Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2012 **Barbora Knoppová**

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

Vliv sibutraminu na expresi vybraných cytochromů P450

Diplomová práce

Barbora Knoppová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 16. 4. 2012 …….

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za vedení diplomové práce a čas strávený při konzultacích. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Anetě Dořičákové, Mgr. Alžbětě Kameníčkové a Mgr. Anetě Novotné za vstřícnost, ochotu a praktické rady při experimentech.

Diplomová práce byla vypracována za finanční podpory projektu Interní grantové agentury Univerzity Palackého, grant č. PrF-2011-001.

SOUHRN

V této diplomové práci byl zkoumán účinek sibutraminu, inhibitoru zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalin, na expresi mRNA a hladinu proteinů vybraných cytochromů P450 podílejících se na metabolizmu xenobiotik. Účinek byl testován v primárních kulturách lidských hepatocytů a v lidských nádorových liniích – hepatokarcinomové linii HepG2 a střevní adenokarcinomové linii LS174T. V experimentech byly použity metody kvantitativní reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce a western blotu s následnou imunodetekcí proteinů. Vliv sibutraminu na expresi cytochromů P450 byl srovnán s působením modelových aktivátorů xenoreceptorů, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu a rifampicinu na aryl uhlovodíkový receptor respektive na pregnanový X receptor.

Z výsledků experimentů vyplynulo, že sibutramin neindukuje expresi vybraných cytochromů P450, avšak u některých jedinců může zvyšovat expresi CYP2A6 a CYP2B6. Léčba sibutraminem proto může u některých pacientů ovlivnit farmakokinetiku některých společně užívaných léčiv, jež jsou metabolizovány CYP2A6 nebo CYP2B6.

SUMMARY

In this diploma thesis, it was tested the effect of sibutramine, a serotonin-noradrenalin reuptake inhibitor, on expression of mRNA and proteins of selected cytochromes P450, which are involved in metabolism of xenobiotics. The effect was tested in primary cultures of human hepatocytes and in human carcinoma cells – hepatocarcinoma cells HepG2 and colon adenocarcinoma cells LS174T. Two methods were used, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and western blot with subsequent imunodetection of proteins. The effect of sibutramine on expression of cytochromes P450 was compared with effect of model activators of xenoreceptors, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and rifampicin on aryl hydrocarbon receptor and pregnane X receptor, respectively.

The results demonstrate that sibutramin does not induce expression of selected cytochromes P450. However, it can increase the expression of CYP2A6 and CYP2B6 in some individuals. Thus, in certain patients, sibutramine may affect pharmacokinetics of the drugs, which are taken simultaneously with sibutramine and are metabolized by CYP2A6 or CYP2B6.

