, donoru elektronů (NADPH nebo NADH) a cytochromu b5 dochází k redukci oxidačního stavu hemového železa z Fe^{3+} na Fe^{2+} , a takto redukované hemové železo může reagovat s tripletním molekulárním kyslíkem. Jeden elektron z Fe^{2+} a jeden elektron z tripletního kyslíku dává vznik meziprojektu s vazbou $Fe^{3+}-O_2$, který je relativně stabilní, může však disociovat na Fe^{3+} a superoxidový anion. Uvolnění superoxidu je

doprovázeno vznikem peroxidu vodíku, ten je zdrojem škodlivých kyslíkových radikálů. Ze superoxidového aniontu vzniká negativně nabitý železo-peroxidový komplex, a to opět za účasti NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktasy, donoru elektronů a cytochromu b5. Následuje protonace za vzniku Fe^{5+} a rozštěpení vazby O-O. Odštěpuje se molekula vody a vzniká reaktivní komplex železa s atomárním kyslíkem. V poslední fázi se atomární kyslík přesouvá z komplexu železa na substrát a vzniká hydroxylovaný substrát. Tento hydroxylovaný substrát je polárnější než samotný substrát, který byl na úplném začátku tohoto katalytického cyklu. Vzniklý hydroxylovaný substrát se nakonec uvolňuje a enzym se vrací do původního nízkospinového stavu, kdy je opět připraven k reakci s další molekulou substrátu. (Goeptar et al., 1995; Meunier et al., 2004).

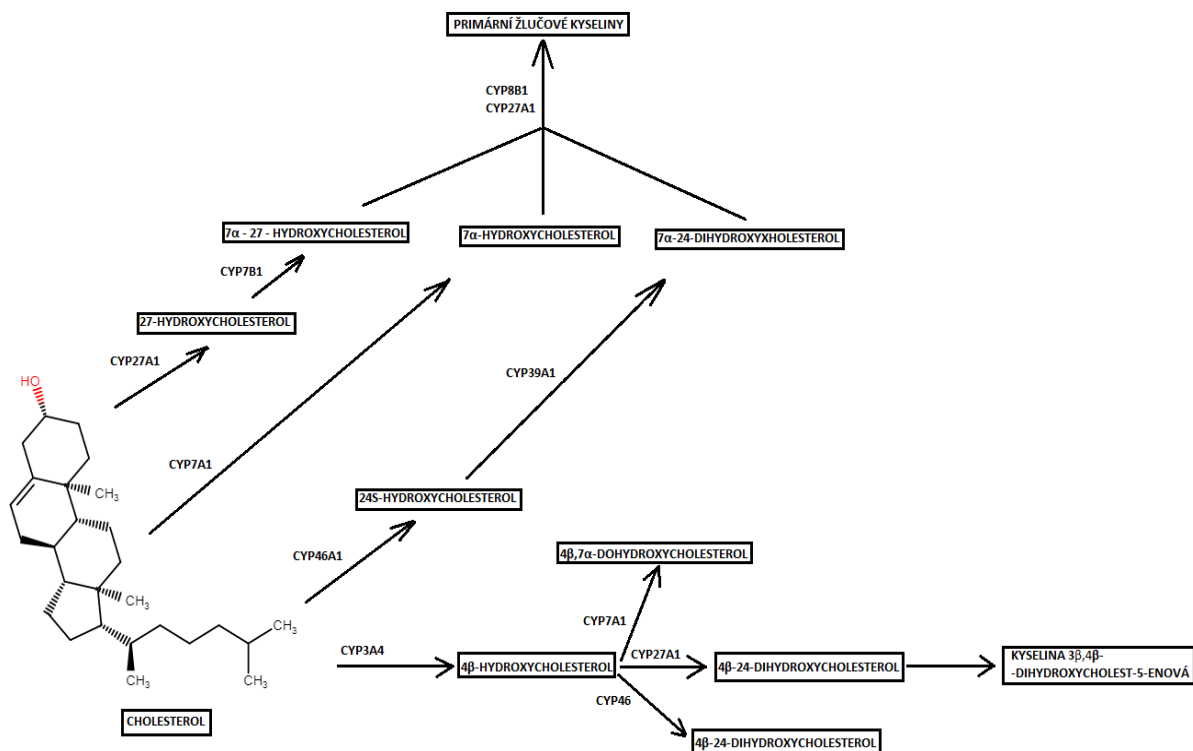


Obrázek 1: Obecné schéma reakcí katalytického cyklu CYP450 (převzato a upraveno z Guengerich, 2013)

Enzymy CYPs mají velký význam především v odbourávání látek z těla, tedy jejich oxidaci na polárnější metabolity, které se snadno z organismu vylučují. Vzhledem k tomu, že se tímto způsobem metabolizuje většina léčiv, mohou na úrovni enzymů CYPs vzniknout interakce s těmito látkami. Léčiva nebo látky obecně mohou být metabolizovány jedním enzymem CYP nebo více enzymy, zároveň mohou být tzv. inhibitory nebo induktory těchto enzymů. Inhibitory blokuji metabolickou aktivitu jednoho nebo více

enzymů CYPs. Inhibice CYP látkou se projevuje zejména, pokud je podána další látka, která se metabolizuje stejným CYP. V takovém případě se současně podaná látka nemusí metabolizovat a zvyšuje se pak její plazmatická koncentrace. U léčiv s tzv. úzkým terapeutickým oknem by mohlo dojít u pacienta k předávkování a zvýšení nežádoucích účinků léčiva. Rozsah, v němž inhibitor ovlivňuje metabolismus léčiva, závisí na faktorech, jako je dávka inhibitoru a jeho afinita k enzymu CYP. Induktory naopak zvyšují aktivitu CYPs zvýšením syntézy enzymů (Lynch & Price, 2007).

Jak již bylo zmíněno, CYPs hrají klíčovou roli, mimo jiné, při metabolismu cholesterolu. Hlavním způsobem jeho degradace je přeměna na žlučové kyseliny. Syntézu žlučových kyselin z cholesterolu iniciuje jaterní enzym CYP7A1 zavedením hydroxylové skupiny do α -konfigurace na sedmém uhlíku β -kruhu cholesterolu. Jedná se o klasickou nebo tzv. neutrální cestu biosyntézy primárních žlučových kyselin (kyseliny cholové a chenodeoxycholové) z cholesterolu. CYP8B1 je sterol 12 α -hydroxylasa, která se konkrétně uplatňuje při syntéze kyseliny cholové. Žlučové kyseliny mohou být také tvořeny alternativní, tzv. kyselou cestou, při níž se zapojuje CYP27A1, který hydroxyluje cholesterol na 27-hydroxycholesterol, a CYP7B1, který vede k přeměně 27-hydroxycholesterolu na 7 α ,27-dihydroxycholesterol. Enzym CYP7B1 je exprimován hlavně v ledvinách a mozku, protože se zapojuje také i do syntézy steroidních hormonů. Dalším členem superrodiny P450, který se exprimuje hlavně v mozkových neuronech je CYP46A1, který způsobuje hydroxylaci cholesterolu, případně 4 β -hydroxycholesterolu, v poloze 24. Oxysteroly, tedy oxidované produkty cholesterolu, volně prochází přes hematoencefalickou membránu (na rozdíl od samotného cholesterolu). 4 β -hydroxycholesterol vzniká působením CYP3A4/5. Enzym CYP3A4 je nejvíce zastoupeným CYP u lidí a metabolizuje většinu léčiv. Vzhledem k tomu, že se tímto enzymem (i enzymem CYP3A5) metabolizuje cholesterol na 4 β -hydroxycholesterol (který je dále pravděpodobně přeměňován na žlučové kyseliny působením CYP7A1, CYP27A1 nebo CYP46), stanovením plazmatické koncentrace tohoto metabolitu bychom mohli zjistit aktivitu enzymů CYP3A4/5 *in vivo*. (Eggertsen et al., 1996; Lorbek et al., 2012; Lund et al., 1999; Matušková et al., 2014; Nebert & Russell, 2002; Stiles et al., 2009).



