

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Vliv atorvastatinu a silymarinu na množství
proteinu vybraných enzymů a transportérů u
potkaního modelu metabolického syndromu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Veronika Žďárská
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	PharmDr. Martin Poruba, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora Veronika Žďárská
Název práce Vliv atorvastatinu a silymarinu na množství proteinu vybraných enzymů a transportérů u potkaního modelu metabolického syndromu
Typ práce Diplomová
Pracoviště Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce PharmDr. Martin Poruba, Ph.D.
Rok obhajoby práce 2020

Abstrakt

Tato práce pojednává o vlivu silymarinu a atorvastatinu na metabolický syndrom, který je spojován s rozvojem kardiovaskulárních onemocnění, vznikem diabetu II. typu a obezitou. Vliv těchto látek byl sledován v souvislosti s množstvím proteinu CYP1A, CYP3A a CYP7A1, které se mj. podílejí na metabolismu léčiv, cholesterolu a dalších nízkomolekulárních sloučenin. Množství proteinu bylo zjišťováno také u HMGCR, což je enzym účastnící se biosyntézy cholesterolu a u transportéru ABCB1, který hraje významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv. Pro tuto studii byli používáni hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, protože představují neobézni model metabolického syndromu. Vliv výše zmíněných látek na množství proteinu u vybraných enzymů a transportérů byl studován pomocí metody Western blot. Zjištěno bylo, že v případě CYP1A, CYP3A, CYP7A1 a ABCB1 nedošlo k rozdílům v množství proteinů mezi jednotlivými skupinami pokusných zvířat. V případě HMGCR došlo k nárůstu proteinů u skupin, kterým byl podáván atorvastatin a atorvastatin v kombinaci se silymarinem. Studované látky potvrdily vzájemný pozitivní vliv na lipidové parametry bez významného ovlivnění množství proteinu sledovaných cytochromů P450 a transportéru.

Klíčová slova HHTg potkan, metabolický syndrom, silymarin, atorvastatin, cytochromy P450, P-glykoprotein
Počet stran 47
Počet příloh 0
Jazyk Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Veronika Žďárská
Title of thesis	Effects of atorvastatin and silymarin on the protein content of selected enzymes and trasporters in rat metabolic syndrom model
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	PharmDr. Martin Poruba, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

This thesis deals with the effect of silymarin and atorvastatin on the metabolic syndrome, which is associated with the development of cardiovascular disease, the development of diabetes type II and obesity. The effect of these substances was monitored in connection with the amount of protein of CYP1A, CYP3A and CYP7A1, which, among other things, are involved in the metabolism of drugs, cholesterol and other low molecular weight compounds. Protein levels have also been found in HMGCR, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, and in the ABCB1 transporter, which plays an important role in the absorption, distribution and elimination of a number of drugs. Hereditary hypertriglyceridemic rats were used for this study because they represent a non-obese model of metabolic syndrome. The effect of the mentioned substances on the amount of protein in selected enzymes and transporters was determined by Western blot method. It was found that for CYP1A, CYP3A, CYP7A1 and ABCB1, there were no differences in the amount of protein between the groups of experimental animals. For HMGCR, there was an increase in protein in the atorvastatin group and atorvastatin in combination with silymarin group. In conclusion, both tested drugs significantly decreased hypertriglyceridemia associated with metabolic syndrome and do not involve the protein expression of studied cytochromes P450 and transport protein.

Keywords	HHTg rat, metabolic syndrom, silymarin, atorvastatin, cyrochromes P450, P-glycoprotein
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

Děkuji PharmDr. Martinu Porubovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při získávání a zpracovávání výsledků. Děkuji také Institutu Klinické a Experimentální Medicíny v Praze za poskytnutí unikátního zvířecího modelu. Dále bych chtěla poděkovat IGA_LF_2020_009 a grantu GAČR 17-08888S. Rovněž děkuji všem blízkým, kteří mě během psaní i celého studia podporovali.

Obsah

1.	ÚVOD	8
1.	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1.1.	Cytochrom P450	9
2.2.1.	CYP3A	13
2.2.2.	CYP1A2	14
2.2.3.	CYP7A1	14
2.3.	P-glykoprotein	15
2.4.	Hydroxymethylglutharyl-CoA reductasa.....	16
2.5.	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa	17
2.6.	Metabolický syndrom	18
2.7.	Atorvastatin.....	19
2.8.	Silymarin	20
2.9.	Hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani	22
2.10.	Western blot.....	22
3.	METODY.....	24
3.1.	Biologický materiál	24
3.2.	Použité chemikálie.....	24
3.3.	Použité roztoky	25
3.4.	Použité protilátky	25
3.5.	Použité přístroje a zařízení.....	26
3.6.	Stanovení lipidových parametrů	26
3.7.	Homogenizace jaterní tkáně	26
3.8.	Příprava vzorků na elektroforézu	27
3.9.	Elektroforéza a Western blot	28
3.10.	Zpracování výsledků.....	29
3.11.	Statistické zpracování	29
4.	VÝSLEDKY	30
4.1.	Hmotnost potkanů před dekapitací	30
4.2.	Plasmatické lipidy	30
4.3.	Stanovené množství proteinů	31
5.	DISKUZE	36
6.	ZÁVĚR	39
7.	SEZNAM LITERATURY.....	40

Abecední seznam zkratk:

ATP – adenosintrifosfát

CoA – koenzym A

CYP – cytochrom P450

GAPDH – glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa

HDL – lipoproteiny s vysokou hustotou

HHTg – hereditárně hypertriglyceridemický

HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutharyl koenzym A

HMGCR – hydroxymethylglutharyl koenzym A reduktasa

LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou

NKEM – nenasycené mastné kyseliny

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza

PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky

P-gp – P-glykoprotein

PMSF – fenylmethylsulfonil fluorid

PXR – pregnanový X receptor

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězcová reakce

SDS – dodecylsírán sodný

SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným

STD – standardní laboratorní dieta

TG - triacylglyceroly

TNF – tumor nekrotizující faktor

1. ÚVOD

V současné době se čím dál tím častěji setkáváme se zdravotními komplikacemi spojenými se špatným životním stylem. Mezi ně můžeme zařadit např. zvýšenou hladinu cholesterolu, obezitu, zvýšenou hladinu glukosy v krvi, aterosklerózu a další. Společný výskyt více takovýchto abnormalit označujeme jako metabolický syndrom. V předešlých studiích bylo zjištěno, že příznivý účinek na některé složky metabolického syndromu vykazuje silymarin. Jedná se o extrakt pocházející ze semen rostliny ostropestřec mariánský (*Silybum marianum L.*) Další přípravek vhodný pro léčbu zejména hypercholesterolemie je atorvastatin. Atorvastatin patří do skupiny statinů, které snižují množství tuků v těle, především LDL cholesterol.

Cílem této práce bylo zdokonalit se v práci s biologickým materiálem, jeho zpracováním a využitím pro stanovení množství proteinu. Dále v rámci teoretické části vypracovat rešerši věnující se vlastnostem studovaných enzymů a transportérů CYP3A, CYP1A2, CYP7A1, HMGCR a ABCB1. V praktické části diplomové práce bylo cílem, za využití laboratorní techniky, separovat jednotlivé proteiny, následně je detekovat pomocí specifických protilátek a výsledky vzájemně porovnat mezi jednotlivými skupinami pokusných zvířat.

1. TEORETICKÁ ČÁST

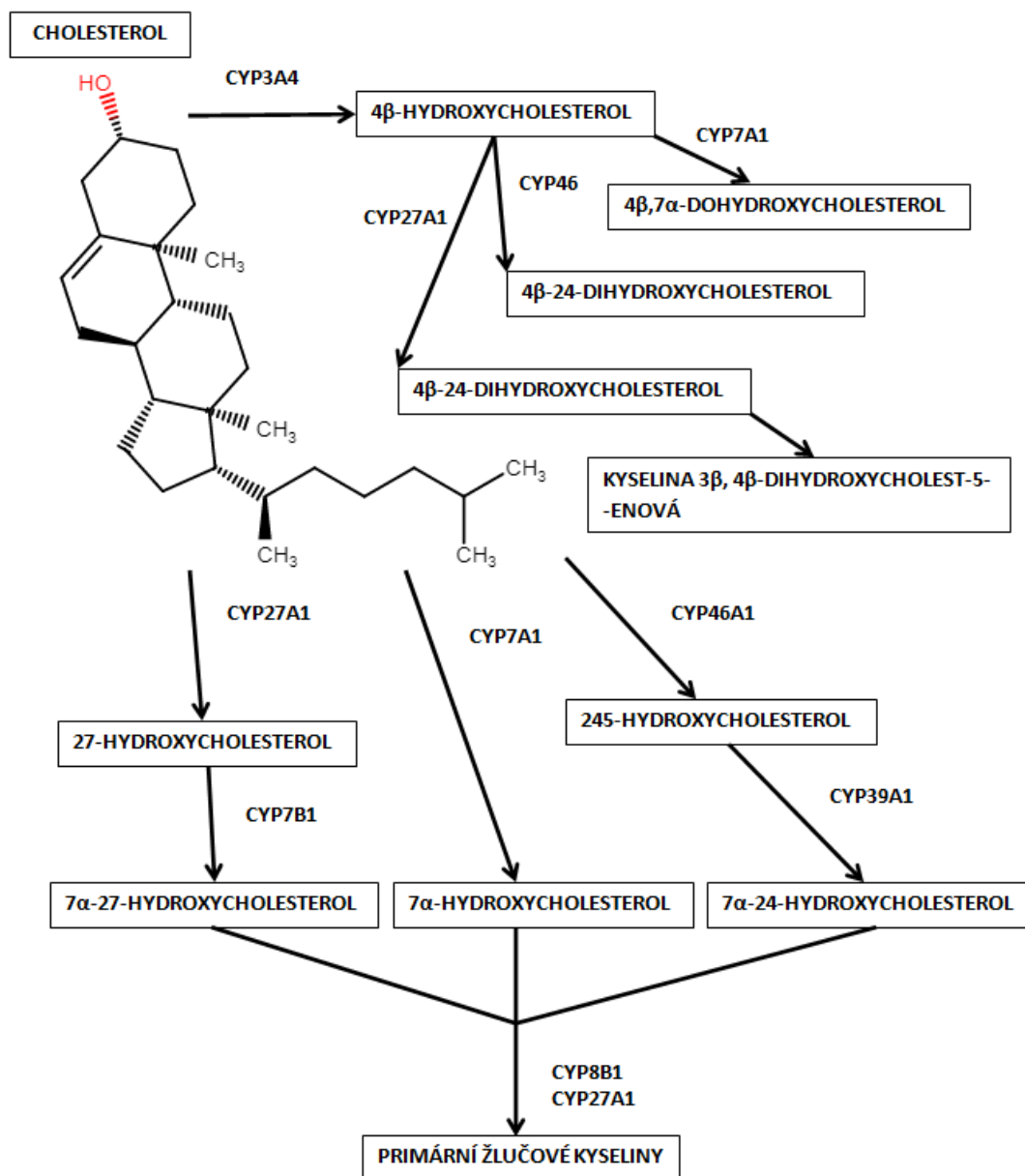
1.1. Cytochrom P450

Cytochromy P450 představují superrodinu enzymů, kterou lze najít, nejen u člověka a zvířat, ale také u rostlin a bakterií. (Nelson et al., 1996). U zmíněných skupin organismů se nachází různé množství těchto enzymů. Důvodem může být odlišný způsob života a s ním specifické potřeby příslušných funkcí. Zatímco u bakterií je počet cytochromů P450 až 20, u lidí se očekává asi 60. Co se rostlin týče, byl celkový počet u jednoho druhu odhadován na více než 300, což dokazují studie genomu *Arabidopsis thaliana* (Nelson, 1999). Rostliny totiž potřebují své cytochromy P450 hlavně ze dvou důvodů; pro syntézu pigmentů a růstových regulátorů a pro syntézu rostlinných toxinů (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

Od roku 1991 jsou cytochromy P450 a jejich příslušné geny pojmenovány jako CYP. Po zkratce CYP následuje arabská číslice, která vyjadřuje číslo rodiny, např. CYP3. Toto číslo může být spojeno s funkcí enzymu nebo může být vybráno libovolně vzhledem k pořadí objevení. Cytochromy P450 tvořící rodinu by měly mít ve svých překrývajících se částech podobné sekvence, limit je 40 %. Pokud je potřeba rodinu dále rozdělit, vytvoří se podrodina na základě vyššího stupně sekvenční podobnosti (55 %). Podrodiny v jedné rodině jsou označeny postupně jako např. CYP3A, CYP3B atd. Jednotliví členové rodiny nebo podrodiny jsou znovu označeni arabskými číslicemi (např. CYP3A4, CYP3A7). Pro rozlišení jednotlivých členů by se nová sekvence cytochromu měla lišit o více než 3 % (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001; Nebert & Nelson, 1991).