OBSAH

1. Úvod 9

2. Cíle práce 11

3. Literární přehled 12

3.1. Léčba obezity 12

3.2. Sibutramin 13

3.2.1. Metabolizmus sibutraminu 14

3.2.2. Působení sibutraminu 14

3.2.3. Účinky sibutraminu 15

3.3. Cytochromy P450 15

3.3.1. Vybrané podrodiny cytochromů P450 16

3.3.1.1. Podrodina 1A 16

3.3.1.2. Podrodina 2A 17

3.3.1.3. Podrodina 2B 17

3.3.1.4. Podrodina 2C 18

3.3.1.5. Podrodina 3A 18

3.4. Regulace cytochromů P450 19

3.4.1. Jaderné receptory 19

3.4.1.1. Aryl uhlovodíkový receptor 20

3.4.1.2. Pregnanový X receptor 22

4. Materiál a metodika 24

4.1. Použité chemikálie 24

4.2. Použité roztoky 26

4.3. Použité laboratorní přístroje 28

4.4. Biologický materiál 28

4.4.1. Kultivační podmínky 28

4.5. Izolace RNA z buněčných kultur 29

4.5.1. Přepis RNA do cDNA 30

4.5.2. Kvantitativní reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce 30

4.6. Izolace proteinů 31

4.6.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS 31

4.6.2. Western Blot 32

4.6.3. Imunodetekce proteinů 33

5. Výsledky 34

5.1. Vliv sibutraminu na expresi vybraných CYPů v primárních kulturách lidských hepatocytů 34

5.2. Vliv sibutraminu na expresi vybraných CYPů v nádorových liniích 36

6. Diskuze 38

7. Závěr 39

8. Použitá literatura 40

8.1. Knihy a vědecké články 40

8.2. Internetové zdroje 50

9. Seznam použitých zkratek a symbolů 52

1. Úvod

Obezita je komplexní choroba charakterizována poruchou regulace hmotnosti, která vede k hromadění nadbytečného tuku v těle. Onemocnění je důsledkem spolupůsobení zděděných predispozic a nadměrného příjmu kalorií bez odpovídající fyzické aktivity. Pro určení stupně obezity slouží tělesný hmotnostní index (body mass index, BMI), jehož hodnota koreluje s množstvím tuku v těle jednotlivce, muže či ženy. Hodnota BMI je dána podílem váhy jedince v kilogramech a druhou mocninou jeho výšky v metrech. Za obézního člověka je prohlášen ten, jehož hodnota BMI je vyšší než 30. Překročí-li BMI hodnotu 40, pak hovoříme o extrémní obezitě (Devlin *et al.*, 2000).

V současnosti se obezita stala celosvětovým problémem. Od roku 1980 do roku 2008 se celosvětově zvýšila hodnota BMI u žen o 0,4 kg/m^2 a u mužů o 0,5 kg/m^2 (Finucane *et al.*, 2011). V roce 2008 bylo na světě přes 1,5 miliard lidí starších 20 let s nadváhou [1]. Celosvětový trend v nárůstu nadváhy a obezity byl pozorován i u dětí předškolního věku. Od roku 1990 do roku 2010 se jejich přírůstek zvýšil o 2,5 % (de Onis *et al.*, 2010). Z průzkumu provedeného závěrem roku 2010 vyplynulo, že v České Republice žije přibližně 55 % občanů s nadváhou a obezitou [2].

Jelikož je s obezitou spojeno riziko vzniku dalších chorob, jako jsou například kardiovaskulární onemocnění a diabetes mellitus II. typu, měli by se obézní lidé snažit svou váhu v co nejkratším čase zredukovat. Kromě samotné úpravy stravovacích návyků a zvýšení fyzické aktivity je nyní k dispozici i řada potravinových doplňků a léků, které pomáhají zvýšit účinek změny životního stylu. Až donedávna byl zajímavým příkladem léčiva sibutramin, jehož předepisování bylo v roce 2010 zakázáno. Důvodem byla převaha negativních vlivů na pacienty, zejména zvýšení rizika vzniku kardiovaskulárních příhod, jako jsou infarkt myokardu a zástava srdce [3, 4]. Avšak i přes tento zákaz, je sibutramin přítomný v některých potravinových doplňcích, které jsou deklarované jako čistě přírodního původu [5].

Sibutramin podléhá v lidském těle metabolickým procesům, jichž se v první fázi účastní cytochromy P450 (CYPy). Exprese těchto enzymů je kontrolována xenoreceptory zejména aryl uhlovodíkovým receptorem (AhR), pregnanovým X receptorem (PXR) a konstitutivním androstanovým receptorem (CAR). Doposud existuje jen několik publikací zaměřených na interakce sibutraminu s těmito receptory. Případná sibutraminem

indukovaná změna exprese určitých CYPů, by mohla vést k nežádoucímu ovlivnění metabolismu některých společně užívaných léčiv. Z tohoto důvodu je prospěšné zjistit, zda sibutramin působí jako induktor exprese CYPů nebo nikoliv.

2. Cíle práce

1) Vypracovat literární rešerši na dané téma.

2) V primárních kulturách lidských hepatocytů po ovlivnění sibutraminem detekovat expresi vybraných genů CYPů: 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C9 a 3A4 metodou kvantitativní reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR) a stanovit hladiny proteinů CYPů: 1A1, 2A6, 2B6, 2C9 a 3A4 pomocí western blotu.

3) V nádorových liniích: lidské hepatokarcinomové linii HepG2 a lidské adenokarcinomové linii LS174T po ovlivnění sibutraminem detekovat expresi genu CYP1A1 respektive CYP3A4 metodou qRT-PCR a pomocí western blotu stanovit hladiny těchto proteinů.

4) Shrnutí výsledků.