Obrázek 2: Schéma tvorby žlučových kyselin z cholesterolu za účasti cytochromů (převzato a upraveno z Matušková et al., 2014)

2.3. CYP2E1 & CYP3A

2.3.1. CYP2E1

CYP2E1 je jediný člen podrodiny CYP2E jak u člověka (Nelson et al., 1996), tak i potkana. Má dvě fyziologické role a to při detoxikaci a podpoře výživy. Pokud se jedná o xenobiotika, jako je ethanol, CYP2E1 zde zastává detoxikační roli a zabraňuje tomu, aby ethanol dosáhl nadprůměrné hladiny (Martignoni et al., 2006). Z hlediska výživy hraje CYP2E1 významnou roli v případě, že převládá hladovění a/nebo nízký obsah sacharidů z důvodu jeho podílu na metabolismu mastných kyselin a jeho schopnosti přeměnit ketony na glukosu (Lieber, 1997).

Metabolismem zprostředkovaným CYP2E1 se tvoří kyslíkové radikály a při překročení buněčných detoxikačních systémů dochází k oxidativnímu stresu s různými patologickými následky. To platí nejen tehdy, je-li nutno metabolizovat přebytek alkoholu, ale i když se CYP2E1 musí vypořádávat s nadbytkem ketonů a mastných kyselin spojených s diabetem a/nebo obezitou (Lieber, 2004). Kromě ethanolu se podílí také

na biotransformaci mnoha malých neutrálních a relativně hydrofilních substrátů jako jsou halogenované uhlovodíky (např. chloroform), z nichž je většina hepatotoxická (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Z léčiv metabolizovaných CYP2E1 lze zařadit těkavá anestetika, paracetamol či chlorzoxazon, který se používá jako selektivní marker aktivity CYP2E1 *in vivo* (Yamazaki & Guo, 1995).

Regulace exprese CYP2E1 je složitá a zahrnuje transkripční, translační a posttranslační mechanismy (Martignoni et al., 2006). Aktivity CYP2E1 mohou být sníženy účinkem i některých složek potravin, jako je diallylsulfid, který je přítomný v česneku nebo cibuli, a po konzumaci košťálové zeleniny (Ioannides, 1999).

2.3.2. CYP3A

Rodina CYP3 u lidí sestává z jediné podskupiny (CYP3A), ve které jsou čtyři funkční geny (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43) (P.B. Danielson, 2002). Jsou exprimovány hlavně v játrech, ale také v žaludku, plicích, tenkém střevě a ledvinách (Martignoni et al., 2006).

Jedním z nejdůležitějších enzymů CYP metabolizující léky u lidí je CYP3A4. Je také nejvíce zastoupeným CYP v játrech a gastrointestinálním traktu u lidí. Bylo prokázáno, že metabolizuje širokou škálu léčiv od taxolu po sildenafil. Mezi léky, které jsou považovány za klasické substráty CYP3A4, patří blokátory vápníkového kanálu s dihyropyridinovou strukturou (nifedipin), většina makrolidových antibiotik (např. klarithromycin), benzodiazepinová sedativa (diazepam), antiarytmika (amiodaron) či modulátory imunitního systému (cyklosporin). Podílí se však také na přeměně kofeinu v těle (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001; P.B. Danielson, 2002; Thummel & Wilkinson, 1998). Kromě přeměny léků se CYP3A také podílí na oxidaci různých endogenních substrátů, jako jsou steroidy, žlučové kyseliny a kyselina retinová (Marill et al., 2000).

Jedná se o poměrně nestabilní enzym se složitým mechanismem účinku (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Metabolická aktivita CYP3A4 je totiž v lidských populacích vysoce variabilní. Bylo zjištěno více než 20 variant alel pro tento gen, z nichž některé jsou spojeny buď s vyššími nebo nižšími rychlostmi katalytické aktivity (Dai et al., 2001; P.B. Danielson, 2002).

Skutečnost, že CYP3A4 metabolizuje více než 120 různých léků a do jisté míry se podílí na metabolismu téměř 60 % léčivých přípravků, naznačuje možnost nežádoucích lékových interakcí, které mohou vést k extrémně zvýšené nebo snížené hladině jednoho z interagujících léků při užívání více léčiv najednou (Anzenbacher & Anzenbacherová,

2001; McKinnon et al., 1995; Shimada et al., 1994). Řada běžných léčivých přípravků, jako jsou antifungální léčiva (např. flukonazol), mají inhibiční účinek na tento CYP, což může mít za následek zvýšené plazmatické hladiny a prodlouženou dobu clearance pro současně podávané substráty CYP3A4. Dokonce i přírodní látky z potravy mohou interferovat s jeho funkcí. Například grapefruitová šťáva obsahuje inhibitor CYP3A4, který může způsobit mnohonásobné zvýšení sérových koncentrací některých léčiv (P.B. Danielson, 2002).

U potkanů bylo zjištěno více forem CYP3A než u lidí, konkrétně to jsou: CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23 a 3A62. Rozdílné formy sebou nesou rozdíly v metabolismu léčiv. Mnoho substrátů běžně metabolizovatelných lidským CYP3A, jako jsou například blokátory vápníkového kanálu, nejsou metabolizovány potkaním CYP3A1. Rovněž typický induktor lidského enzymu CYP3A rifampicin nemá na potkaní formu žádný účinek (Guengerich, 1997; Lu & Li, 2001; Martignoni et al., 2006; Smith, 1991).

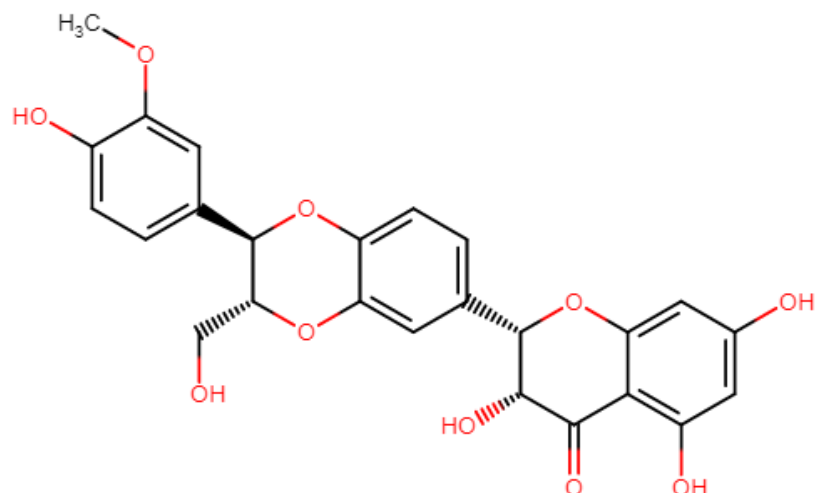
2.4. Silymarin

Silymarin, jakožto standardizovaný extrakt ze semen rostliny *Silybum marianum* (ostropestřec mariánský), byl používán v podpůrné léčbě onemocnění jater po celá staletí. (Wellington & Jarvis, 2001). Sušené extrakty ze semen této rostliny obsahují přibližně 60 % silymarinu. Silymarin je tvořen flavonolignany: nejvíce zastoupeným silybinem (cca 50-60 %), dále např. isosilybinem (cca 5 %), silychristinem (cca 20 %) a silydianinem (cca 10 %). Hlavní účinnou složkou je silybin. (Radjabian & Huseini, 2010). Silymarin je významný pro své metabolické (Loguercio & Festi, 2011), anti-hepatotoxické, antioxidační (Trouillas et al., 2008), imunomodulační (Pradhan & Girish, 2013), antivirové a protizánětlivé účinky (Federico et al., 2007). Tradičně je silybin používán k léčbě otrav muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*) a lze jej užít i k prevenci komplikací spojených s transplantací jater (Enjalbert et al., 2002).