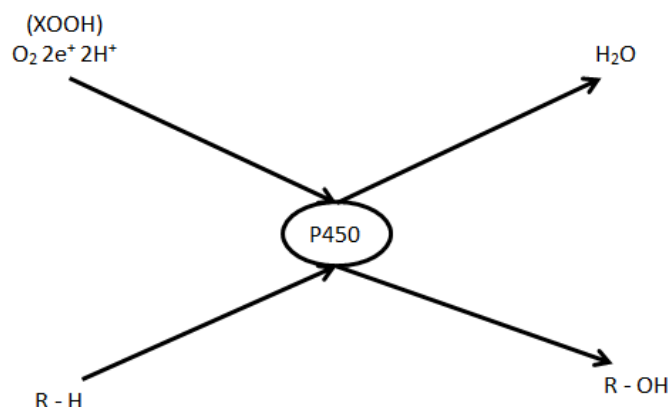
Největší pozornost byla zaměřena na lidské cytochromy P450. Ty se podílejí na biosyntéze nízkomolekulárních sloučenin (steroidy, prostaglandiny, tromboxany, deriváty mastných kyselin a deriváty kyseliny retinové) působících jako regulátory na různých úrovních a v různých procesech v lidském organismu (de Montellano, 2015). Velký význam mají v metabolismu cholesterolu. Metabolizují ho na žlučové kyseliny nebo naopak napomáhají syntéze steroidních hormonů. Syntéza žlučových kyselin je iniciována CYP7A1, tím že do α -konfigurace na sedmém uhlíku β -kruhu cholesterolu je zavedena hydroxylová skupina. Tento krok je z hlediska rychlosti syntézy limitující, tzn., že syntéza žlučových kyselin závisí na rychlosti tohoto kroku. Jedná se o tzv. klasickou cestu

biosyntézy primárních žlučových kyselin (kyselina cholová a kyselina chenodeoxycholová) z cholesterolu. Při syntéze kyseliny cholové je uplatňována 12α -hydroxylasa, což je CYP8B1. Žlučové kyseliny mohou být tvořeny alternativní (někdy také kyselou) cestou, ve které je zapojen CYP27A1. Ten zodpovídá za hydroxylaci cholesterolu na 27-hydroxycholesterol. CYP7B1 poté 27-hydroxycholesterol hydroxyluje na $7\alpha,27$ -dihydroxycholesterol. Enzym CYP7B1 je zapojen také do syntézy steroidních hormonů, proto je exprimován nejvíce v ledvinách a mozku. V mozkových neuronech se exprimuje také CYP46A1, který hydroxyluje cholesterol, případně 4β -hydroxycholesterol. Oxidované produkty cholesterolu (oxysteroly) mohou volně procházet přes hematoencefalickou bariéru, což v případě samotného cholesterolu není možné. Sloučenina 4β -hydroxycholesterol vzniká působením CYP3A4/5. Enzym CYP3A4 je nejvíce zastoupeným CYP u lidí a metabolizuje zhruba jednu třetinu léčiv (Eggertsen et al., 1996; Lorbek et al., 2012; 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)

Společnou vlastností všech cytochromů P450 je schopnost vázat a aktivovat dva atomy kyslíku. Většinou se jedná o molekulu dioxygenu. Všechny cytochromy P450 jsou rovněž schopny vázat peroxid vodíku nebo peroxidy obecně a jeden z atomů kyslíku využívat pro monooxygenaci. Většina reakcí katalyzovaných těmito enzymy, tak může být vyjádřena následujícím schématem.



Obrázek 2: Schéma reakce katalyzované CYP450. R-H, substrát; R-OH, hydroxylovaný produkt; XOOH, peroxid; X=H nebo organický zbytek. (Převzato a upraveno z P. Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001)

Schopnost všech cytochromů P450 aktivovat Fe-O-O část je určena způsobem, jakým je hem (v tomto případě hem b) vázán na apoprotein. Centrální atom hemového makrocyklu, tj. železo, se váže na protein prostřednictvím aniontové thiolátové síry cysteinového zbytku. Tento typ vazby dává hemové skupině schopnost zprostředkovat přenos elektronové hustoty na dioxygen vázaný jako trans (šestý) ligand hemového železa. Tato vazba tedy také vysvětluje, proč má hem b (stejný jako u hemoglobinu a myoglobinu) tuto jedinečnou vlastnost, charakteristickou pro všechny cytochromy P450, aktivovat dioxygen pro chemické reakce (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001; Anzenbacher et al., 1989; Mansuy & Renaud, 1995). Kromě biosyntézy a biotransformace endogenních sloučenin se lidské cytochromy P450 podílejí hlavně na metabolizaci léčiv.

Mezi jednotlivými rodinami a podrodinami cytochromů P450 jsou patrné rozdíly, a to zejména v mechanismu enzymatické reakce spolu s pozorovaným účinkem jiných substrátů nebo efektorů, což souvisí také s rozdílnou funkcí cytochromů P450. Organismy se stále musí vypořádávat s mnoha novými látkami, což vede k syntéze nových vhodných molekul regulujících metabolismus. Právě proto jsou objevovány nové druhy cytochromů P450. Variabilita substrátové specifity, která se odráží ve variabilitě vlastních aktivních míst enzymů je tedy obrovská (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001; Guengerich, 1997).

2.2.1. CYP3A

Rodina CYP3 u člověka sestává pouze z jedné podrodiny CYP3A, která je lokalizována na dvacátém druhém chromozomu. Obsahuje čtyři geny CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43 (Nelson, 2006).

CYP3A je exprimován převážně v játrech, avšak u každého jedince ve velmi variabilním množství. Úplná absence exprese zatím nebyla definitivně prokázána. Průměrný mikrosomální obsah v játrech se pohybuje mezi 60 pmol/mg (Ohtsuki et al., 2012) - 146 pmol/mg mikrosomálního proteinu (Westlind-Johnsson et al., 2003), což představuje v průměru asi 14-24 % z mikrosomální skupiny cytochromu P450 (Lin et al., 2002; Ohtsuki et al., 2012; Shimada et al., 1994). Množství exprimované v játrech se však může v případě potřeby zvýšit až na 60 % (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001; Schmider et al., 1999). Exprese tří menších izoform, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43, je obecně nižší ve srovnání s CYP3A4 (Hustert et al., 2001; Westlind-Johnsson et al., 2003). CYP3A7 je více exprimován v játrech plodu než v játrech dospělých, ale detaily jeho působení zatím nebyly podrobně prostudovány (Cresteil, 1998; Leclerc et al., 2010). CYP3A4 je hlavním exprimovaným cytochromem P450 ve střevních enterocytech. Jeho množství ve střevní tkáni nekoreluje s množstvím v játrech. Střevní i jaterní CYP3A4 podstatně přispívá k metabolismu orálně podávaných léčiv (Daly, 2006; Ding & Kaminsky, 2003; Von Richter et al., 2004). V jiných extrahepatálních tkáních včetně dýchacích cest, mozku, plic a ledvin exprese CYP3A5 převládá nebo je podobná CYP3A4 (Bolbrinker et al., 2012; Daly, 2006; Raunio et al., 2005).

Jak již bylo naznačeno, CYP3A4 je tedy nejhojněji zastoupený člen rodiny CYP3 a ze všech cytochromů P450 má největší význam pro metabolismus léčiv u lidí, protože se do jisté míry podílí na přeměně asi jedné třetiny léčivých přípravků. Jedná se však o nestabilní enzym se složitým mechanismem účinku, který komplikuje *in vitro* studie (Schmider et al., 1999; Zanger & Schwab, 2013). Časté jsou rovněž nežádoucí lékové interakce, 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). Dokonce i látky přírodního původu mohou interferovat s jeho funkcí. Jednou takovou je šťáva z grapefruitu, která obsahuje inhibitor CYP3A4, který může způsobit mnohonásobné zvýšení sérových koncentrací některých léčiv (P.B. Danielson, 2002).

U ostatních živočichů, např. u myší nebo potkanů je známo více forem CYP3A. U myší je jich známo sedm u potkanů šest. Tyto rozdíly s sebou přinášejí možnost různého

způsobu metabolizace léčiv. Mnoho substrátů běžně metabolizovaných lidským CYP3A, nejsou přeměněny těmi potkaními (Guengerich, 1997; Lu & Li, 2001; Zanger & Schwab, 2013).

2.2.2. CYP1A2

Rodina cytochromů CYP1 sestává ze tří členů, CYP1A1, CYP1A3 a CYPB1. Dva členové CYP1A1 a CYP1A2 sice vykazují více než 70% identitu aminokyselinové sekvence, ale také velmi odlišné způsoby tkáňové exprese. CYP1A1 je exprimován primárně v extrahepatálních tkáních, jako jsou plíce, lymfocyty a placenta, zatímco v jaterní tkáni byla zjištěna nízká úroveň exprese. Naproti tomu CYP1A2 je exprimován primárně v játrech s malou, pokud vůbec detekovatelnou expresí v extrahepatálních tkáních (Schweikl et al., 1993; Shimada et al., 1989; Yun et al., 1991).

CYP1A2 je zodpovědný za metabolismus četných xenobiotických substrátů, včetně oxygenace polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), jako je např. karcinogen benzo(a)pyren. Také katalyzují N-oxidaci karcinogenních aromatických a heterocyklických aminů vyskytujících se v cigaretovém kouři nebo spálených potravinách (MacLeod et al., 1997). Transkripční regulace lidských CYP1A byla předmětem značného zájmu, neboť byla spojena s rizikem karcinogeneze, o nichž se předpokládá, že vznikají tvorbou aduktů mezi DNA a oxidovanými produkty reakcí katalyzovaných cytochromy P450 (MacLeod et al., 1997; Williams et al., 2000).

Kromě své role v bioaktivaci karcinogenů hraje CYP1A2 také malou roli v metabolismu řady léčiv jako jsou methylxantiny, včetně theofylinu a kofeinu (Gu et al., 1992), warfarinu (P.B. Danielson, 2002), granisetronu a tizanidinu (Corrigan et al., 1999). Bylo rovněž prokázáno, že CYP1A2 oxiduje uroporfyrinogen na uroporfyrin v průběhu metabolismu hemu a podílí se na hydroxylaci estrogenu. Je známo, že spolu s CYP2C19 hraje CYP1A2 významnou roli při přeměně pesticidu methoxychloru na jeho hlavní metabolit, monodemetylovaný derivát, produkt, který je estrogenní u lidí a několika živočišných druhů (Stresser & Kupfer, 1999).