3. Literární přehled

3.1. Léčba obezity

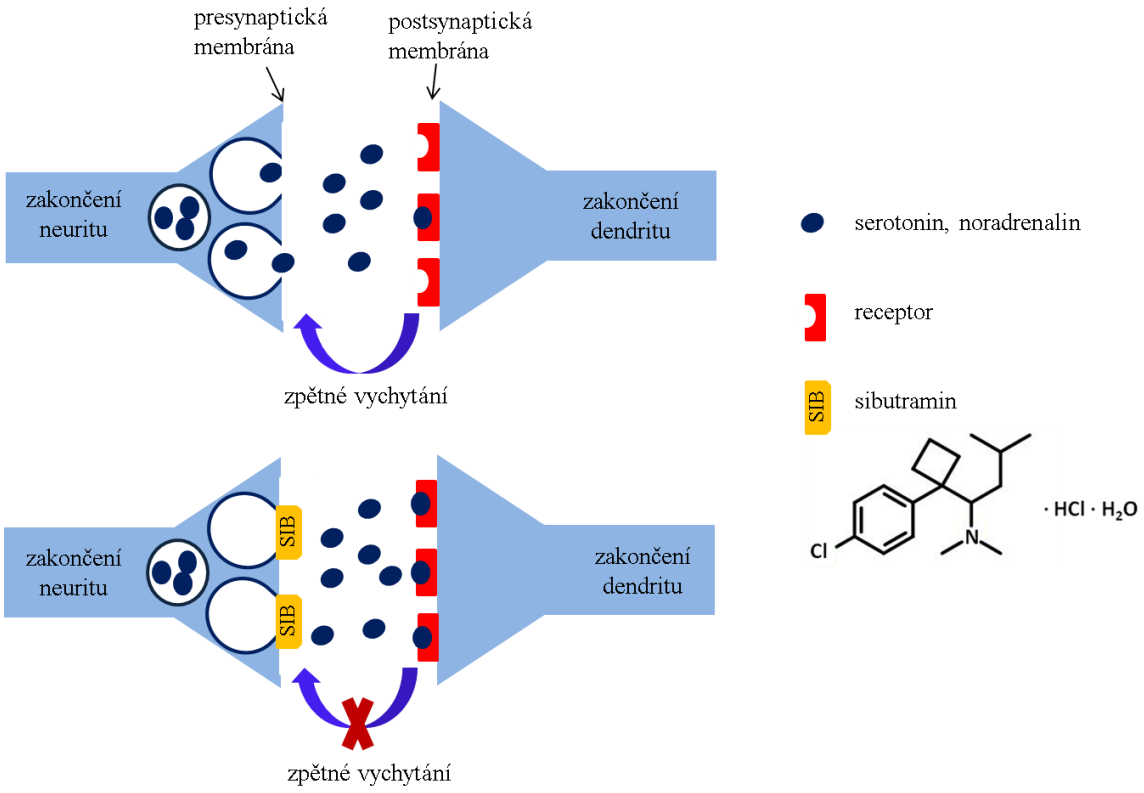
Prvním krokem léčby obezity by měla být redukce hmotnosti. Pacient by měl upravit svou životosprávu, zvýšit fyzickou aktivitu a snížit příjem kalorií ve stravě na 1000-1500 kcal/den. Redukce hmotnosti o 5-10 % počáteční váhy značně přispívá k prevenci vzniku nemocí spojených s obezitou (Devlin *et al.*, 2000).

Pokud by změny v životosprávě nepřinášely kýžený výsledek, pacientům by mohly pomoci antiobezitika, jež se předepisují pacientům s BMI vyšším než 30 (Champe *et al.*, 2008). Tyto léky snižují chuť k jídlu nebo zvyšují pocit sytosti, redukují vstřebávání živin nebo zvyšují výdej energie. Léky proti obezitě působí převážně skrz serotoninový, noradrenergní, dopaminergní nebo kanabinoidní systém receptorů v mozku (Ioannides-Demos *et al.*, 2011). Příkladem takto působících léků může být sibutramin, kterému je podrobněji věnována kapitola 3.2. Jiné léky redukují vstřebávání tuků například orlistat, který inhibuje pankreatické a žaludeční lipasy. Významnou skupinu léků tvoří deriváty amfetaminu potlačující chuť k jídlu, mezi ně patří například diethylpropion a fentermin. U jistých léků byla redukce hmotnosti zjištěna jako vedlejší efekt, jedná se o některá antidiabetika (např.: metformin, agonisty glukagon-like proteinu 1, pramlintid), antidepresiva (např.: fluoxetin, bupropion) a antiepileptika (např.: topiramát, zonisamid). Naději pro lepší terapii obézním pacientům přináší doposud neschválené léky, jako jsou leptin, peptid YY, oxyntomodulin, agonista melanokortinového receptoru 4, lorcaserin a tesofensin (Glandt *et* Raz, 2011).