Hlavní hepatoprotektivní mechanismus silymarinu se zakládá na pěti vlastnostech, kterými jsou 1) aktivita proti peroxidaci tuků, 2) schopnost regulovat membránovou permeabilitu a navýšit tak membránovou stabilitu v přítomnosti xenobiotických poškození, 3) možnost regulovat jadernou expresi, 4) inhibice transformace hvězdicových hepatocytů v myofibroblastech, které jsou zodpovědné za ukládání kolagenových vláken způsobujících cirhózu, 5) navíc silymarin pravděpodobně také působí v jádře, kde navyšuje syntézu ribozomálních proteinů pomocí stimulace RNA polymerasy I a transkripce rRNA. Důkazem těchto tvrzení je, že silymarin je účinné hepatoprotektivum

proti tetrachlormethanu, ethanolu, fenyhydrazinu, paracetamolu a řadě dalších hepatotoxických látek (Saller et al., 2007).

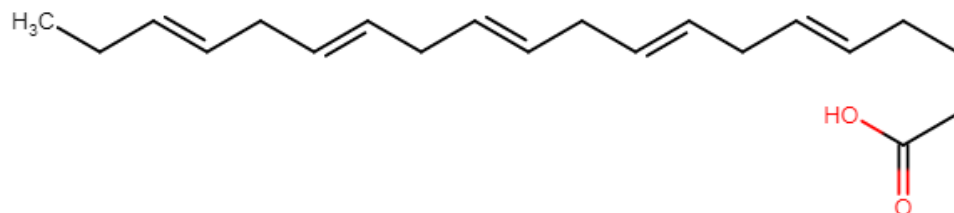
Biologická dostupnost silymarinu po perorálním podání je obecně velmi nízká (přibližně 2 % podané dávky) (Morazzoni et al., 1993). Proto byly vyvinuty lékové formy se zlepšenou biologickou dostupností silymarinu. Ve formě fytosomů má velmi dobrou biologickou dostupnost u potkanů. Dosahuje 6-10násobného zlepšení ve srovnání se standardní formou (Kidd & Head, 2005). Biologická dostupnost mikronizované formy silymarinu je nižší než v případě té fytosomální, je však vyšší než u standardizovaného extraktu (asi o 85 % vyšší) (Di Pierro et al., 2008). Tyto údaje potvrdila studie Poruby et al. (2015). Rovněž je v ní prokázáno, že silymarin výrazně snížil hladinu sérových triglyceridů u testovaných hereditárně hypertriglyceridemických (HHTg) potkanů, zvýšil u nich hladinu HDL-ch a snížil hladinu sérové glukózy. Celková hladina cholesterolu v krvi se ve srovnání s kontrolou příliš nezměnila. Zvýšení hladin HDL-ch se považuje za prevenci kardiovaskulárních onemocnění, protože HDL-ch hraje důležitou roli při zpětném transportu cholesterolu (M. Poruba et al., 2015). Existují také klinické údaje o hypolipidemickém účinku silymarinu. Silymarin inhibuje lipoxygenázové cesty, a tím prokazuje anti-aterosklerotické účinky (Bialecka, 1997; Radjabian & Huseini, 2010). V roce 2006 klinická studie ukázala, že také výrazně zlepšuje glukosovou toleranci u pacientů trpících diabetem typu II (Huseini et al., 2006). Silymarin také zvyšuje sekreci žlučových kyselin, což je nejdůležitější eliminační cesta cholesterolu z organismu. Jeví se tedy jako přínosný pro léčbu příznaků spojených s metabolickým syndromem (M. Poruba et al., 2015; Vecera et al., 2013). Je však potřeba mít na paměti, že účinky silymarinu (silybinu) se mohou lišit *in vivo* a *in vitro* a při vyšších koncentracích mohou být pro buněčné kultury toxické (Miguez et al., 1994).



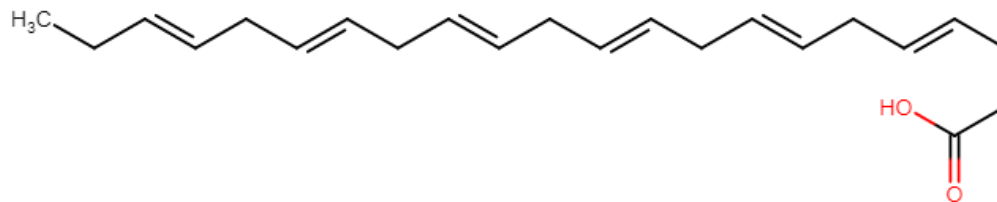
Obrázek 3: Strukturní vzorec Silybinu

2.5. Polynenasycené mastné kyseliny

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jsou do těla běžně přijímány v potravě, protože si je lidské tělo samo nedokáže syntetizovat. Rozlišujeme dva základní typy těchto kyselin: omega-6 PUFA a omega-3 PUFA. Hlavním zdrojem omega-3 PUFA je rybí tuk. Výživově nejvýznamnější z omega-3 PUFA jsou kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina dokosaheptaenová (DHA). Zdrojem omega-6 PUFA je hlavně slunečnicový olej. Tyto kyseliny jsou předmětem zájmu při léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Leaf et al., 2003; Ruxton et al., 2004; Ulven et al., 2016). Rovněž byl prokázán jejich příznivý účinek proti srdeční arytmií (Leaf et al., 2003), a mimo jiné také snižují celkový cholesterol a HDL-ch v séru (Ulven et al., 2016).



Obrázek 4: Strukturní vzorec EPA



Obrázek 5: Strukturální vzorec DHA

2.6. Hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani

Hereditárně hypertriglyceridemičtí (HHTg) potkani představují zvířecí model metabolického syndromu (Vrána & Kazdová, 1990). Nejsou však obézní, což naznačuje, že relace určitých příznaků metabolického syndromu nejsou příliš těsné (Zicha et al., 2006). Tato zvířata, vyselektovaná z potkanů kmene Wistar, vykazují hypertriglyceridémii, steatózu jater, inzulinovou rezistenci a také hypertenzi (Večera et al., 2013; Vrána & Kazdová, 1990). Každá z těchto abnormalit byla prokázána jako spojená se zhoršenou endoteliální funkcí, což dokládá snížená relaxace hrudní aorty, závislá na endotelu (Zicha et al., 2006).

Hypertriglyceridémie je nezávislým rizikovým faktorem onemocnění koronární arterie a podílí se na vývoji aterosklerózy a hypertenze. Kromě již zmiňované rezistence na inzulin bývá hypertriglyceridémie spojována také se sníženým HDL-ch a hyperinzulinémií (Zicha et al., 2006).

Kolektiv Vrána a Kazdová (1990) ve své práci pozorovali, že vysoký příjem sacharidů způsobuje řadu metabolických změn, které mohou mít patologické následky. Hlavním důvodem je zvýšená hladina triglyceridů v plazmě a míra využití tkáňové glukosy (Zicha et al., 2006). Bylo zjištěno, že vysoká hladina triglyceridů je významným faktorem mnoha změn struktury a funkce buněčné membrány u HHTg potkanů (Devynck et al., 1998). Chronické intervence vedoucí ke zvýšení nebo snížení plazmatických hladin triglyceridů modifikují membránovou viskozitu a metabolismus cyklických nukleotidů v trombocytech potkanů HHTg (Kuneš et al., 2000; Pernollet et al., 2001). Paralelně s nárůstem plazmatických triglyceridů se také objevuje již zmiňovaná hypertenze (Zicha et al., 2006) s tím, že vyšší krevní tlak bývá spíše u samců HHTg potkanů (Kunes et al., 2002). Je zde rovněž značně nepříznivá rovnováha mezi systémy ovlivňujícími zvyšování a snižování tlaku krve, což naznačuje relativní nedostatek oxidu dusnatého.