2.2.3. CYP7A1

Rodina CYP7 se skládá ze dvou funkčních genů, CYP7A1 a CYP7B1. První z nich kóduje cholesterol 7- α -hydroxylázu, což je enzym, který katalyzuje první krok v klasické biosyntetické dráze žlučových kyselin. Nadměrná exprese CYP7A1 aktivuje klasickou

cestu biosyntézy žlučových kyselin, která zase způsobuje snížení aktivity hydroxymethylglutharyl CoA reduktasy a CoA-cholesterol acyltransferasy. Současně to vede ke zvýšení aktivity cholesterylester hydrolasy, expresi lipoproteinového receptoru s nízkou hustotou. Enzym CYP7A1 tedy hraje důležitou roli při udržování homeostázy hepatocelulárního cholesterolu (P.B. Danielson, 2002; Pandak et al., 2001)

2.3. P-glykoprotein

P-glykoprotein (také ABCB1) je jedním z nejvíce studovaných transportérů, co se lékových interakcí a rezistencí týče. Jedná se o efluxní transmembránovou pumpu, která využívá k extracelulárnímu transportu látek hydrolyzu ATP. Hraje významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv a je důležitým obranným mechanismem před vstupem xenobiotik do organismu. P-glykoprotein (P-gp) je produktem MDR1 genu, jeho nadměrná exprese a funkčnost je jednou z hlavních příčin lékové rezistence k terapii (Pechandová et al., 2006). P-glykoprotein se v přítomnosti léků exprimuje ve více klíčových orgánech, jako je tenké střevo, hematoencefalická bariéra, ledviny a játra. Jím zprostředkované lékové interakce tedy mohou nastat v různých orgánech a tkáních. Během posledních deseti let mnoho studií *in vitro* a *in vivo* uvádělo, že indukce nebo inhibice P-gp může vést k interakcím mezi dvěma léčivy. Například indukce intestinální P-glykoproteinové aktivity může způsobit sníženou biologickou dostupnost orálně podávaných léčiv a sníženou terapeutickou účinnost. Na druhé straně může inhibice střevní P-glykoproteinové aktivity vést ke zvýšené biologické dostupnosti, což vede ke zvýšenému riziku nežádoucích účinků (Glaeser, 2011).

Důležitá role lidského P-gp v lékových interakcích byla poprvé prokázána ve studii s P-glykoproteinovými substráty digoxinem a rifampicinem (Greiner et al., 1999). Tato studie uvádí, že P-gp je hlavním determinantem biologické dostupnosti podaného digoxinu a že indukce P-gp je mechanismem lékových interakcí mezi rifampicinem a digoxinem (Gault et al., 1984; Glaeser, 2011).

Dalším klinicky zjištěným a relevantním induktorem P-gp (a rovněž také CYP3A4) je třezalka. Bývá používána k léčbě mírných depresí. (Johns et al., 2002). Je důležité zmínit, že její účinek na farmakokinetiku závisí na konkrétním léčivu a relativním příspěvku CYP3A a dispozici P-gp (Dresser et al., 2002).

Spolu s klinickými studiemi zkoumajícími indukci P-gp bylo věnováno velké úsilí objasnění mechanismu indukce. Použitím buněčné linie adenokarcinomu tlustého střeva

LS180 bylo prokázáno, že některá léčiva (např. rifampin) vedla k indukci CYP3A a P-gp. Tato koindukce intestinálního P-glykoproteinu a CYP3A4 *in vitro* a *in vivo* (Greiner et al., 1999; Schuetz et al., 1996) a již publikovaná účast jaderného receptoru PXR (pregnane X receptor) na indukci genů CYP3A (Goodwin, Hodgson, & Liddle, 1999) vedla k zájmu o to, zda se PXR podílí také na indukci P-gp. Element DR4 (přímá repetice) 8 kb před genem ABCB1 byl identifikován jako PXR odpovědný element a ukázalo se, že je nezbytný pro indukci P-gp rifampinem (Geick et al., 2001).

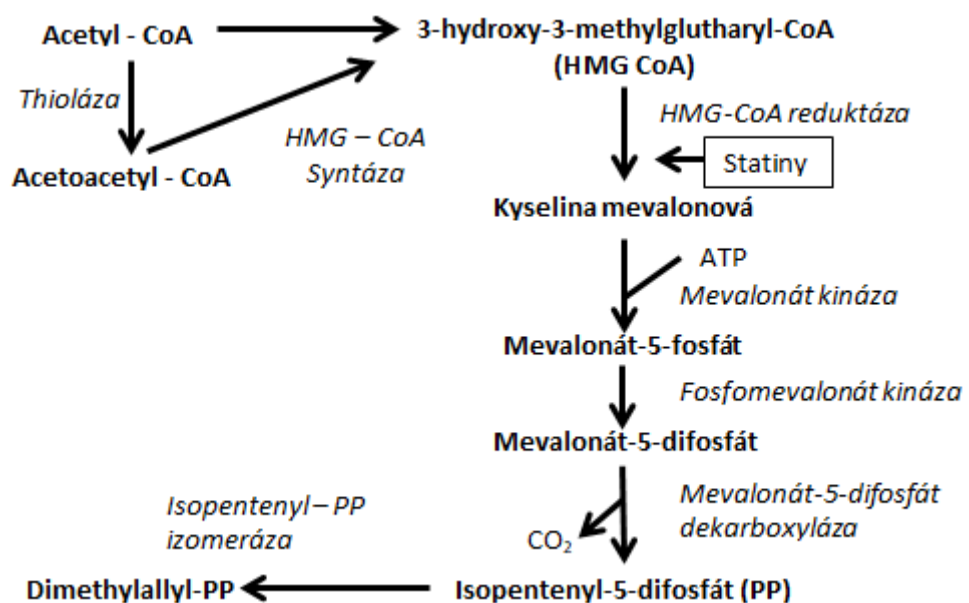
Inhibice P-gp vykazuje druhý hlavní mechanismus interakcí mezi léčivými zprostředkovanými P-gp. Pro objasnění inhibice P-gp bylo provedeno několik studií *in vitro* a *in vivo* (Glaeser, 2011). Většina P-glykoproteinem zprostředkovaných lékových interakcí způsobených inhibicí lze připsat střevnímu P-gp což bylo dokázáno ve studii lékové interakce se dvěma substráty P-glykoproteinového modelu digoxinem a talinololem (Westphal et al., 2000). Jedním z inhibitorů P-gp je R-verapamil, který se používá zejména k léčbě supraventrikulárních tachyarytmií. (Schwartz et al., 1999).

Kromě střeva hraje P-gp důležitou roli v hematoencefalické bariéře a omezuje vstup léčiv do mozku. Vyloučení molekul léčiva z mozku zprostředkované P-gp může poskytnout ochranu před vedlejšími účinky nebo může vést k selhání farmakologických a terapeutických cílů. Například agonista m-opioidního receptoru loperamid je substrátem P-gp (Schinkel et al. 1996). Loperamid se široce používá jako lék proti průjmům bez vedlejších účinků, protože vstup loperamidu do centrálního kompartmentu je omezen P-glykoproteinem (Sadeque et al., 2000).

2.4. Hydroxymethylglutharyl-CoA reduktasa

Hydroxymethylglutharyl-CoA reduktasa (HMGCR) je enzym regulující rychlost mevalonátové dráhy, která slouží k syntéze cholesterolu a dalších izoprenoidních látek. HMGCR je ukotvena v membráně endoplazmatického retikula a obsahuje osm transmembránových domén. U lidí je gen pro tento enzym umístěn na pátém chromozomu. Aktivní je při vysoké hladině glukosy v krvi. Udržování její stálé hladiny v krvi mají na starost hormony inzulín a glukagon. Mohou tedy nepřímě ovlivňovat i aktivitu HMGCR. Snížení aktivity enzymu je zapříčiněno AMP-aktivovanou protein kinasou, která reaguje na zvýšení koncentrace AMP a také na leptin (Hardie & Pan, 2002; Lindgren et al., 1985; Roitelman et al., 1992).

Biosyntéza cholesterolu začíná tzv. mevalonátovou dráhou, která se odehrává v cytoplasmě a endoplazmatickém retikulu. Výchozí látkou je zde acetyl-CoA, který je přeměněn na HMG-CoA, ze kterého se dále pomocí enzymu hydroxymethylglutharyl-CoA reductasy stává mevalonát. Toto místo je důležité z hlediska zpětnovazebné regulace syntézy cholesterolu. Na blokádě tohoto enzymu je založen také mechanismus účinku hypolipidemik ze skupiny statinů. Mevalonát je dále přeměňován na mevalonát-5-fosfát, mevalonát-5-difosfát a isopentenyl-5-difosfát který je prekurzorem pro tvorbu izoprenoidů. Z isopentenyl-5-difosfátu vzniká izomerací dimethylallyldifosfát. Obě C₅ molekuly pak kondenzují na feranyldifosfát a adicí dalšího isopentyldifosfátu vzniká farnesyldifosfát. Ten může kondenzovat na skvalen. Konečná proměna skvalenu na cholesterol nastává po oxidaci části dvojných vazeb, kdy cyklizací vzniká lanosterol, a po odštěpení tří methylových skupin vzniká cholesterol (Koolman & Röhm, 2012; Sibernagl & Despopoulos, 2004).



Obrázek 3: Biosyntéza cholesterolu – mevalonátová dráha, (převzato a upraveno z Koolman & Röhm, 2012)

2.5. Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa

Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) je enzym katalyzující šestý krok glykolýzy, kdy je glyceraldehyd-3-fosfát přeměněn 1,3-bisfosfoglycerát. V buňce se běžně vyskytuje v podobě tetrameru. Skládá se tedy ze čtyř identických 37 kDa dlouhých podjednotek, které obsahují thiolovou skupinu. Je známo, že GAPDH má i jiné uplatnění

než jen v metabolismu. Může například sám aktivovat transkripci, protože je součástí transkripčního koaktivátorového komplexu OCA-S, nebo se podílí na transportu vezikul z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu (Zheng & Roeder, 2003; Koolman & Röhm, 2012).

Protože gen GAPDH je neustále exprimován ve vysokých koncentracích ve většině tkání, je považován za tzv. housekeeping gen. Z tohoto důvodu je běžně používán v praxi jako marker rovnoměrného nanesení pro Western blot a jako kontrola pro qPCR (Barber et al., 2005).

2.6. Metabolický syndrom

Jako metabolický syndrom nazýváme soubor abnormalit, mezi které patří hypertriglyceridémie, inzulínová rezistence, hyperinzulinémie, snížené hodnoty HDL-cholesterolu a především obezita. Hypertriglyceridémie je rizikovým faktorem pro onemocnění koronárních arterií a podílí se na rozvoji aterosklerózy a hypertenze. Dříve byl tento syndrom nazýván také jako syndrom X nebo syndrom inzulínové rezistence. Historie existence metabolického syndromu má svůj počátek ve dvacátých letech minulého století (Reaven, 1997; Sarafidis & Nilsson, 2006; Zicha et al., 2006).

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). Z toho důvodu bylo navrženo několik doporučení pro definici metabolického syndromu. Studie Národního vzdělávacího programu (NCEP, 2001) navrhla následující kritéria: abdominální obezita (muži: obvod pasu ≥ 102 cm, ženy: obvod pasu ≥ 89 cm), glukosa nalačno ($\geq 6,1$ až $< 7,0$ mmol /l), krevní tlak ($\geq 130 / 80$ mm Hg), koncentrace sérových triglyceridů ($\geq 1,7$ mmol /l) a HDL-cholesterol (muži: $< 1,0$ mmol / l, ženy: $< 1,3$ mmol /l). Mezinárodní organizace pro léčbu diabetu doporučila podobnou definici (www.idf.org). Pokud jsou přítomny tři a více z těchto pěti kritérií, lze hovořit o metabolickém syndromu (Alberti & Zimmet, 2005).

Některé vzájemně propojené příznaky metabolického syndromu, jako je inzulínová rezistence, hypertriglyceridémie a hypertenze, jsou rizikové faktory rozvoje kardiovaskulárního onemocnění, proto jsou v posledních letech intenzivně studovány. Předpokládá se, že rezistence na inzulín a souběžná kompenzační hyperinzulinémie přispívají ke vzniku hypertenze. Na této patogenezi se podílejí stimulace sympatického nervového systému, podpora reabsorpce sodíku z primární moči, modulace transportu kationtů anebo stimulace hypertrofie hladkého svalstva a cév. Tyto skutečnosti byly

studovány na několika experimentálních modelech, mezi něž patří i hereditárně hypertriglyceridemický potkan (Vrana & Kazdova, 1990).