Možným řešením pro pacienty, na které předepsané léky neúčinkovaly, je chirurgický zákrok. Avšak toto řešení s sebou nese riziko zdravotních komplikací. Nicméně je tento způsob zhubnutí prozatím nejúčinnější, po operaci ztrácí pacient 25-40 % své původní váhy. Nejčastěji prováděnými operacemi jsou žaludeční bypass a podvázání žaludku (Devlin *et al.*, 2000).

3.2. Sibutramin

Sibutramin (N-1-[1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]-3-methylbutyl-N, N-dimethylamin hydrochlorid monohydrát) je jedním z antidepresiv inhibující zpětné vychytávání serotoninu a noradrenalinu. Mechanismus jeho působení a struktura jsou znázorněny na Obr. č. 1 (Glandt *et* Raz, 2011).



Obrázek č. 1: Mechanismus působení sibutraminu

(Nakresleno podle Coutinho, 2009)

Tento lék byl v 80. letech vyvinut k léčbě depresí firmou Abbott Laboratories, avšak první klinické zkoušky ukázaly, že u obézních pacientů s depresemi došlo po podávání sibutraminu k úbytku hmotnosti. Proto byl později v roce 1997 sibutramin schválen jako antiobezitikum Správou potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) ve Spojených státech Amerických (Luque *et* Rey, 2002). Jako léčivo pro redukci váhy byl distribuovaný pod několika obchodními názvy (Ectiva, Meridia, Raductil, Reductil, Sibutral a další).

Lék je určen pro pacienty s BMI ≥ 30 kg/m^2 nebo ≥ 27 kg/m^2 pokud daný pacient má diagnostikován některý z rizikových faktorů například diabetes, dyslipidémii nebo hypertenzi. Denní dávka léku bývá 5, 10 nebo až 15 mg [6]. Dávka 15 mg sibutraminu omezí denní příjem energie o 310 kcal. (Chapelot *et al.*, 2000).

3.2.1. Metabolizmus sibutraminu

Sibutramin je podáván *per os*, vstřebán gastrointestinálním traktem a následně metabolizován jaterními cytochromy P450 (viz kap. 3. 3.) na dva aminové metabolity M_1 N-{1-[1-(4-chlorofenyl)cyklobutyl]-3-metylbutyl}-N-metylamin a M_2 1-[1-(4-chlorofenyl) cyklobutyl]-3-metylbutylamin, které mají hlavní farmakologickou aktivitu [6]. Oproti sibutraminu metabolity M_1 a M_2 inhibují silněji vychytávání serotoninu (5-hydroxytryptaminu, 5-HT) i noradrenalinu (Connoley *et al.*, 1999). Po podání jedné 15 mg dávky sibutraminu se v krevní plazmě pacienta nachází v různých koncentracích sibutramin (3-8 ng/ml), metabolit M_1 (2-3 ng/ml) a metabolit M_2 (6-8 ng/ml) podle Abolfathi *et al.*, 2004. Následně jsou metabolity M_1 a M_2 převedeny hydroxylací a glukuronidací na neaktivní metabolity, které jsou vyloučeny močí z těla (Link *et al.*, 2006).

3.2.2. Působení sibutraminu

Sibutramin působí v CNS, kde snižuje chuť k jídlu, a tím zmenšuje i množství energie přijaté tělem. Cílem účinku sibutraminu je homeostatický systém, který stabilizuje množství tuku v těle. Tento systém reaguje na signály vyvolané jídlem v gastrointestinálním traktu a na signály o množství uložených triglyceridů v adipocytech. V CNS sibutramin blokuje presynaptické zpětné vychytávání 5-HT a noradrenalinu, a tím aktivuje pro-opiomelanokortinové (POMC) neurony, lokalizované v obloukovitém jádře hypotalamu, prostřednictvím 5-HT receptorů. POMC neurony mají důležitou roli při energetické homeostázi, protože doručují signál hladu do paraventrikulárního jádra hypotalamu i do ostatních klíčových částí mozku. Produkty těchto neuronů, pro-opiomelanokortin a peptid označovaný jako kokain-amfetaminem regulovaný transkript (CART), inhibují příjem stravy. Sibutraminem způsobené snížení energetického příjmu ústí v mírný pokles hmotnosti a zároveň vede k sympatické odpovědi, jejímž výsledkem je mírné zvýšení srdeční činnosti a krevního tlaku (Bloom *et al.*, 2008).