Na základě již získaných poznatků (Zicha et al., 2006), některých výše zmíněných, je HHTg potkan vhodným modelem ke studiu metabolického syndromu, jak z hlediska fenotypizace, tak i genotypizace.

2.7. Real-Time PCR

Jedná se o metodu, která slouží ke kvantifikaci DNA a transkripce. Základem této metody je klasická PCR, ale s použitím jiného, speciálního přístroje, díky němuž je množství DNA zaznamenáváno po každém cyklu. Detekce DNA je možná díky fluorescenčně značeným sondám. Při této studii byly používány TaqMan sondy, ale běžně se používají také SyberGreen barvy, které jsou však méně specifické a vážou se kamkoliv na nukleotidový řetězec. Fluorescence je vyzařována až po navázání substrátu na DNA, nikoliv substrátem samotným. Hladina fluorescence tedy odpovídá množství přítomné DNA a její intenzita je pozorována pro každou jamku zvlášť. Kvantifikace může být buď relativní, kdy je intenzita fluorescence porovnávána s intenzitou v jiném vzorku, nebo absolutní, kdy je množství DNA odečítáno z kalibrační křivky. Pro RT-PCR jsou podstatné tzv. C_t hodnoty (*cycle of threshold*), které uvádějí, ve kterém cyklu došlo k nárůstu fluorescence nad práh pozadí. Abychom zjistili, zda na začátku bylo nanášeno stejné množství testovaných vzorků, vyhodnocuje se také vnitřní kontrola. Jako vnitřní kontrola se používají tzv. referenční geny, nejčastěji „housekeeping“ geny (Heid et al., 1996; Livak & Schmittgen, 2001; Nishimura et al., 2003).

3. METODY

3.1. Biologický materiál

Celkem 23 samic hereditárně hypertriglyceridemického (HHTg) potkana (stáří 3 měsíce, hmotnost 340 – 350 g) bylo chováno za standardních laboratorních podmínek s volným přístupem ke krmivu a vodě. Laboratorní zvířata byla krmena *ad libitum* standardní dietou (STD; kontrolní skupina), STD obohacenou o mikronizovaný silymarin (SM; 1 % v STD), STD obohacenou o omega-3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA; 300 mg/kg/den), nebo STD obsahující kombinaci mikronizovaného silymarinu a omega-3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA+SM; stejné dávky jako v předešlých dietách). Po čtyřech týdnech byla zvířata dekapitována, exsanguinována a z každého jedince byla odebrána tkáň tenkého střeva, která byla vložena do stabilizačního pufru. Poté byly vzorky uskladněny při -70°C před dalším zpracováním.

Všechny procedury byly provedeny v souladu s etickými standardy zákona České republiky č. 359/2012 Sb. o ochraně zvířat a byla schválena etickou komisí MŠMT, Česká republika.

3.2. Použité chemikálie

Silymarin mikronizovaný (Favea, Kopřivnice, ČR)

omega-3 polynenasycené mastné kyseliny: směs 310 mg DHA (kyselina dokosahexaenová) a 43 mg EPA (kyselina eikosapentaneová) (kat. č. 130616; Smart City S.A., Lucemburk, LU))

2-merkptoethanol (kat. č. M3148; Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

99,8% ethanol pro UV spektroskopii (kat. č. 71380-11000; Penta, Praha, ČR)

Stabilizační pufr *RNAlater*TM Soln. (Ref. AM7021, LOT 00484983; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

3.3. Použité soupravy

RNeasy[®] Plus Mini Kit (Cat. no 74134 a 74136, Qiagen)

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Ref. 05081963001, Roche)

3.4. Použité přístroje a zařízení

Centrifuga Centrifuge 5804 R (Eppendorf)

Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf)

Centrifuga Multi-spin (Biosan)

DNA/RNA UV-cleaner box, UVC/T-AR (Biosan)

Homogenizátor (Precellys)

Kapalinový manipulátor Echo 550 (Labcyte)

Laminární box biohazard (Merci)

Termocykler LightCycler 1536 Instrument (Roche)

Mikropipety research 200; 100; 20; 10; 2,5 µl (Eppendorf)

NanoPhotometr® N60 (Implen)

Termocykler (Eppendorf)

3.5. Izolace a purifikace RNA z tenkého střeva

Nejprve byla připravena směs RTL plus pufru (součástí kitu) a 2-merkptoethanolu (na 1 ml RTL plus pufru bylo přidáno 10 µl 2-merkptoethanolu). Z této směsi bylo odebráno 600 µl do každé z předem připravených homogenizačních zkumavek Precellys. Ke směsi ve zkumavkách bylo následně ještě přidáno cca 30 mg střevní tkáně. Pro důkladnou homogenizaci byly vzorky vloženy do homogenizátoru Precellys (nejprve na 4 s a 7 500 ot./min a poté znovu 6 s, 6 500 ot./min). Po homogenizaci byly zkumavky stočeny na centrifuze (1 min, 11 393 g). Získaný lyzát byl přelit do fialových zkumavek (QIAshredder, Quiagen, Hilden, D) a opět stočen (75 s, 11 393 g). Na odstranění gDNA byly připraveny bezbarvé zkumavky a spodní část fialových zkumavek byla přemístěna do nich. Vzorky byly stočeny (30 s, 6 742 g). Do zkumavek s odstraněnými kolonkami bylo přidáno 600 µl ethanolu (70%, pro UV spektroskopii), obsah byl promíchán a 600 µl

z každé zkumavky bylo přeneseno do nových růžových kolonek. Opět bylo provedeno stočení (15 s, 6 742 g). Objem, který protekl přes kolonky, byl vylit do odpadu a kolonky byly vráceny do mikrozkuvek a stočeny (15 s, 6 742 g). Opět byl odstraněn filtrát. Zachycená RNA na kolonce byla dále pročištěna.

K RNA bylo přidáno 700 μ l RW pufru (součást kitu) a vzorky byly stočeny (15 s, 6 742 g). Filtrát byl odstraněn a do zkumavek bylo přidáno 500 μ l RPE pufru (součást kitu). Vzorky byly znovu stočeny (15 s, 6 742 g). Tento krok byl znovu zopakován, ale tentokrát byly zkumavky vloženy do centrifugy na 2 min při 6 742 g. Kolonky byly vyjmuty ze zkumavek a umístěny do nových 1,5 ml mikrozkuvek, u kterých byl odstraněn vršek, a opět byly stočeny (1 min, max. otáčky). Kolonky byly znovu vyjmuty a přemístěny do čistých popsaných mikrozkuvek, ve kterých se RNA uchovává při -70 °C. Na kolonku bylo ještě přidáno 25 μ l RNase free vody a opět proběhlo stočení (1 min, 6 742 g). Koncentrace izolované RNA byla změřena spektrofotometricky na přístroji NanoPhotometr při vlnové délce 260/230 nm. Vzorky u kterých nebyla čistota optimální, byly znovu přečištěny. Takto připravené vzorky byly zmrazeny.

3.6. Syntéza cDNA

Po rozmražení izolované mRNA byly mikrozkuvky lehce stočeny na centrifuze. Během celé práce byly vzorky uchovávány na ledu. Do sterilních mikrozkuvek byla připravena směs templátových primerů podle následující tabulky:

Tabulka 1: Příprava směsi templátových primerů.