V současné době nejsou dostupné prostředky, které by dokázaly léčit metabolický syndrom jako celek. Existují pouze léčiva ovlivňující jednotlivé složky tohoto syndromu. Například hypercholesterolemie je léčena statiny, které inhibují *de novo* syntézu cholesterolu v játrech. V případě hypertriglyceridémie jsou podávány fibráty. Tyto látky stimuluji receptory, které aktivují enzymy podílející se na katabolismu triglyceridů. Dále mohou být podávány antidiabetika, kvůli inzulinové rezistenci a antihypertenziva snižující vysoký krevní tlak. Podpůrná léčba může být i rostlinného původu. V takovém případě se může jednat o extrakty z rostlin bohatých na polyfenoly. Jednou z takových bylin je ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.) (Valenzuela & Garrido, 1994) .

2.7. Atorvastatin

Atorvastatin je jedním z nejúčinnějších léčiv používaných v prevenci a léčbě kardiovaskulárních onemocnění, v jejichž patofyziologii má roli zejména ateroskleróza. Tedy například primární i sekundární prevence infarktu myokardu nebo cévní mozková příhoda zapříčiněná aterosklerózou karotických tepen. Patří do skupiny statinů, což jsou inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutharyl CoA reductasy. V léčbě kardiovaskulárních onemocnění jsou poslední desetiletí statiny nejúspěšnějšími léčivy a vzhledem k těmto léčebným úspěchům jsou přirovnávány k antibiotikům. Statiny, jakožto i celá skupina hypolipidemických léčiv mají zcela minimální výskyt vedlejších účinků (Piřha, 2006).

Statiny obecně účinkují tak, že zablokují tvorbu cholesterolu v játrech. S tím souvisí zmnožení LDL receptorů, kterými jsou z oběhu odstraňovány aterogenní LDL částice. To znamená, že dochází k odsunu lipidů z cévní stěny, a to dokonce i z nestabilních aterosklerotických plátů. I malé zmenšení plochy sklerotického plátu výrazně snižuje riziko koronárních příhod (Piřha, 2006).

Statiny snižují koncentraci aterogenního LDL-cholesterolu v průměru o 30–40 %, ale jsou známy i případy, kdy došlo ke snížení až o 60 %. Atorvastatin patří k nejpoužívanějším z této skupiny (Jones et al., 2005).

Původní obavy o nepříznivém účinku atorvastatinu na ochranný HDL-cholesterol se nepotvrdily. Atorvastatin hladinu HDL-cholesterolu buď neovlivňuje, nebo jen nepatrně zvyšuje. Nepotvrdila se ani původní tvrzení, že atorvastatin výrazně snižuje hladinu

triglyceridů, což je další rizikový faktor rozvoje kardiovaskulárního onemocnění. Jeho mírně vyšší účinnost při snižování triglyceridů souvisí s jeho celkovou vysokou účinností na široké lipidové spektrum. Triglyceridy tedy zhruba kopírují pokles koncentrace LDL-cholesterolu (Pitřha, 2006).

2.8. Silymarin

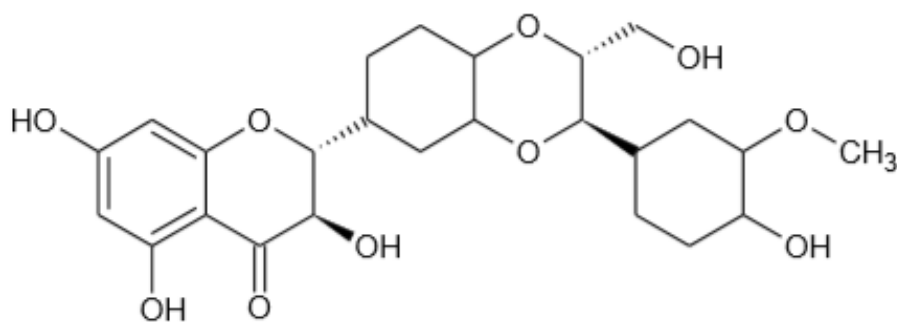
Silymarin je standardizovaný produkt pocházející ze semen rostliny *Silybum marianum* (ostropestřec mariánský). Používá se při léčbě onemocnění jater, a při otravě *Amanita phalloides* (muchomůrkou zelenou). Na základě klinických studií nebyly zjištěny žádné závažné vedlejší účinky nebo významné lékové interakce (Radjabian et al., 2010; Rainone, 2005). K léčbě byl využíván už v antickém Řecku, a to zejména při potížích s játry nebo žlučníkem. Silymarin podléhá enterohepatálnímu cyklu, což má za následek vyšší koncentrace v jaterních buňkách než v séru (Boerth & Strong, 2002). Je tvořen složkami zvanými flavonolignany, přičemž nejvíce zastoupený je silybin (až 60 %). Silybin se vyskytuje ve formě dvou stereoizomerů: A a B. Dalšími známými složkami jsou silychristin (cca 20 %), silydianin (cca 10 %) a isosilybin (cca 5 %). V menší míře jsou pak zastoupeny silymonin, isosilybin, isosilychristin (Mhamdi et al., 2016; Pepping, 1999; Radjabian & Huseini, 2010)

Řada studií naznačila, že silymarin je protizánětlivý. Reguluje zánětlivé mediátory, jako je tumor nekrotizující faktor (TNF), (Manna et al., 1999), TNF-alfa, (Zi et al., 1997) oxid dusný, interleukin-6 a antagonistu receptoru interleukin-1. Silymarin také v závislosti na dávce zvyšuje proliferaci lymfocytů a cytokinů interferon gama, interleukin-4 a interleukin-10 (Wilasrusmee et al., 2002). Dohromady tyto účinky naznačují možnou roli při prevenci nebo léčbě infekčních onemocnění. Bylo identifikováno několik mechanismů cytoprotekce (Rainone, 2005). Významné jsou rovněž jeho antioxidační, antivirové a hepatoprotektivní účinky. Lze jej využít i jako podpůrnou léčbu při transplantaci jater (Enjalbert et al., 2002; Trouillas et al., 2008).

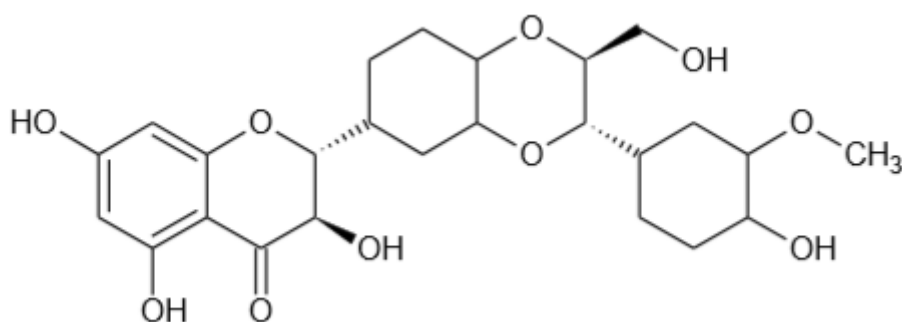
Hlavní hepatoprotektivní mechanismus silymarinu spočívá v následujících pěti vlastnostech; 1) aktivita proti oxidaci tuků, 2) schopnost regulovat membránovou permeabilitu a navýšit tak membránovou stabilitu v přítomnosti xenobiotických poškození, 3) možnost regulovat jadernou expresi, 4) inhibice transformace hvězdicových hepatocytů v myofibroblastech, které jsou zodpovědné za ukládání kolagenových vláken způsobujících cirhózu, 5) působení v jádře, kde je navyšována syntéza ribozomálních

proteinů pomocí stimulace RNA polymerasy I a transkripce rRNA. Jakožto účinné hepatoprotektivum působí silymarin proti tetrachlormethanu, ethanolu, fenylyhydrazinu, paracetamolu a řadě dalších hepatotoxických látek (Fraschini et al., 2002)

V roce 2015 byla publikována studie, podle které silymarin výrazně snižuje koncentraci sérových triglyceridů u testovaných hereditárně hypertriglyceridemických (HHTg) potkanů, zvýšilo u nich množství HDL-cholesterolu a také glykémii. Zvýšení HDL-cholesterolu se považuje za prevenci kardiovaskulárních onemocnění, protože HDL-cholesterol hraje důležitou roli při zpětném transportu cholesterolu (Barter et al., 2007). Silymarin také inhibuje metabolismus kyseliny arachidonové cestou lipooxygenasy a tím dosahuje anti-sklerotických účinků (Bialecka, 1997). U pacientů trpících diabetem mellitem II. typu výrazně zlepšuje glukosovou toleranci (Huseini et al., 2006). Soubor všech těchto účinků je zřejmým důkazem toho, že silymarin se jeví jako vhodné doplňkové léčivo některých příznaků metabolické syndromu (Poruba et al., 2015; Vecera et al., 2013).



Obrázek 4: Strukturní vzorec Silybinu A



Obrázek 5: Strukturní vzorec Silybinu B

2.9. Hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani

Tito potkani byli vyselektováni z kmene Wistar a vykazují hypertriglyceridémii, inzulinovou rezistenci, hypertenzi a steatózu jater. Každá ze zmiňovaných patologií je spojena se zhoršenou endoteliální funkcí, což se projevuje sníženou relaxací hrudní aorty. Obecně se hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani (HHTg) používají jako zvířecí model metabolického syndromu (Vecera et al., 2013; Vrána et al., 1993).

Hypertriglyceridémie je spojována také se sníženým HDL-cholesterolem a hyperinzulinémií. Rovněž je rizikovým faktorem onemocnění koronární artérie a má značný podíl na rozvoji aterosklerózy a hypertenze, která se projevuje více u samců HHTg potkanů (Zicha et al., 2006). Bylo také 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 změnám plazmatických hladin triglyceridů modifikují membránovou viskozitu a metabolismus cyklických nukleotidů v trombocytech 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. Právě díky všem těmto parametrům se HHTg potkan jeví jako vhodný model ke studiu metabolického syndromu a s ním spojených komplikací (Zicha et al., 2006).

2.10. Western blot

Jedná se o metodu používanou pro kvalitativní detekci proteinu ve vzorku. Skládá se ze tří základních kroků: elektroforetické separace, přenosu proteinů a jejich detekce.

Pro separaci proteinů se nejčastěji využívá gelová elektroforéza. Může to být SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis) nebo nativní PAGE. SDS slouží k denaturaci proteinů, po které proteiny získávají záporný náboj a putují v elektrickém poli od katody k anodě. Děleny jsou tedy na základě své velikosti. Malé proteiny cestují akrylamidovým gelem rychleji a proteiny o velké molekulové hmotnosti se pohybují směrem k anodě pomaleji. V případě nativní PAGE jsou proteiny separovány na základě svého náboje.

Separované proteiny jsou přeneseny na membránu (nitrocelulózovou nebo polyvinylovou) působením elektrického proudu. Přítomnost daného proteinu je detekována pomocí protilátky, tzv. primární, vůči tomuto proteinu. Primární protilátka se navazuje na protein a v dalším kroku je rozpoznávána sekundární protilátkou, která se naváže na tu

primární. Výsledek je poté vizualizován fluorescenčně nebo chemiluminiscenčně (Hnasko & Hnasko, 2015).