3.2.3. Účinky sibutraminu

Léčba sibutraminem přináší obézním pacientům nejen pozitivní ale i negativní účinky. Roční léčba zvyšuje úbytek hmotnosti o 4,3 kg oproti placebu (Padwal *et al.*, 2003). Užívání sibutraminu příznivě ovlivňuje koncentraci HDL cholesterolu, snižuje koncentraci triglyceridů a glukózy (Rucker *et al.*, 2007). U některých pacientů dochází ke zvýšení krevního tlaku a pulzu, jako důsledek působení sibutraminu na sympatický nervový systém. Avšak s ubývající tělesnou hmotností jsou tyto vedlejší účinky společně s rizikem vzniku onemocnění spojených s obezitou sníženy (Lean, 2001).

Pro zjištění negativních účinků sibutaminu byla provedena rozsáhlá studie Sibutramine Cardiovascular Outcome Trial (SCOUT). Pacientům byla podávána dávka 10-15 mg sibutraminu. Průměrná délka léčby trvala 3,4 roků a hmotnost pacientů léčených sibutraminem se snížila průměrně o 1,7 kg. Výsledkem této studie bylo, že u pacientů, kteří měli již dříve kardiovaskulární potíže, došlo po dlouhodobé léčbě sibutraminem ke zvýšení rizika infarktu myokardu a zástavy srdce, avšak nikoli smrti způsobené kardiovaskulárním onemocněním nebo smrti z jiné příčiny (James *et al.*, 2010).

Na základě výsledků SCOUT studie bylo předepisování sibutraminu zakázáno, nejprve 21. ledna 2010 v Evropě [3] a později 8. října 2010 v USA [4]. Nicméně i přes tyto zákazy jsou na trhu stále dostupné potravinové doplňky obsahující sibutramin [5, 7]. Například u produktu Herbal Flos Lonicerae (Herbal Xenicol) byl zjištěn dvojnásobně vyšší obsah sibutraminu oproti předepsané denní dávce [8].

3.3. Cytochromy P450

Organismem přijatá léčiva mohou být eliminována v nezměněné podobě, jde převážně o hydrofilní látky, nebo mohou podléhat biotransformaci, kdy se jedná o látky převážně lipofilní povahy. Biotransformační procesy léčivo degradují nebo aktivují na farmakologicky účinnou formu. Tyto procesy rozdělujeme na tři fáze, během kterých dochází ke specifickým enzymatickým reakcím nebo k transportu metabolitů. V první fázi jsou nejdůležitějšími enzymy cytochromy P450 (CYPy), které se účastní monooxygenací, jejichž podstatou je inkorporace jednoho atomu kyslíku do substrátu a redukce druhého atomu kyslíku na vodu. Touto reakcí polarizují molekulu xenobiotika a připravují ji tak k dalším reakcím, jež posléze usnadňují její export a eliminaci z organismu (Dostálek *et al.*, 2006).

Cytochromy P450 byly objeveny v roce 1958 v jaterních mikrosomech prasat a krys jako pigmenty vázající oxid uhelnatý (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958), toto pojmenování dostaly až později v roce 1962. Název byl odvozen od absorpčního maxima vlnové délky redukované formy derivátu s oxidem uhelnatým, což je 450 nm (Omura *et* Sato, 1962). Po stránce strukturní jsou cytochromy hem proteiny cytochromu b obsahující protoporfyrin IX (Hodgson *et al.*, 2010).