	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace/množství	Objem pipetovaný na 1 test
RNA	různá	1000 ng	různý
Oligo(dT)₁₈ Primer	50 pmol/ μ l	0,75 μ mol/l	0,3 μ l
Hexamer Primer	600 pmol/ μ l	51 μ mol/l	1,7 μ l
PCR voda	doplňována, tak aby celkový objem činil 11,4 μ l		
Celkový objem	11,4 μ l		

Připravené směsi byly inkubovány 10 min při teplotě 65 °C a poté umístěny zpět na led. Tímto krokem byla zajištěna denaturace sekundární struktury RNA. Dále byly

do mikrozkušavek přidány další komponenta jejichž seznam a množství je uveden v tabulce:

Tabulka 2: Příprava směsi komponentů pro reverzní transkripci.

	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Objem pipetovaný na 1 test
Transkriptor High Fidelity reverzní transkriptasa reakční pufr	5x*	1x*	4,0 µl
Protektor-inhibitor RNas	40 U/µl	20 U	0,5 µl
Deoxynukleotidová směs	10 mmol/l	1 mmol/l	2,0 µl
DDT	100 mmol/l	5 mmol/l	1,0 µl
Transkriptor High Fidelity reverzní stranskriptasa	9 U/µl	10 U	1,1 µl
PCR voda		0,6 µl	
Celkový objem		20 µl	

* 5x a 1x koncentrovanější

Směs byla opatrně promíchána a inkubována 10 minut při teplotě 29 °C. Poté byla teplota zvýšena na 45 °C po dobu 30 min. Aby došlo k inaktivaci Transkriptor High Fidelity reverzní transkriptasy bylo nutné ještě na 5 min změnit teplotu na 85 °C. Vzorčky byly umístěny na led, aby se v nich probíhající reakce zastavily. Takto vytvořená cDNA byla použita pro analýzu pomocí RT-PCR.

Tabulka 3: Podmínky RT-PCR amplifikace s použitím primerů.

Proces	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Pre-denaturace	95	60	1
Denaturace	95	5	
Hybridizace	60	30	45
Elongace	60		
Ochlazení	40	10	1

Výpočet objemů nanášených na zdrojovou destičku:

Tabulka 4: Výpočet objemu nanášeného na jednu jamku pro cDNA.

Objem cDNA	0,5 µl
Počet řádků	4
Počet sloupců	14
Počet jamek	56
Objem cDNA	28 µl
Objem source	60 µl
Mrtvý objem	15 µl
Vypočítaný objem	43 µl
rezerva	5 µl
Počet jamek	1
Vypočítaný objem na jednu jamku	48 µl

Tabulka 5: Objemy jednotlivých komponent nanášených na jednu jamku zdrojové destičky pro cDNA.

cDNA	4,8 µl
Voda	38,4 µl
Setup Control 20x	4,8 µl

Tabulka 6: Výpočet objemu Master Mixu nanášeného na jednu jamku.

Objem master mixu	0,5 µl
Počet řádků	32
Počet sloupců	6
Počet jamek	192
Objem PCR směsi	96 µl
Objem source	60 µl
Mrtvý objem	15 µl
Vypočítaný objem	111 µl
rezerva	5 µl
Počet jamek	3
Vypočítaný objem na 1 jamku	52 µl

Tabulka 7: Objemy jednotlivých komponent nanášených na jednu jamku zdrojové destičky pro Master Mix.

Master Mix	20,8 μ l
Assay 20x	5,2 μ l
Voda	26 μ l

Takto vypočtené objemy byly následně nanášeny na dvě 284 jamkové zdrojové destičky. Čísla v tabulce označují pořadí vzorků

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A		16																						
B	1	17																						
C	2	18																						
D	3	19																						
E	4	20																						
F	5	21																						
G	6	22																						
H	7	23																						
I	8																							
J	9																							
K	10																							
L	11																							
M	12																							
N	13																							
O	14																							
P	15																							

Obrázek 6: Schéma nanášení cDNA na 384 jamkovou source destičku.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Np		3a	2e	Ac	Hp	Np			3a	2e	Ac	Hp	Np			3a	2e	Ac	Hp				
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Obrázek 7: Rozmístění jednotlivých genů na 384 jamkové source destičce pro nanášení Master Mixu.

Pro samotnou analýzu byly patřičné objemy na destičku nanášeny kapalinovým manipulátorem Echo 550.

3.7. Vyhodnocení výsledků metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Výstupem z RT-PCR byly tzv. Ct hodnoty. Nejprve byly odečteny hodnoty Ct pro konkrétní gen od hodnoty Ct housekeeping genu, což je v tomto případě gen pro Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu (Hprt). Tyto rozdíly jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 8: Rozdíly hodnot Ct analyzovaných a housekeeping genů ze střevní tkáně mezi skupinami HHTg potkanů.

	Vzorek č.	Cyp3a	Cyp2e	Hprt
Kontrola	1	-0,02	2,03	0,00
	2	0,08	1,79	0,00
	3	0,16	0,82	0,00
	13	0,14	2,21	0,00
	14	0,21	1,66	0,00
	15	0,29		0,00
Silymarin	4	-0,07	2,26	0,00
	5	-0,02	2,45	0,00
	6	0,14	2,10	0,00
	16	0,17		0,00
	17	-0,19	2,52	0,00
	18	-0,02	1,30	0,00
PUFA	7	-0,15	2,23	0,00
	8	0,12	2,49	0,00
	9	0,27	2,28	0,00
	19	0,22	2,04	0,00
	20	-0,14	2,15	0,00
	21	0,05	2,40	0,00
PUFA + silymarin	10	0,26	1,22	0,00
	11	0,30	1,81	0,00
	12	0,10	1,93	0,00
	22	0,32	2,22	0,00
	23	0,14	2,23	0,00

Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin), PUFA (STD + omega-3 nenasycené mastné kyseliny) a PUFA + silymarin (STD + silymarin + omega-3 nenasycené mastné kyseliny).

Tyto hodnoty byly dále zpracovány jako $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Výsledky jsou uvedeny níže:

Tabulka 9: Rozdíly hodnot Ct upravené metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro studované geny mezi skupinami HHTg potkanů.

	Vzorek č.	Cyp3a	Cyp2e	Hprt
Kontrola	1	1,01	0,24	1,00
	2	0,94	0,29	1,00
	3	0,90		1,00
	13	0,91	0,22	1,00
	14	0,87	0,32	1,00
	15	0,82		1,00
Silymarin	4	1,05	0,21	1,00
	5	1,02	0,18	1,00
	6	0,91	0,23	1,00
	16	0,89		1,00
	17	1,14	0,17	1,00
	18	1,01		1,00
PUFA	7	1,11	0,21	1,00
	8	0,92	0,18	1,00
	9	0,83	0,21	1,00
	19	0,86	0,24	1,00
	20	1,11	0,23	1,00
	21	0,97	0,19	1,00
PUFA + silymarin	10	0,83	0,29	1,00
	11	0,81	0,26	1,00
	12	0,93	0,22	1,00
	22	0,80	0,21	1,00
	23	0,91	0,27	1,00

Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin), PUFA (STD + omega-3 nenasycené mastné kyseliny) a PUFA + silymarin (STD + silymarin + omega-3 nenasycené mastné kyseliny).

Poté byla tato čísla vztažena ke kontrole. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 10: Hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analyzovaných genů HHTg potkanů vztaženy ke kontrolní skupině.