3. METODY

3.1. Biologický materiál

Celkem 32 samců hereditárně hypertriglyceridemického (HHTg) potkana (stáří 3 měsíce, hmotnost 340 – 350 g) bylo chováno v místnosti s kontrolovanou teplotou v cyklu 12:12 hodin světlo/tma a s volným přístupem ke krmivu a vodě. Laboratorní zvířata byla krmena *ad libitum* standardní dietou (STD; kontrolní skupina), STD obohacenou o mikronizovaný silymarin (300 mg/kg/den), STD obohacenou atorvastatin (5 mg/kg/den), nebo STD obsahující kombinaci mikronizovaného silymarinu a atorvastatinu (stejně dávky jako v předešlých dietách). Po čtyřech týdnech byla zvířata dekapitována, exsanguinována a z každého jedince byla odebrána jaterní tkáň, která byla uskladněna 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

Atorvastatin (Pfizer, ČR)

Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, ČR)

Dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, ČR)

Fenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich, ČR)

Glycerol (Merck, Německo)

Inhibitory proteas cOmplete (Roche, Švýcarsko)

Kyselina chlorovodíková (Lachner, ČR)

2-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, ČR)

Molekulární marker Dual Xtra Standards (BIO-RAD, USA)

Molekulární marker Kaleidoscope™ (BIO-RAD, USA)

Orthovanadát sodný (Sigma-Aldrich, ČR)

Silymarin mikronizovaný (Favea, ČR)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, ČR)

3.3. Použité roztoky

Fosfátový pufr: 100mM (BIO-RAD, USA)

Homogenizační pufr: na 1 ml pufru 10 µl PMSF, 10 µl Na₃VO₄

RIPA pufr (Santa Cruz, USA),

Run pufr (BIO-RAD, USA)

TBS pufr (BIO-RAD, USA)

TBS-Tween pufr (BIO-RAD, USA)

TBS-Tween Milk: 6,25 ml mléka do 100 ml TBS-TWEEN

Up pufr: Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

Vzorkový pufr: 1316 µl Up pufru, 2,1 ml 10% SDS, 3,09 ml 85% glycerolu, 1 mg bromfenolové modři, doplnit destilovanou vodu na 10 ml

Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz, USA)

3.4. Použité protilátky

Primární:

anti-ABCB1 králičí monoklonální (Cell Signal, USA)

anti-CYP1A2 mouse monoclonal (Santa Cruz, USA)

anti-CYP3A rabbit monoclonal (Santa Cruz, USA)

anti-CYP7A1 mouse monoclonal (Sigma-Aldrich, ČR)

anti-GAPDH mouse monoclonal (Santa Cruz, USA)

anti-HMGCS rabbit monoclonal (Cell Signal, USA)

Sekundární:

goat anti mouse (Santa Cruz, USA)

goat anti rabbit (Santa Cruz, USA)

3.5. Použité přístroje a zařízení

Analytická váha, Xp 205 DELTA RANGE® (Mettler-Toledo, ČR)

Analytický a dokumentační systém G:BOX Chemi XX6/XX9 (Syngene, VB)

Centrifuga Centrifuge 5804R (Eppendorf, Německo)

Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf, Německo)

Elektroforéza Power PACTM HC (BIO-RAD, USA)

Homogenizátor Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA)

Inkubátor DRY BATH INCUBATOR (Major Science, USA)

Míchačka Sunflower mini shaker (P-LAB a.s., ČR)

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

Spektrofotometr NanoPhotometr® N60 (Implen, Německo)

Trans-blot® turboTM (BIO-RAD, USA)

Vortex IKA® MS3 Basic (MERCİ s.r.o., ČR)

3.6. Stanovení lipidových parametrů

Lipidy byly standardně stanovovány pomocí enzymatických metod dle pokynů výrobce Bio-La-Test (Erba Lachema, ČR).

3.7. Homogenizace jaterní tkáně

Z 32 vzorků jaterní tkáně byly odebrány kousky o hmotnosti zhruba půl gramu, které byly vloženy do homogenizačních zkumavek Precellys. Do každé zkumavky bylo přidáno 500 µl připraveného homogenizačního pufru. Poté byly zkumavky vloženy do homogenizátoru na 2x 15 s při 7200 ot./min. Po vyjmutí z homogenizátoru byly zkumavky na 30 min uloženy na ledu za stálého míchání. Následně byly stočeny (5005 g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl odebrán do plastových mikrozkušavek. Poté byl naředěn hovězí sérový albumin pro přípravu kalibrační přímky. Supernatant z připravených vzorků byl naředěn 200x. Do každé jamky v 96 jamkové destičce bylo přidáno 12,5 µl vzorku a 100 µl směsi činidel BCATM Protein Assay Reagent. Destička byla inkubována 30 min při teplotě 37 °C. Po uplynutí doby inkubace byla změřena absorbance vzorků na destičce.

3.8. Příprava vzorků na elektroforézu

Supernatant bylo nutné pro účely elektroforézy naředit. Vyžadovaná koncentrace vzorků byla stanovena na 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a výsledky objem na 200 μl .

Tabulka 1: Původní koncentrace proteinu ve vzorcích před zředěním

Číslo vzorku	Koncentrace proteinu [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Číslo vzorku	Koncentrace proteinu [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Číslo vzorku	Koncentrace proteinu [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Číslo vzorku	Koncentrace proteinu [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
1	35,1	9	51,5	17	51,3	25	53,7
2	43,2	10	61,7	18	56,2	26	55,4
3	43,7	11	71,7	18	58,9	27	59,6
4	31,4	12	52,9	20	51,9	28	78,5
5	58,2	13	40,8	21	57,5	29	78,3
6	43,5	14	70,3	22	57,6	30	51,7
7	51,3	15	61,1	23	32,9	31	68,7
8	55,4	16	67,2	24	61,9	32	59,2

Tabulka 2: Objem fosfátové pufru nutného k naředění vzorků na stanovenou koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Číslo vzorku	Pufr [μl]	Číslo vzorku	Pufr [μl]	Číslo vzorku	Pufr [μl]	Číslo vzorku	Pufr [μl]
1	94,3	9	96,1	17	96,1	25	96,3
2	95,4	10	96,7	18	96,4	26	96,4
3	95,4	11	97,2	18	96,6	27	96,6
4	93,6	12	96,2	20	96,1	28	97,5
5	96,6	13	95,1	21	96,5	29	97,4
6	95,4	14	97,2	22	96,5	30	96,1
7	96,1	15	96,7	23	93,9	31	97,1
8	96,4	16	97,0	24	96,8	32	96,6

Tabulka 3: Množství nanášeného proteinu k naředění vzorků na stanovenou koncentraci 1 µg/µl

Číslo vzorku	Množství proteinu [µl]	Číslo vzorku	Množství proteinu [µl]	Číslo vzorku	Množství proteinu [µl]	Číslo vzorku	Množství proteinu [µl]
1	5,7	9	3,9	17	3,9	25	3,7
2	4,6	10	3,3	18	3,6	26	3,6
3	4,6	11	2,8	18	3,4	27	3,4
4	6,4	12	3,8	20	3,9	28	2,5
5	3,4	13	4,9	21	3,5	29	2,6
6	4,6	14	2,8	22	3,5	30	3,9
7	3,9	15	3,3	23	6,1	31	2,9
8	3,6	16	3,0	24	3,2	32	3,4

Poté bylo do každé mikrozkušavky přidáno 90 µl vzorkového pufru a 10 µl merkptoethanolu. Takto připravené vzorky byly zmrazeny a připraveny pro elektroforézu.

3.9. Elektroforéza a Western blot

Rozmražené vzorky byly denaturovány 5 min ve vodě o teplotě 70 °C a poté stočeny 5 min při 2917 g. Takto připravené vzorky byly nanášeny na gely (Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels) společně s markery molekulové hmotnosti. Elektroforéza byla spuštěna a nastavena na 120 V a po 10 minutách přenastavena na 150 V. Po rozdělení proteinů byly gely vyjmuty a vloženy do blotovací soupravy (Trans-Blot Turbo Trasfer Systém Transfer Pack). Přístroj byl nastaven na 3 min, 25 V a 2,5 A. Membrána, na kterou se proteiny přenesly, byla promyta v TBS pufru (4× 10 min) a poté v TBS-Tween pufru s mlékem (60 min). Po uplynutí této doby byla membrána znovu promývána v TBS-Tween pufru (3×5 min). Následovalo nanesení primárních protilátek, které působily přes noc. Druhý den byla membrána promyta v TBS-Tween pufru (3× 5 min) a následně na ni byly naneseny sekundární protilátky. Po 30 minutách inkubace byla membrána znovu promyta v TBS-Tween pufru (4× 10 min). K vizualizaci výsledků byla použita chemiluminiscenční činidla firmy Santa Cruz.

3.10. Zpracování výsledků

Kvantifikace proteinů u jednotlivých vzorků byla zachycena a vyhodnocena pomocí analytického a dokumentačního systému G:BOX Chemi XX6/XX9. Získaná data byla vztažena k markeru rovnoměrného nanesení, což byla v tomto případě glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH). Následovalo statistické zpracování.

3.11. Statistické zpracování

Pro statistickou analýzu byl volen ANOVA parametrický test. Pro následné porovnání významností mezi jednotlivými skupinami byl volen post hoc Bonferonniho test. Hodnoty byly brány jako statisticky významné při hodnotě $p < 0,05$.

4. VÝSLEDKY

4.1. Hmotnost potkanů před dekapitací

Potkani byli chováni za standardních podmínek ve zvěřinci pracoviště oddělení metabolismu diabetu IKEM v Praze. U zvířat byla denně zaznamenávána spotřeba krmiva a také jejich hmotnost. Spotřeba krmiva během 4 týdnů podávání experimentální diety se v rámci jednotlivých skupin nelišila. To samé platí i pro hmotnost jednotlivých zvířat v den dekapitace. Průměrná hmotnost kontrolní skupiny a skupiny experimentální je uvedena v tabulce č. 4.

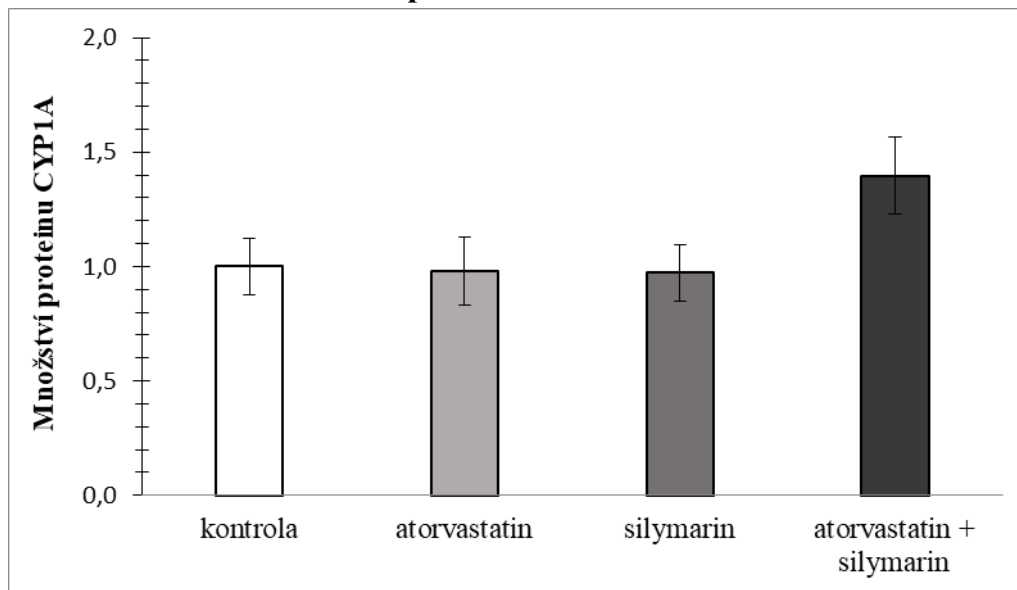
4.2. Plasmatické lipidy

Tabulka 4: Koncentrace plasmatických lipidů u HHTg potkanů změřena po exanguinaci a průměrná hmotnost HHTg potkanů v den dekapitace. TG – triacylglyceroly; HDL – HDL-cholesterol; NEMK – nenasycené mastné kyseliny. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), atorvastatin (STD + atorvastatin), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin a atorvastatin + silymarin (STD + atorvastatin + mikronizovaný silymarin). Data jsou uvedena jako průměr ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01

	kontrola	atorvastatin	silymarin	atorvastatin +silymarin
Hmotnost [g]	408,6 ± 19,3	419,9 ± 19,4	420,5 ± 23,8	416,1 ± 22,0
TG [mmol/l]	4,6 ± 0,9	2,0 ± 0,5 **	1,9 ± 0,5 **	1,8 ± 0,5 **
Cholesterol [mmol/l]	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1
HDL [mmol/l]	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1 *	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2
NEMK [mmol/l]	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1