S přibývajícím množstvím objevených forem CYPů byla roku 1987 zavedena jejich nomenklatura. Na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci se CYPy řadí do rodin (značených číslem) se shodou vyšší než 40 % a podrodin (značných písmenem) se shodou vyšší než 55 % sekvence. Příkladem označení může být CYP1A1, kdy poslední číslo označuje pořadí objevu enzymu s odlišnou substrátovou specifitou. Geny podrodiny CYPů se nacházejí na stejném chromozómu ve stejném klastru a nesegregují, proto se předpokládá jejich původ duplikací genů (Nebert *et al.*, 1991).

Cytochromy P450 se nachází u rostlin, živočichů a mikroorganismů. U člověka bylo objeveno celkem 57 CYPů v různých orgánech například v játrech, ledvinách, plících, mozku, nadledvinkách, tenkém střevě, kůži a dalších. CYPy jsou v buňkách vázány na membrány endoplazmatického retikula nebo na vnitřní membránu mitochondrií. V játrech je lokalizováno 15 forem CYPů z rodin 1-3, které se podílí na metabolismu xenobiotik. Ostatní CYPy syntetizují endogenní látky například steroidní hormony, žlučové kyseliny a cholesterol (Seliskar *et* Rozman, 2007).

3.3.1. Vybrané podrodiny cytochromů P450

Následující kapitoly jsou věnovány charakteristikám vybraných podrodin CYPů metabolizující xenobiotika.

3.3.1.1. Podrodina 1A

Do podrodiny CYPů 1A řadíme zástupce CYP1A1 a CYP1A2, které mají z 80 % shodnou aminokyselinovou sekvenci (Zhou *et al.*, 2009). CYP1A1 se nachází v nízkém zastoupení v játrech (Schweikl *et al.*, 1993), zatímco CYP1A2 v tomto orgánu zastupuje 13 % CYPů (Shimada *et al.*, 1994).

Z endogenních látek obě formy metabolizují steroidní hormony, z exogenních látek metabolizují mnoho prokarcinogenů a mutagenů například benzo(a)pyren, aflatoxin B1 a 2–acetylaminofluoren, a proto může zvýšená aktivita těchto CYPů vyvolat nádorové

onemocnění (Rendic, 2002). Významným exogenním substrátem CYP1A2 je kofein (Butler *et al.*, 1989).

CYP1A1 a CYP1A2 jsou indukovány polyaromatickými uhlovodíky, jejichž zdrojem je například maso upravené za vyšších teplot na dřevném uhlí. Významným induktorem je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) podle Kalow *et al.*, 1991, dále látky obsažené v cigaretovém kouři například benzo(a)pyren (Hockley *et al.*, 2007) a látky v některých druzích zeleniny například v brokolici (Kall *et al.*, 1996). Expresi i aktivitu CYP1A1 inhibuje harmin obsažený například v harmale stepní (*Peganum harmala)* podle El Gendy *et al.*, 2012. Naopak aktivitu CYP1A2 inhibuje například antiepileptikum karbamazepin (Masubuchi *et al.*, 2001).

Geny *CYP1A1* a *CYP1A2* se nachází na chromozomu 15q24.1 [9]. U obou forem byl popsán genetický polymorfismus a doposud bylo uvedeno na webových stránkách Komise pro nomenklaturu alel cytochromů P450 celkem 11 variant alel *CYP1A1* a 21 variant alel *CYP1A2* [10].

3.3.1.2. Podrodina 2A

Jedním vybraným zástupcem z podrodiny 2A je forma CYP2A6, která se nachází v jaterní tkáni, kde představuje 1-10 % z celkového počtu CYPů (Pelkonen *et al.*, 2000). Tato forma se podílí na metabolismu estrogenů (Rendic, 2002). CYP2A6 je odpovědný za hydroxylaci rostlinné látky kumarinu (Yun *et al.*, 1991) a také za metabolizaci nikotinu na kotinin (Nakajima *et al.*, 1996). Dále také metabolizuje kyselinu valproovou, tamoxifen a propofol. CYP2A6 se také podílí na metabolismu prokarcinogenů jakou jsou například aflatoxin B1 a množství nitrosaminů (Di *et al.*, 2009). Induktorem exprese této formy CYP je rifampicin (Rae *et al.*, 2001) a inhibitorem enzymu je 8-methoxypsoralen (Mäenpää *et al.*, 1994).

Gen kódující CYP2A6 se nachází na chromozomu 19q13.2 (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995). Bylo popsáno několik alelových variant tohoto genu, například varianta *CYP2A6*35* spojená s nižší aktivitou CYP2A6 (Al Koudsi *et al.*, 2009).