	Vzorek č.	Cyp3a	Cyp2e	Hprt
Kontrola	1	1,11	0,92	1,00
	2	1,04	1,08	1,00
	3	0,99		1,00
	13	1,00	0,81	1,00
	14	0,95	1,19	1,00
	15	0,90		1,00
Silymarin	4	1,16	0,78	1,00
	5	1,12	0,69	1,00
	6	1,00	0,88	1,00
	16	0,98		1,00
	17	1,26	0,65	1,00
	18	1,12		1,00
PUFA	7	1,22	0,80	1,00
	8	1,02	0,67	1,00
	9	0,91	0,77	1,00
	19	0,95	0,92	1,00
	20	1,22	0,85	1,00
	21	1,07	0,71	1,00
PUFA + silymarin	10	0,92		1,00
	11	0,89	1,07	1,00
	12	1,03	0,99	1,00
	22	0,88	0,81	1,00
	23	1,00	0,80	1,00

Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin), PUFA (STD + omega-3 nenasycené mastné kyseliny) a PUFA + silymarin (STD + silymarin + omega-3 nenasycené mastné kyseliny).

Takto získané hodnoty byly zprůměrovány v jednotlivých skupinách podle diety zvlášť pro každý gen a výsledky byly zaneseny do grafu.

3.8. Statistické hodnocení výsledků

Všechny data získaných komparativní metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ byla statisticky analyzována pomocí programu Statistica 12 (StatSoft, Praha ČR). Pro statistickou analýzu byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test, který porovnával všechny skupiny potkanů mezi

sebou, a Mann-Whitneyho U test, který porovnával jen 2 vybrané skupiny. Testování významnosti bylo provedeno na hladině významnosti 0,05.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tabulka 11: Výsledky spektrofotometrického měření koncentrace a čistoty mRNA izolované ze střevní tkáně HHTg potkanů na různé dietě.

Skupina	Sample ID	260/280	260/230	Koncentrace [ng/ul]	mRNA[μ l]	Voda[μ l]
Kontrola	PUFA_TS_01	2,18	2,02	298,3	3,35	6,05
	PUFA_TS_02	2,20	2,17	2825,0	0,35	9,05
	PUFA_TS_03	2,17	2,20	2088,7	0,48	8,92
Silymarin	PUFA_TS_04	2,02	2,16	1693,9	0,59	8,81
	PUFA_TS_05	2,16	2,08	2142,8	0,47	8,93
	PUFA_TS_06	2,15	2,24	2064,2	0,48	8,92
PUFA	PUFA_TS_07	2,19	1,95	1720,6	0,58	8,82
	PUFA_TS_08	2,18	2,33	4654,5	0,21	9,19
	PUFA_TS_09	2,12	2,23	3020,3	0,33	9,07
PUFA + silymarin	PUFA_TS_10	2,15	2,31	3570,3	0,28	9,12
	PUFA_TS_11	2,15	2,34	4482,5	0,22	9,18
	PUFA_TS_12	2,07	2,32	1784,2	0,56	8,84
Kontrola	PUFA_TS_13	2,21	2,21	702,1	1,42	7,98
	PUFA_TS_14	2,17	2,14	488,3	2,05	7,35
	PUFA_TS_15	2,08	2,06	399,7	2,50	6,90
Silymarin	PUFA_TS_16	2,16	2,30	546,0	1,83	7,57
	PUFA_TS_17	2,05	2,34	1260,4	0,79	8,61
	PUFA_TS_18	2,15	2,26	3201,6	0,31	9,09
PUFA	PUFA_TS_19	2,17	2,25	5577,8	0,18	9,22
	PUFA_TS_20	2,06	2,46	1662,3	0,60	8,80
	PUFA_TS_21	2,07	2,45	1996,5	0,50	8,90
PUFA + silymarin	PUFA_TS_22	2,16	2,31	4437,6	0,23	9,17
	PUFA_TS_23	2,08	2,40	2810,8	0,36	9,04

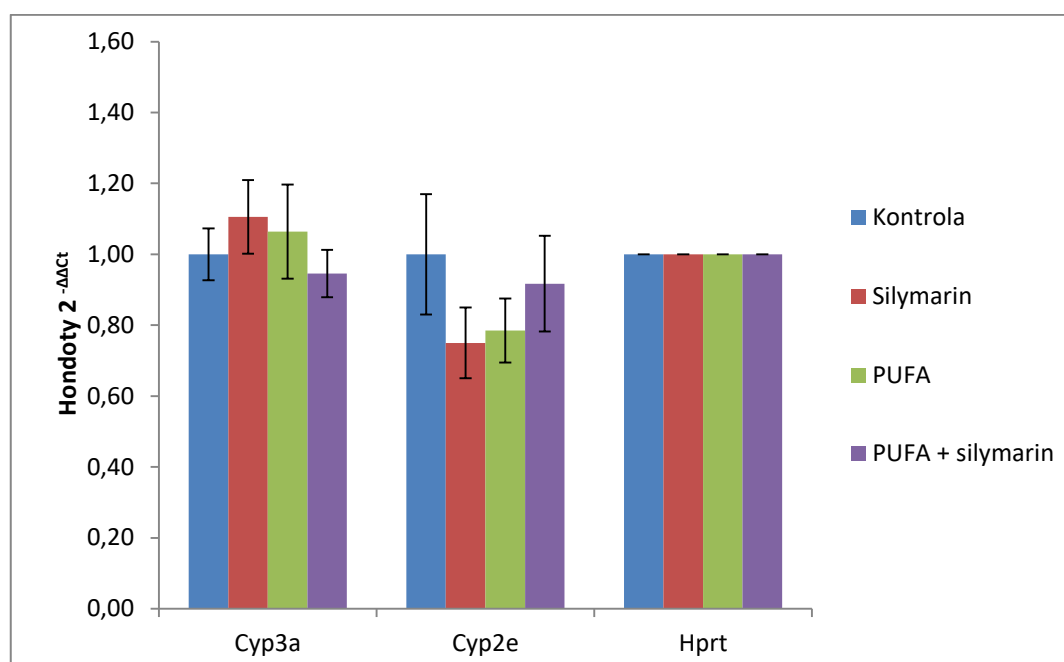
Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin), PUFA (STD + omega-3 nenasycené mastné kyseliny) a PUFA + silymarin (STD + silymarin + omega-3 nenasycené mastné kyseliny).

Poměr **260/280 nm** udává čistotu nukleových kyselin, pro RNA by tato hodnota měla být kolem 2,0. Pokud je menší, než 1,75 je vzorek značně kontaminován proteiny. Poměr **260/230 nm** udávající čistotu by se měl pohybovat v rozmezí 2,0 - 2,2. Pokud je tato hodnota nižší, je zde kontaminace sacharidy či zbytkovým fenolem.

Tabulka 12: Průměrné hodnoty relativního množství mRNA CYP3A, CYP2E1 a housekeeping genu v tenkém střevě ve skupinách HHTg potkanů, získané vyhodnocením metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a vztahením ke kontrole.

	Cyp3a	Cyp2e	Hprt
Kontrola	1,00	1,00	1,00
Silymarin mikro	1,11	0,75	1,00
PUFA	1,06	0,79	1,00
PUFA + silymarin	0,95	0,92	1,00

Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin), PUFA (STD + omega-3 nenasycené mastné kyseliny) a PUFA + silymarin (STD + silymarin + omega-3 nenasycené mastné kyseliny)



Graf 1: Změna exprese mRNA sledovaných genů Cyp3a a Cyp2e1 u HHTg potkana po čtyřech týdnech podávané diety. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin mikro (STD + mikronizovaný silymarin), PUFA (STD + omega-3 nenasycené mastné kyseliny) a PUFA + silymarin (STD + silymarin + omega-3 nenasycené mastné kyseliny).

Ohledně stanovování exprese mRNA vybraných CYPs ve střevní tkáni potkanů doposud nevyšlo mnoho prací. Stejně tak na Ústavu farmakologie LF UP byla exprese mRNA CYPs stanovována pouze v jaterní tkáni, jelikož je to místo s nejhojnějším výskytem

těchto enzymů. Při zpracování této problematiky jsem tedy nevycházela z žádných předpokladů.