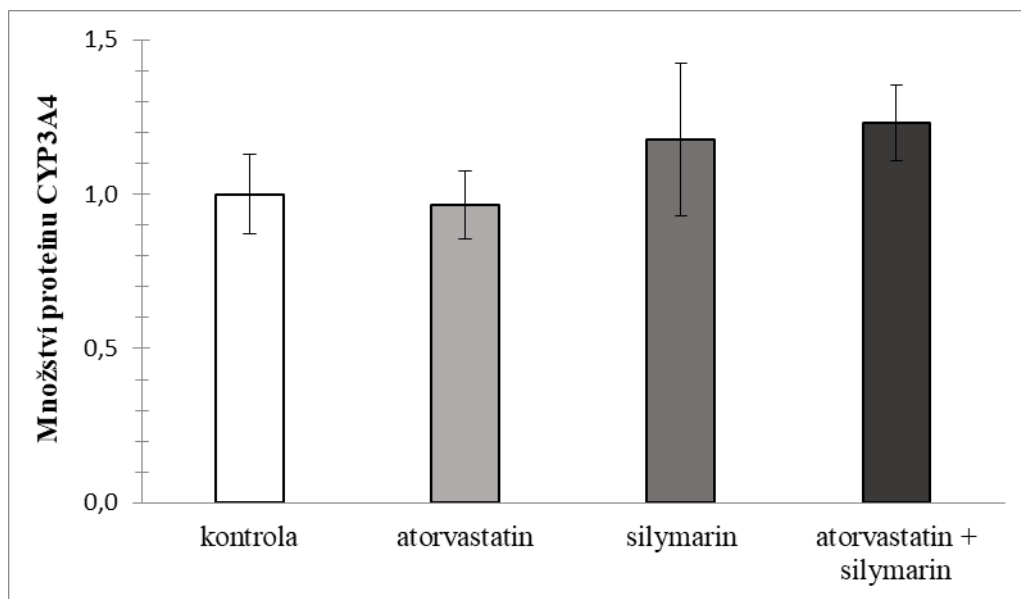
Tabulka č. 4 uvádí koncentrace plasmatických lipidů, které byly u potkanů změřeny po exsanguinaci. Hodnota sérových triacylglycerolů byla snížena o 56 % procent u zvířat, která dostávala standardní laboratorní dietu (STD) obohacenou o atorvastatin. Ve skupině, které byl podáván silymarin došlo ke snížení triacylglycerolů o 60 % a po podání atorvastatinu společně se silymarinem se snížila koncentrace triacylglycerolů o 61 %. Všechny změny byly statisticky významné (p < 0,01). V případě celkového cholesterolu nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny. Naopak HDL-cholesterol byl u všech experimentálních skupin potkanů zvýšen. V případě samotného atorvastatinu bylo zvýšení statisticky významné (p < 0,05). V případě nenasycených mastných kyselin nebyl pozorován významný vliv podávané diety na jejich koncentraci.

4.3. Stanovené množství proteinů



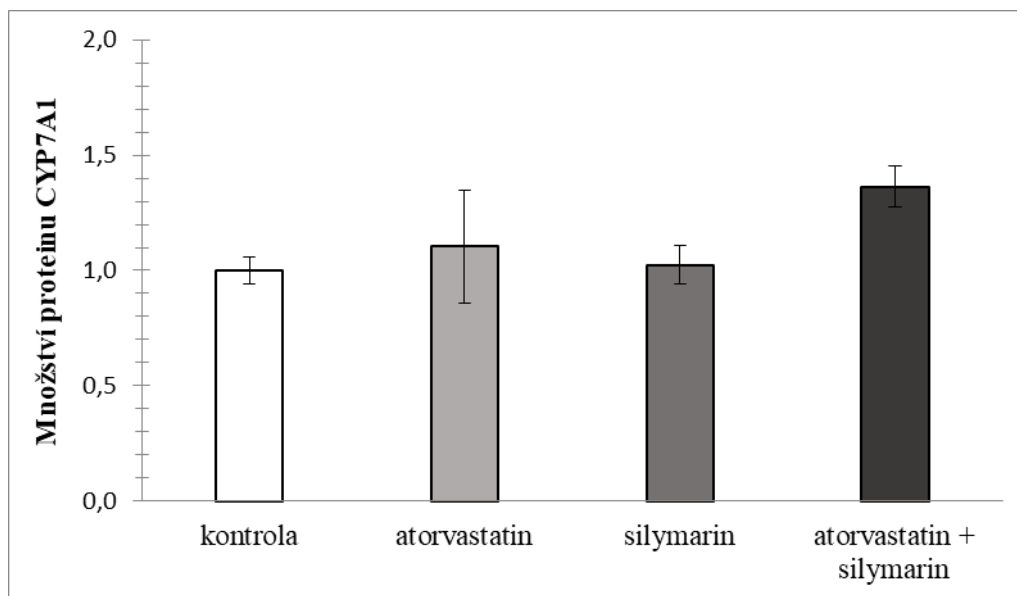
Graf 1: Množství proteinu CYP1A v jaterní tkáni HHTg potkana po čtyřech týdnech diety. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), atorvastatin (STD + atorvastatin), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin) a atorvastatin + silymarin (STD + atorvastatin + mikronizovaný silymarin). Data jsou uvedena jako průměr ± SEM; n = 8.

Z grafu č. 1 je patrné, že nedošlo k žádným významným změnám v množství proteinu CYP1A mezi jednotlivými skupinami HHTg potkanů. Došlo pouze k mírnému nárůstu proteinů v případě skupiny, které byla podávána kombinace atorvastatinu a silymarinu. Jak již bylo zmíněno, tato změna není statisticky významná. První skupina představuje kontrolu, které byla podávána standardní laboratorní dieta (STD), druhé skupině byl navíc podáván atorvastatin, třetí skupina měla STD obohacenou o silymarin a poslední, čtvrtá skupina dostávala, kromě STD také atorvastatin a silymarin.



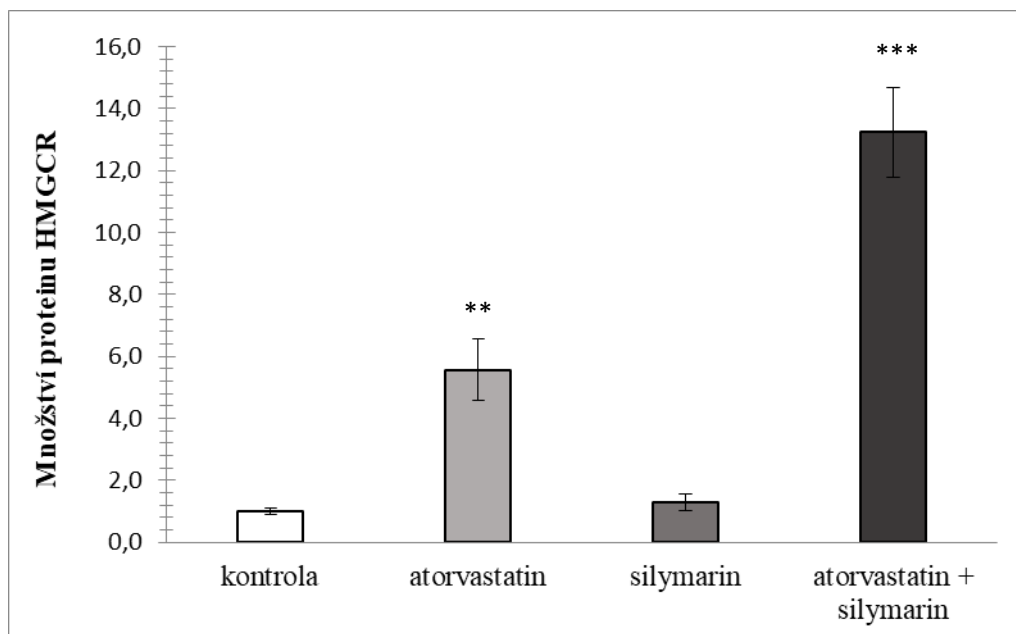
Graf 2: Množství proteinu CYP3A4 v jaterní tkáni HHTg potkana po čtyřech týdnech diety. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), atorvastatin (STD + atorvastatin), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin a atorvastatin + silymarin (STD + atorvastatin + mikronizovaný silymarin)). Data jsou uvedena jako průměr ± SEM; n = 8.

Na základě grafu č. 2 lze říci, že došlo k mírným změnám v množství proteinu CYP3A4 u jednotlivých experimentálních skupin potkanů. K nárůstu došlo u skupin, kterým byl podáván silymarin a kombinace silymarinu s atorvastatinem. K minimálnímu poklesu došlo u skupiny, která měla dietu obohacenou o atorvastatin. Tyto změny jsou však příliš malé, než aby mohly být statisticky významné. První skupina, která představuje kontrolu, dostávala standardní laboratorní dietu (STD), druhá skupina navíc dostávala k STD ještě atorvastatin, třetí skupina měla STD obohacenou o silymarin a čtvrté skupině bylo, kromě STD podáváná kombinace atorvastatinu a silymarinu.



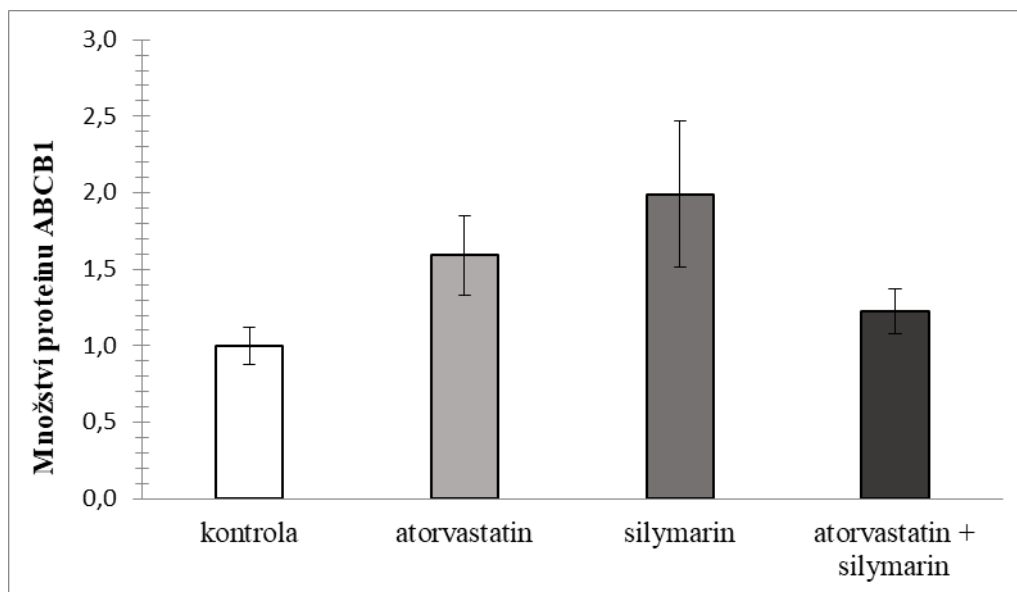
Graf 3: Množství proteinu CYP7A1 v jaterní tkáni HHTg potkana po čtyřech týdnech diety. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), atorvastatin (STD + atorvastatin), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin a atorvastatin + silymarin (STD + atorvastatin + mikronizovaný silymarin). Data jsou uvedena jako průměr ± SEM; n = 8.

Z grafu č. 3 je patrné, že nedošlo k žádným signifikantním rozdílům v množství proteinu CYP7A1 mezi jednotlivými skupinami. Došlo pouze k mírnému nárůstu u skupin, kterým byl podáván atorvastatin, ať již samostatně nebo v kombinaci se silymarinem. První skupina představující kontrolu, byla krmena standardní laboratorní dietou (STD), druhé skupině byl navíc podáván atorvastatin, třetí silymarin a poslední skupině byla podávána kombinace atorvastatinu a silymarinu.



Graf 4: Množství proteinu HMGCR v jaterní tkáni HHTg potkana po čtyřech týdnech diety. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), atorvastatin (STD + atorvastatin), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin a atorvastatin + silymarin (STD + atorvastatin + mikronizovaný silymarin). Data jsou uvedena jako průměr ± SEM; n = 8. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. kontrola.

Na první pohled je viditelné, že v grafu č. 4 došlo k výraznému vzestupu proteinu HMGCR u skupin, kterým byl podáván atorvastatin a kombinace atorvastatinu a silymarinu. Tyto rozdíly byly vyhodnoceny jako statisticky významné; pro skupinu s podáváním atorvastatinem $p < 0,01$ a pro skupinu s kombinací atorvastatinu a silymarinu $p < 0,001$. Skupina, které byl podáván pouze silymarin se od kontroly nijak významně nelišila.



Graf 5: Množství proteinu ABCB1 v jaterní tkáni HHTg potkana po čtyřech týdnech diety. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), atorvastatin (STD + atorvastatin), Silymarin (STD + mikronizovaný silymarin a atorvastatin + silymarin (STD + atorvastatin + mikronizovaný silymarin). Data jsou uvedena jako průměr ± SEM; n = 8.

Z grafu č. 5 je patrné, že v případě P-glykoproteinu (ABCB1) došlo k navýšení proteinu u všech experimentálních skupin. Tyto rozdíly, ať už vyšší nebo nižší, však nejsou statisticky významné. První skupina představuje kontrolu, které byla podávána standardní laboratorní dieta (STD), druhé skupině byl navíc podáván atorvastatin, třetí skupina měla STD obohacenou o silymarin a poslední, čtvrtá skupina dostávala, kromě STD také atorvastatin a silymarin.

5. DISKUZE

Atorvastatin je v současné době jedním z nejpoužívanějších léků pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění, které mají patofyziologický základ v ateroskleróze. Pacienti trpící aterosklerózou a následnými kardiovaskulárními chorobami jsou obvykle polymorbidní a polypragmázie u nich není neobvyklá. S počtem užívaných léčiv roste jak riziko nežádoucích účinků, tak také riziko lékových interakcí. Vzhledem k této skutečnosti vyvstávají otázky ohledně možných lékových interakcí atorvastatinu a silymarinu. V rámci této studie byl sledován vliv silymarinu na hypolipidemický účinek atorvastatinu a také vliv obou látek samostatně i v kombinaci na množství proteinu vybraných enzymů a transportéru, které metabolizují běžně užívaná léčiva a enzymy důležité pro metabolismus a syntézu cholesterolu.

V této práci jsem se tedy konkrétně zabývala vlivem atorvastatinu a silymarinu na množství proteinu vybraných enzymů a transportéru. U obou těchto látek byl touto i předchozími studii potvrzen příznivý účinek na některé komponenty metabolického syndromu. V rámci práce silymarin i atorvastatin významně snížili koncentraci triacylglycerolů a zvýšili HDL-cholesterol. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými studii. Je známo, že silymarin napomáhá při léčbě hypercholesterolemie, navíc byl popsán jeho vliv na zvýšení hladiny HDL-cholesterolu, který se uplatňuje při reverzním transportu cholesterolu (Barter et al., 2007). Navíc během klinických studií u pacientů a experimentálních studií na animálních modelech silymarin ukázal svou efektivitu v ovlivnění glykémie, významné složky metabolického syndromu (Huseini et al., 2006). V práci byla použita mikronizovaná forma silymarinu. Výběr vychází z dříve publikovaných dat, v nichž silymarin v lékových formách s vyšší biologickou dostupností vykazoval více vyjádřené účinky. Konkrétně byl porovnáván standardizovaný extrakt, mikronizovaný extrakt a silymarin ve formě fytosomů. Mikronizovaný a poslední zmiňovaný extrakt způsobily výraznější účinky než extrakt standardizovaný (Poruba et al., 2015). Atorvastatin, jako klinicky užívané léčivo má spoustu dat prokazujících jeho účinnost i bezpečnost. Jsou známy i jeho interakce, ale nejsou známy účinky kombinace atorvastatinu se silymarinem. Tato práce navazuje na dříve provedené studie kombinace hypolipidemik se silymarinem. V případě podávání fenofibrátu samotného nebo v kombinaci se silymarinem došlo k významným změnám sledovaných proteinů (Poruba et al., 2019). Hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani byli zvoleni pro mou práci, jelikož

představují akceptovaný zvířecí model metabolického syndromu (Zicha et al., 2006). Pro studii bylo vybráno celkem 32 samců potkana, 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 obohacenou o atorvastatin a poslední skupině byla spolu s STD podávána kombinace atorvastatinu a mikronizovaného silymarinu. Takto nastavenou dietou byli potkani krmeni čtyři týdny.

Výsledky této práce byly následující; u CYP1A1, CYP3A4 a CYP7A1 nedošlo k žádným výrazným změnám v množství proteinu mezi jednotlivými skupinami potkanů a kontrolou. Podobně tomu bylo i v případě transportéru ABCB1 (P-glykoproteinu). Rovněž zde nedošlo ke statisticky významným rozdílům mezi jednotlivými experimentálními skupinami. V případě HMGCR došlo k nárůstu proteinu u skupiny potkanů, které byl podáván atorvastatin a u skupiny, která dostávala atorvastatin v kombinaci se silymarinem. Mechanismem účinku statinů je kompetitivní inhibice HMGCR. Kompetitivní inhibice nic nevyovídá o ovlivnění množství inhibovaného proteinu, a dokonce v případě kompetitivně inhibovaného proteinu, může docházet i ke zvýšení jeho exprese v tkáni. K tomuto jevu dochází vlivem autoregulačních mechanismů. Zvýšené množství proteinu nic nevyovídá o jeho skutečné aktivitě a funkci (Schonewille et al., 2016). V rámci práce byly stanovovány také plasmatické lipidy. Nebyly sice zaznamenány žádné změny v koncentraci celkového cholesterolu, ale došlo zejména ke statisticky významnému vzestupu HDL-cholesterolu. U zvířat, kterým byl podáván silymarin nedošlo k žádným výraznějším změnám oproti kontrole, co se množství cholesterolu týče.

Dosažené výsledky lze vnímat v celku pozitivně. Pokud by došlo ke snížení množství proteinů u CYP3A4 nebo CYP1A2, mohlo by v případě současného podání jejich substrátů dojít k ovlivnění jejich metabolismu. V případě, že je léčivo metabolizováno na neúčinné metabolity, může docházet ke zpomalení metabolismu mateřské látky včetně její kumulace. Dochází k vyšším expozicím léčiva se všemi známými důsledky, tedy zejména nežádoucími reakcemi. Jiná situace by nastala v případě aktivační reakce. V tomto případě cytochromy P450 aktivují neaktivní proléčiva na aktivní látky. Snížení množství enzymu by mohlo vést i k selhání farmakoterapie. Oba tyto cytochromy P450 totiž odpovídají za metabolismus nemalého množství xenobiotik. Podobné důsledky má také vliv látek na P-glykoprotein, jehož inhibice může vést ke změnám absorpce, distribuce a exkrece léčiv. Jsou známy látky, které mohou zvyšovat

propustnost hematoencefalické bariéry pro látky běžně neprostupující, např. loperamid. CYP7A1 má významnou úlohu v metabolismu cholesterolu a zejména v jeho eliminaci. Získané výsledky ukazují, že ani jedna ze studovaných látek neovlivňuje expresi sledovaných proteinů. Můžeme tedy tvrdit, že látky mají nízký potenciál ovlivnit metabolismus jiných látek. Samozřejmě pouze na úrovni ovlivnění exprese. Studie na kompetitivní typ inhibice a stanovení aktivity sledovaných enzymů nebyly v rámci práce studovány.

Nutné je však také zmínit, že výsledky získané z této studie, kde byli použiti HHTg potkani, nemusí zcela odpovídat výsledkům, 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 v lidské populaci vysoce variabilní. Existuje více než 20 variant alel pro tento gen, které jsou spojeny buď s vyšší, nebo nižší rychlostí katalytické aktivity. U potkanů je také známo více forem tohoto enzymu, než u lidí, což sebou nese i rozdíly v metabolismu léčiv.

Z výsledků tedy vyplývá, že v léčbě metabolického syndromu se atorvastatin i silymarin jeví jako vhodná kombinace. Kombinace látek příznivě ovlivnila koncentraci triacylglycerolů i HDL-cholesterolu. Látky minimálně ovlivňují množství sledovaných enzymů a je zde tedy předpoklad, že existuje malé riziko v ovlivnění metabolismu substrátů sledovaných enzymů. Nicméně je potřeba další rozsáhlejší výzkum v této oblasti, aby se vhodnost těchto látek potvrdila na více úrovních včetně aktivity při léčbě metabolického syndromu a případně i dalších onemocněních.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit množství proteinů pro enzymy: CYP1A, CYP3A, CYP7A1 a HMGCR a transportér ABCB1 v jaterní tkáni HHTg potkanů, kterým byla po dobu čtyř týdnů podávána standardní laboratorní dieta (v případě kontrolní skupiny), dále atorvastatin, silymarin anebo kombinace obou látek. Množství proteinů bylo kvalitativně stanoveno pomocí elektroforézy a metody Western blot. Ohledně problematiky tohoto tématu byla vypracována literární rešerše. Získaná data byla statisticky zpracována a výsledky byly porovnány s literaturou.

Z výsledků bylo zjištěno, že v případě CYP1A, CYP3A, CYP7A1 a ABCB1 nedošlo k žádným statisticky významným změnám v množství proteinu u jednotlivých skupin potkanů. Toto zjištění se jeví jako pozitivní vzhledem k tomu, že změny v množství proteinu mohou vést k riziku lékových interakcí. V případě HMGCR došlo k výraznému nárůstu množství proteinu u skupiny potkanů na dietě obohacené o atorvastatin a u skupiny, které byla podávána kombinace atorvastatinu a silymarinu. Tato změna je pravděpodobně způsobena regulačními mechanismy zapříčiněnými kompetitivním typem inhibice HMGCR atorvastatinem. Na základě této práce vycházejí studované přípravky atorvastatin a silymarin jako málo rizikové z hlediska možných lékových interakcí na úrovni ovlivnění proteinu.