Konkrétně jsem se zabývala vlivem přírodních látek (silymarin a PUFA) na expresi mRNA, u kterých byl prokázán určitý účinek v souvislosti s příznaky metabolického syndromu. Silymarin stejně, jako DHA a EPA, napomáhá při snižování celkové hladiny cholesterolu, navíc byl prokázán jeho vliv na zvyšování hladiny HDL-ch, který se uplatňuje při reverzním transportu cholesterolu. Také je významná jeho schopnost snižovat hladinu sérové glukózy u HHTg potkanů. Ve studii R. Večeří et al. (2013) je prokázána schopnost silymarinu významně zvýšit expresi mRNA jaterního CYP2C6 u stejného zvířecího modelu, jaký byl použit i pro mou práci. Jedná se však o jinou tkáň a jiný enzym, takže se nedalo úplně očekávat, že by výsledky byly totožné.

Hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani byli zvoleni pro mou práci, jelikož představují zvířecí neobézní model metabolického syndromu. Pro studii bylo vybráno 23 samců potkanů, kteří byli rozděleni do 4 skupin na základně podávané diety. První skupině, jakožto kontrole, byla podávána standardní laboratorní dieta (STD), druhá skupina dostávala STD v kombinaci s mikronizovaným silymarinem, třetí skupina STD a PUFA a poslední skupině byla spolu s STD podávána kombinace mikronizovaný silymarin + PUFA. Takto nastavenou dietou byli potkani krmeni 4 týdny.

Co se týče výsledků práce, u CYP3A nebyla zjištěna žádná výrazná změna v expresi mRNA u experimentálních skupin v porovnání s kontrolní skupinou potkanů. U skupiny potkanů, kterým byl podáván mikronizovaný silymarin nebo PUFA, došlo pouze k nepatrnému zvýšení exprese, což se nedá považovat za významné. Stejně tak je to i s minimálním poklesem exprese mRNA v případě skupiny potkanů, kterým byla podávána kombinace silymarinu a PUFA. Pro CYP2E1 je z Grafu 1 patrné, že v případech, kdy byl potkanům podáván mikronizovaný silymarin, PUFA nebo kombinace obou látek, došlo k malému poklesu exprese mRNA. Největší pokles byl zaznamenán v případě diety obsahující samotný silymarin. Tyto změny byly statisticky vyhodnoceny pomocí neparametrických testů (Kruskal-Wallisova testu a Mann Whitneyho *U* testu) a vyšly jako statisticky nevýznamné. Také bylo zjištěno, že ve střední tkáni HHTg potkanů se nachází poměrně málo genu *Cyp2e1*. Hodnoty získané ze vzorků 3, 15, 16 a 18 pro gen *Cyp2e1* nebyly zahrnuty do výsledků, protože se příliš odlišovaly od ostatních.

Tyto výsledky je možno vnímat celkem pozitivně. Pokud by totiž došlo k výraznému snížení exprese mRNA CYP3A, jež se podílí na metabolismu zhruba 60 % léčivých látek, mohlo by v případě současného podání substrátu CYP3A dojít k lékovým interakcím. Při takové interakci, kdy se léčivo méně metabolizuje na neúčinnou látku, by účinná složka kolovala v organismu déle a v horším případě by mohlo dojít až k předávkování léčivem.

V případě látek, sledovaných v této práci, nedošlo k výrazným změnám v expresi mRNA CYP3A, a mohu tedy říci, že užití těchto přírodních složek se zdá být bezpečné v léčbě metabolického syndromu. Naopak mírné snížení exprese mRNA CYP2E1 se jeví jako pozitivní. Při nadměrném metabolismu zprostředkovaném tímto enzymem dochází k oxidaci malých molekul, jež jsou reaktivní a zánětlivé. Při jejich nahromadění dochází k oxidativnímu stresu v tkáních, což může mít patologické následky (Lieber, 2004).

Je však nutné mít na paměti, že výsledky získané z této studie, kde byli použiti HHTg potkaní, nemusí zcela odpovídat důsledkům, jaké by byly u člověka. Cytochromy P450 potkanů nejsou zcela identické s lidskými, i když mohou vykazovat vysokou sekvenční identitu. Rovněž je podstatné zmínit, že CYP3A4 je u lidských populací vysoce variabilní. Existuje více než 20 variant alel pro tento gen, které jsou spojeny buď s vyššími, nebo nižšími rychlostmi katalytické aktivity. U potkanů bylo také zjištěno více forem tohoto CYP, než u lidí, což sebou nese i určité rozdíly v metabolismu léčiv (Martignoni et al., 2006).

Jelikož tato oblast nebyla dosud příliš zkoumána, nabízí se zde spousta možností studia aktivity a exprese mRNA CYPs ve střevní tkáni a případného vlivu různých léčiv, ať již v souvislosti s metabolickým syndromem, či dalšími civilizačními onemocněními.

5. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení exprese mRNA CYP2E1 a CYP3A u HHTg potkanů, kterým byla podávána standardní laboratorní dieta samotná (kontrolní skupina) nebo s obsahem PUFA, silymarinu nebo kombinací obou. V této práci bylo zjištěno, že nedošlo k žádným výrazným změnám v expresi mRNA CYP3A u žádné z testovaných skupin v porovnání s kontrolní skupinou. U CYP2E1 bylo detekováno mírné snížení exprese mRNA u skupin potkanů, kterým byl podáván silymarin, PUFA a jejich kombinace. Toto snížení však bylo vyhodnoceno jako statisticky nevýznamné. Získané výsledky se jeví v celku jako pozitivní z pohledu metabolismu především léčivých přípravků zprostředkovaného těmito CYPs.

Ohledně problematiky týkající se této práce byla vypracována literární rešerše. Ke stanovení exprese byla použita metoda RT-PCR a data z ní získaná byla statisticky zpracována a porovnána mezi jednotlivými skupinami potkanů, lišícími se podávanou dietou.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(5), 737–747. <https://doi.org/10.1007/PL00000897>
- Bialecka, M. (1997). [The effect of bioflavonoids and lecithin on the course of experimental atherosclerosis in rabbits]. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, 43, 41–56.
- Dai, D., Zeldin, D. C., Blaisdell, J. A., Chanas, B., Coulter, S. J., Ghanayem, B. I., & Goldstein, J. A. (2001). Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics*, 11(7), 597–607. <https://doi.org/10.1097/00008571-200110000-00006>
- Devynck, M. A., Kunes, J., Le Quan Sang, K. H., & Zicha, J. (1998). Membrane microviscosity and plasma triacylglycerols in the rat. *Clin Sci (Lond)*, 94(1), 79–85. <https://doi.org/10.1042/cs0940079>
- Di Pierro, F., Callegari, A., Carotenuto, D., & Tapia, M. M. (2008). Clinical efficacy, safety and tolerability of BIO-C® (micronized Silymarin) as a galactagogue. *Acta Biomedica de l'Ateneo Parmense*, 79(3), 205–210.
- Eggertsen, G., Olin, M., Andersson, U., Ishida, H., Kubota, S., Hellman, U., ... Björkhem, I. (1996). Molecular cloning and expression of rabbit sterol 12alpha-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 32269–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943286>
- Enjalbert, F., Rapior, S., Nouguié-Soulé, J., Guillon, S., Amouroux, N., & Cabot, C. (2002). Treatment of amatoxin poisoning: 20-Year retrospective analysis. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 40(6), 715–757. <https://doi.org/10.1081/CLT-120014646>
- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.23192>
- Federspil, G., Nisoli, E., & Vettor, R. (2006). A critical reflection on the definition of metabolic syndrome. *Pharmacological Research*, 53(6), 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.03.008>
- Galassi, A., Reynolds, K., & He, J. (2006). Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am J Med*, 119(10), 812–819. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.02.031>
- Goeptar, A. R., Scheerens, H., & Vermeulen, N. P. E. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome p450. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(1), 25–65. <https://doi.org/10.3109/10408449509089886>
- Guengerich, F. P. (1997). Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chemico-Biological Interactions*. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00068-9)
- Guengerich, F. P. (2013). Kinetic deuterium isotope effects in cytochrome P450 oxidation reactions. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3031>

- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Huseini, H. F., Larijani, B., Heshmat, R., Fakhrzadeh, H., Radjabipour, B., Toliat, T., & Raza, M. (2006). The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phytotherapy Research : PTR*, 20(12), 1036–9. <https://doi.org/10.1002/ptr.1988>
- Ioannides, C. (1999). Effect of diet and nutrition on the expression of cytochromes P450. *Xenobiotica*. <https://doi.org/10.1080/004982599238704>
- Kidd, P., & Head, K. (2005). A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: A silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos??). *Alternative Medicine Review*.
- Kuneš, J., Devynck, M. A., & Zicha, J. (2000). Chronic changes in plasma triglyceride levels do modify platelet membrane microviscosity in rats. *Life Sciences*, 67(8), 959–967. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00691-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00691-3)
- Kunes, J., Dobesová, Z., & Zicha, J. (2002). Altered balance of main vasopressor and vasodepressor systems in rats with genetic hypertension and hypertriglyceridaemia. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 102(3), 269–77. <https://doi.org/10.1042/CS20010214>
- Leaf, A., Xiao, Y. F., Kang, J. X., & Billman, G. E. (2003). Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacology and Therapeutics*, 98(3), 355–377. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00039-1)
- Lieber, C. S. (1997). Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiological Reviews*, 77(2), 517–544. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/77/2/517.abstract>
- Lieber, C. S. (2004). The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metabolism Reviews*. <https://doi.org/10.1081/DMR-200033441>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loguercio, C., & Festi, D. C.-P. (2011). Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. *World J Gastroenterol*, 17, 2288–2301. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i18.2288>
- Lorbek, G., Lewinska, M., & Rozman, D. (2012). Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids - From mouse models to human diseases. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08432.x>
- Lu, C., & Li, A. P. (2001). Species comparison in P450 induction: Effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chemico-Biological Interactions*, 134(3), 271–281. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(01\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00162-4)
- Lund, E. G., Guileyardo, J. M., & Russell, D. W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7238–43. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.13.7238>

- Lynch, T., & Price, A. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American Family Physician*, 76(3), 391–396. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00073.x>
- Marill, J., Cresteil, T., Lanotte, M., & Chabot, G. G. (2000). Identification of human cytochrome P450s involved in the formation of all-trans-retinoic acid principal metabolites. *Molecular Pharmacology*, 58(6), 1341–1348.
- Martignoni, M., Groothuis, G., & de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 6, 875–94. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>
- Matušková, Z., Poruba, M., & Anzenbacher, P. (2014). Cytochromy P450: Role v metabolizmu cholesterolu. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 28(4), 142–146.
- McKinnon, R. A., Burgess, W. M., Hall, P. M., Roberts-Thomson, S. J., Gonzalez, F. J., & McManus, M. E. (1995). Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut*, 36(2), 259–67. <https://doi.org/10.1136/gut.36.2.259>
- Meunier, B., de Visser, S. P., & Shaik, S. (2004). Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews*, 104(9), 3947–3980. <https://doi.org/10.1021/cr020443g>
- Miguez, M. P., Anundi, I., Sainz-Pardo, L. A., & Lindros, K. O. (1994). Hepatoprotective mechanism of silymarin: No evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chemico-Biological Interactions*, 91(1), 51–63. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0009-2797(94)90006-X)
- Morazzoni, P., Montalbetti, A., Malandrino, S., & Pifferi, G. (1993). Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 18(3), 289–297. <https://doi.org/10.1007/BF03188811>
- Mottillo, S., Filion, K. B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P., ... Eisenberg, M. J. (2010). The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*, 56(14), 1113–1132. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.05.034>
- Nebert, D. W., & Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, 360(9340), 1155–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., ... Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. <https://doi.org/10.1097/00008571-199602000-00002>
- Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S., & Satoh, T. (2003). Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 123(5), 369–375. <https://doi.org/10.1248/yakushi.123.369>
- P.B. Danielson, B. S. P. (2002). The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism*, 3(6), 561–597. <https://doi.org/10.2174/1389200023337054>

- Pernollet, M. G., Kunes, J., Zicha, J., & Devynck, M. A. (2001). Cyclic nucleotides in platelets of genetically hypertriglyceridemic and hypertensive rats - Thrombin and nitric oxide responses are unrelated to plasma triglyceride levels. *Thrombosis Research*, *104*(1), 29–37. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00345-0](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00345-0)
- Poruba, M., Kazdová, L., Oliyarnyk, O., Malinská, H., Matusková, Z., Tozzi di Angelo, I., ... Vecera, R. (2015). Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, *8254*(November), 1–6. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1010633>
- Poruba, M., Matušková, Z., Kazdová, L., Oliyarnyk, O., Malíská, H., Tozzi di Angelo, I., & Večeřa, R. (2015). Positive effects of different drug forms of silybin in the treatment of metabolic syndrome. *Physiological Research*, *64*, S507–S512.
- Pradhan, S. C., & Girish, C. (2013). Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian Journal of Medical Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.004>
- Radjabian, T., & Fallah Huseini, H. (2010). Anti-hyperlipidemic and anti-atherosclerotic activities of silymarins from cultivated and wild plants of *Silybum marianum* L. with different content of flavonolignans. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, *9*(2), 63–67.
- Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., & Millington, K. J. (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x>
- Saller, R., Melzer, J., Reichling, J., Brignoli, R., & Meier, R. (2007). An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Forschende Komplementarmedizin*, *14*(2), 70–80. <https://doi.org/10.1159/000100581>
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., & Guengerich, F. P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *270*(1), 414–423.
- Smith, D. A. (1991). Species differences in metabolism and pharmacokinetics: Are we close to an understanding? *Drug Metabolism Reviews*, *23*(3–4), 355–373. <https://doi.org/10.3109/03602539109029764>
- Stiles, A. R., McDonald, J. G., Bauman, D. R., & Russell, D. W. (2009). CYP7B1: One cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.042168>
- Thummel, K. E., & Wilkinson, G. R. (1998). IN VITRO AND IN VIVO DRUG INTERACTIONS INVOLVING HUMAN CYP3A. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *38*(1), 389–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.389>
- Trouillas, P., Marsal, P., Svobodová, A., Vostálová, J., Gažák, R., Hrbáč, J., ... Walterová, D. (2008). Mechanism of the Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry A*, *112*(5), 1054–1063. <https://doi.org/10.1021/jp075814h>

- Ulven, S. M., Leder, L., Elind, E., Ottestad, I., Christensen, J. J., Telle-Hansen, V. H., ... Holven, K. B. (2016). Exchanging a few commercial, regularly consumed food items with improved fat quality reduces total cholesterol and LDL-cholesterol: a double-blind, randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*, *116*(8), 1383–1393.
<https://doi.org/10.1017/S0007114516003445>
- Valenzuela, A., & Garrido, A. (1994). Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological Research*, *27*(2), 105–112.
- Vecera, R., Zacharova, A., Kazdova, L., Matuskova, Z., Skottova, N., Strojil, J., ... Anzenbacher, P. (2013). Silybin affects the liver microsomal CYP2C6 in HHTg rats. *Biomedical Papers-Olomouc*, *157*(1), S60–S64.
- Yamazaki, H., & Guo, Z. (1995). In Chlorzoxazone, 438–440.
- Zicha, J., Pechanová, O., Cacányiová, S., Cebová, M., Kristek, F., Török, J., ... Kuneš, J. (2006). Hereditary hypertriglyceridemic rat: A suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiological Research*, *55*(SUPPL. 1).