7. SEZNAM LITERATURY

- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome - A new worldwide definition. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67402-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67402-8)
- Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(5–6), 737–747. <https://doi.org/10.1007/PL00000897>
- Anzenbacher, Pavel, Dawson, J. H., & Kitagawa, T. (1989). Towards a unified concept of oxygen activation by heme enzymes: the role of the proximal ligand. *Journal of Molecular Structure*. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(89\)80011-0](https://doi.org/10.1016/0022-2860(89)80011-0)
- Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics*. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>
- Barter, P. J., Puranik, R., & Rye, K. A. (2007). New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease. *Current Cardiology Reports*. <https://doi.org/10.1007/BF02938394>
- Bialecka, M. (1997). [The effect of bioflavonoids and lecithin on the course of experimental atherosclerosis in rabbits]. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, 43, 41–56.
- Boerth, J., & Strong, K. M. (2002). The clinical utility of milk thistle (*Silybum marianum*) in cirrhosis of the liver. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. https://doi.org/10.1300/J157v02n02_02
- Bolbrinker, J., Seeberg, S., Schostak, M., Kempkensteffen, C., Baelde, H., De Heer, E., & Kreutz, R. (2012). CYP3A5 genotype-phenotype analysis in the human kidney reveals a strong site-specific expression of CYP3A5 in the proximal tubule in carriers of the CYP3A5*1 allele. *Drug Metabolism and Disposition*. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042648>
- Citius, A., & Piřha, M. J. (2006). *FARMAKOLOGICKÝ PROFIL*. 545–547.
- Corrigan, B. W., Nicholls, B., Thakrar, B., Lam, R., Grosse, C., Alianti, J., & Palmer, J. L. (1999). Heterogeneity in systemic availability of ondansetron and granisetron following oral administration. *Drug Metabolism and Disposition*.
- Cresteil, T. (1998). Onset of xenobiotic metabolism in children: Toxicological implications. *Food Additives and Contaminants*. <https://doi.org/10.1080/02652039809374614>
- Daly, A. K. (2006). Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.2165/00003088-200645010-00002>
- de Montellano, P. R. O. (2015). Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry, fourth edition. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12108-6>

- 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>
- Ding, X., & Kaminsky, L. S. (2003). HUMAN EXTRAHEPATIC CYTOCHROMES P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140251>
- Dresser, G. K., Bailey, D. G., Leake, B. F., Schwarz, U. I., Dawson, P. A., Freeman, D. J., & Kim, R. B. (2002). Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.121152>
- Eggertsen, G., Olin, M., Andersson, U., Ishida, H., Kubota, S., Hellman, U., ... Björkhem, I. (1996). Molecular cloning and expression of rabbit sterol 12 α -hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(50), 32269–32275. Retrieved from <https://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>
- 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>
- Fraschini, F., Demartini, G., & Esposti, D. (2002). Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation*. <https://doi.org/10.2165/00044011-200222010-00007>
- Gault, M. H., Longerich, L. L., Loo, J. C. K., Ko, P. T. H., Fine, A., Vasdev, S. C., & Dawe, M. A. (1984). Digoxin biotransformation. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1038/clpt.1984.11>
- Geick, A., Eichelbaum, M., & Burk, O. (2001). Nuclear Receptor Response Elements Mediate Induction of Intestinal MDR1 by Rifampin. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010173200>
- Glaeser, H. (2011). Importance of P-glycoprotein for drug-drug interactions. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *201*, 285–297. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_7
- Goodwin, B., Hodgson, E., & Liddle, C. (1999). The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.56.6.1329>
- Greiner, B., Eichelbaum, M., Fritz, P., Kreichgauer, H. P., Von Richter, O., Zundler, J., & Kroemer, H. K. (1999). The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI6663>

- Gu, L., Gonzalez, F. J., Kalow, W., & Tang, B. K. (1992). Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics*. <https://doi.org/10.1097/00008571-199204000-00004>
- Guengerich, F. P. (1997). Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 106, pp. 161–182. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00068-9)
- Hardie, D. G., & Pan, D. A. (2002). Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST0301064>
- Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. (2015). The western blot. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_9
- 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), 1036–1039. <https://doi.org/10.1002/ptr.1988>
- Hustert, E., Haberl, M., Burk, O., Wolbold, R., He, Y. Q., Klein, K., ... Wojnowski, L. (2001). The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. <https://doi.org/10.1097/00008571-200112000-00005>
- Johne A. (2002). Decreased plasma levels of amitriptyline and its metabolites on comedication with an extract from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Clinical Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1097/00004714-200202000-00008>
- Jones, P. H., McKenney, J. M., Karalis, D. G., & Downey, J. (2005). Comparison of the efficacy and safety of atorvastatin initiated at different starting doses in patients with dyslipidemia. *American Heart Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2004.07.025>
- Koolman, J. a Röhm K.-H. (2012). *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- 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), 269–277. <https://doi.org/10.1042/CS20010214>
- Leclerc, J., Tournel, G., Courcot-Ngoubo Ngangue, E., Pottier, N., Lafitte, J. J., Jaillard, S., ... Lo-Guidice, J. M. (2010). Profiling gene expression of whole cytochrome P450 superfamily in human bronchial and peripheral lung tissues: Differential expression in non-small cell lung cancers. *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.12.007>
- Lin, Y. S., Dowling, A. L. S., Quigley, S. D., Farin, F. M., Zhang, J., Lamba, J., ... Thummel, K. E. (2002). Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.62.1.162>

- Lindgren, V., Luskey, K. L., Russell, D. W., & Francke, U. (1985). Human genes involved in cholesterol metabolism: Chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8567>
- 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*, Vol. 279, pp. 1516–1533. <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)
- MacLeod, S., Sinha, R., Kadlubar, F. F., & Lang, N. P. (1997). Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 influence the in vivo function of CYP1A2. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00036-5)
- Manna, S. K., Mukhopadhyay, A., Van, N. T., & Aggarwal, B. B. (1999). Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Mansuy, D., & Renaud, J.-P. (1995). Heme-Thiolate Proteins Different from Cytochromes P450 Catalyzing Monooxygenations. In *Cytochrome P450*. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2391-5_15
- Matušková, Z., Poruba, M., & Anzenbacher, P. (2014). Cytochromy P450: Role v metabolismu 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), 259–267. <https://doi.org/10.1136/gut.36.2.259>
- Mhamdi, B., Abbassi, F., Smaoui, A., Abdelly, C., & Marzouk, B. (2016). Fatty acids, essential oil and phenolics composition of Silybum marianum seeds and their antioxidant activities. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- NCEP. (2001). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on. 01-3670. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
- Nebert, D. W., & Nelson, D. R. (1991). P450 Gene Nomenclature Based on Evolution. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)06072-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)06072-B)
- 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. (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1352>

- Nelson, D. R. (2006). Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. <https://doi.org/10.1385/1-59259-998-2:1>
- 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*, Vol. 6, pp. 1–42. <https://doi.org/10.1097/00008571-199602000-00002>
- Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., ... Terasaki, T. (2012). Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: Comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metabolism and Disposition*. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042259>
- 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>
- Pandak, W. M., Schwarz, C., Hylemon, P. B., Mallonee, D., Valerie, K., Heuman, D. M., ... Vlahcevic, Z. R. (2001). Effects of CYP7A1 overexpression on cholesterol and bile acid homeostasis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.4.g878>
- Pechandová, K., Buzková, H., Slanař, O., & Perlík, F. (2006). Efluxní transmembránový transportér - P-glykoprotein. *Klinická Biochemie a Metabolismus*.
- Pepping, J. (1999). Milk thistle: Silybum marianum. *American Journal of Health-System Pharmacy*. <https://doi.org/10.1093/ajhp/56.12.1195>
- Poruba, M., Matuskova, Z., Kazdova, L., Oliyarnyk, O., Malansky, H., Tozzi di Angelo, I., & Vecera, R. (2015). Positive effects of different drug forms of silybin in the treatment of metabolic syndrome. *Physiological Research*, 64, S507–S512.
- Poruba, Martin, 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*, 45(9), 751–756. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1010633>
- Poruba, Martin, Matuskova, Z., Hüttl, M., Malinska, H., Oliyarnyk, O., Markova, I., ... Vecera, R. (2019). Fenofibrate decreases hepatic P-glycoprotein in a rat model of hereditary hypertriglyceridemia. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00056>
- 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.
- Rainone, F. (2005). *Milk Thistle - American Family Physician*. 72(7), 1285–1288. Retrieved from <http://www.aafp.org/afpsort.xml>.

- Raunio, H., Hakkola, J., & Pelkonen, O. (2005). Regulation of CYP3A genes in the human respiratory tract. *Chemico-Biological Interactions*.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2003.12.007>
- Reaven, G. M. (1997). Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*.
<https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>
- Roitelman, J., Olender, E. H., Bar-Nun, S., Dunn, W. A., & Simoni, R. D. (1992). Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: Implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.5.959>
- Sadeque, A. J. M., Wandel, C., He, H., Shah, S., & Wood, A. J. J. (2000). Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.109156>
- Sarafidis, P. A., & Nilsson, P. M. (2006). The metabolic syndrome: A glance at its history. *Journal of Hypertension*. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000217840.26971.b6>
- Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A. A. M., & Van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI118699>
- Schmider, J., Brockmüller, J., Arold, G., Bauer, S., & Roots, I. (1999). Simultaneous assessment of CYP3A4 and CYP1A2 activity in vivo with alprazolam and caffeine. *Pharmacogenetics*. <https://doi.org/10.1097/01213011-199912000-00007>
- Schonewille, M., De Boer, J. F., Mele, L., Wolters, H., Bloks, V. W., Wolters, J. C., ... Groen, A. K. (2016). Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *Journal of Lipid Research*, 57(8), 1455–1464.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M067488>
- Schuetz, E. G., Beck, W. T., & Schuetz, J. D. (1996). Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Molecular Pharmacology*.
- Schwartz I. (1999). Unexpected effect of verapamil on oral bioavailability of the β -blocker talinolol in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*.
[https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(99\)70107-4](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(99)70107-4)
- Schweikl, H., Taylor, J. A., Kitareewan, S., Linko, P., Nagorney, D., & Goldstein, J. A. (1993). Expression of CYP1a1 and CYP1a2 genes in human liver. *Pharmacogenetics*.
<https://doi.org/10.1097/00008571-199310000-00003>
- 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.

- Shimada, Tsutomu, Martin, M. V., Guengerich, F. P., Pruess-Schwartz, D., & Marnett, L. J. (1989). Roles of Individual Human Cytochrome P-450 Enzymes in the Bioactivation of Benzo(a)pyrene, 7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and Other Dihydrodiol Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Research*.
- Silbernagl, S. a Despopoulos A. (2004). Atlas fyziologie člověka. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X.
- 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*, Vol. 284, pp. 28485–28489. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.042168>
- Stresser, D. M., & Kupfer, D. (1999). Monospecific antipeptide antibody to cytochrome P-450 2B6. *Drug Metabolism and Disposition*.
- 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>
- 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.
- Von Richter, O., Burk, O., Fromm, M. F., Thon, K. P., Eichelbaum, M., & Kivistö, K. T. (2004). Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: A comparative analysis in paired tissue specimens. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2003.10.008>
- Vrana, A., & Kazdova, L. (1990). The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: An experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplantation Proceedings*.
- Vrana, A., Kazdova, L., Dobesova, Z., Kunes, J., Kren, V., Bila, V., ... Klimes, I. (1993). Triglyceridemia, Glucoregulation, and Blood Pressure in Various Rat Strains: Effects of Dietary Carbohydrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 683(1), 57–68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb35692.x>
- Westlind-Johnsson, A., Malmebo, S., Johansson, A., Otter, C., Andersson, T. B., Johansson, I., ... Ingelman-Sundberg, M. (2003). Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.6.755>
- Westphal, K., Weinbrenner, A., Giessmann, T., Stuhr, M., Franke, G., Zschiesche, M., ... Siegmund, W. (2000). Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: Evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.107579>

- Wilasrusmee, C., Kittur, S., Shah, G., Siddiqui, J., Bruch, D., Wilasrusmee, S., & Kittur, D. S. (2002). Immunostimulatory effect of Silybum Marianum (milk thistle) extract. *Medical Science Monitor*.
- Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., & McRee, D. E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: Structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Molecular Cell*.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80408-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80408-6)
- Yun, C. H., Shimada, T., & Guengerich, F. P. (1991). Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. *Molecular Pharmacology*.
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103–141.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zheng, L., Roeder, R. G., & Luo, Y. (2003). S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00552-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00552-X)
- Zi, X., Mukhtar, H., & Agarwal, R. (1997). Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: Inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7375>
- Zicha, J., Pechanova, O., Cacanyiova, S., Cebova, M., Kristek, F., Torok, J., ... Kunes, J. (2006). Hereditary hypertriglyceridemic rat: A suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiological Research*, 55(SUPPL. 1).