3.3.1.3. Podrodina 2B

Významným zástupcem podrodiny 2B je forma CYP2B6, která je lokalizována v játrech, mozku, střevech, ledvinách a v malém zastoupení v plicích (Gevrot *et al.*, 1999).

Z endogenních látek CYP2B6 metabolizuje steroly, mastné kyseliny a steroidní hormony (Rendic, 2002). Účastní se metabolismu mnoha léčiv, mezi která řadíme cyklofosfamid, tamoxifen, bupropion a sibutramin (Mo *et al.*, 2009). Právě studií Bae a kol. (2008) bylo odhaleno, že CYP2B6 přeměňuje sibutramin na dva aktivní metabolity M_1 a M_2. CYP2B6 je vysoce indukovatelný fenobarbitalem, rifampicinem a klotrimazolem (Faucette *et al.*, 2004). CYP2B6 inhibují trombolytické léky klopidogrel a tiklopidin (Richter *et al.*, 2004) nebo také rostlinné terpenoidy citral a geraniol (Seo *et al.*, 2008).

U genu *CYP2B6* lokalizovaném na chromozomu 19q13.2 (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995) bylo popsáno celkem 29 alelických variant [11]. Ve studii Chunga a kol. (2011), která se zabývala vlivem genotypu CYP2B6 na farmakokinetiku sibutraminu a jeho metabolitů, byla zjištěna pravděpodobná asociace alely *CYP2B6*6* s nižší clearancí metabolitu M_1.

3.3.1.4. Podrodina 2C

Podrodina 2C tvoří 20 % z celkového množství jaterních CYPů (Shimada *et al.*, 1994). Významným zástupcem je CYP2C9, který metabolizuje některé endogenní látky steroidy, melatonin, retinoidy, kyselinu arachidonovou (Mo *et al.*, 2009) a důležitá léčiva jako je lék pro diabetiky tolbutamid, antikonvulzivum fenytoin, antikoagulant warfarin a další (Zhou *et al.*, 2009). Induktorem exprese *CYP2C9* je rifampicin (Rae *et al.*, 2001) a inhibitory jeho aktivity jsou ketokonazol a sulfafenazol (Baldwin *et al.*, 1995).

CYP2C9 byl zamapován na chromozom 10q24 (Mo *et al.*, 2009). U *CYP2C9* byly zjištěny dva typy mutantních alel *CYP2C9*2* a *CYP2C9*3*, které způsobují snížený metabolismus některých léčiv například warfarinu (Takahashi *et* Echizen, 2001).

3.3.1.5. Podrodina 3A

Podrodina 3A je nejdůležitější rodinou ze systému CYPů, její zástupci se významnou měrou podílí na metabolismu xenobiotik i endogenních substrátů. Členové podrodiny tvoří 30 % jaterních CYPů, přičemž nejvíce zastoupenou formou je CYP3A4 (Pelkonen *et al.*, 2008). Kromě jater se nachází v tenkém střevě a ledvinách (Zhou *et al.*, 2008).

CYP3A4 má velice širokou substrátovou specifitu. Metabolizuje více než 50 % běžně užívaných léčiv, jako jsou například antiarytmika, statiny, fibráty, opioidy, antidepresiva, makrolidová antibiotika a mnoho dalších (Rendic, 2002). I sibutramin je

podle údajů z příbalového letáku léku Meridia metabolizován tímto CYP [6]. K substrátům CYP3A4 řadíme také endogenní látky, příkladem může být testosteron, progesteron, androstenedion a žlučové kyseliny (Pelkonen *et al.,* 2008). CYP3A4 se podílí i na metabolizmu prokarcinogenů, bioaktivuje hepatokarcinogen aflatoxin B_1 (Aoyama *et al.,* 1990).

Příkladem induktorů exprese *CYP3A4* může být fenobarbital (Martin *et al.,* 2003), rifampicin (Lake *et al.,* 1997) a dexametazon (McCune *et al.,* 2000). Klinicky významnými inhibitory CYP3A4 jsou fungicidní azoly (ketokonazol a itraconazol), antimikrobiální látky (clarithromycin, erythromycin a ritonavir), antihypertenziva (verapamil a diltiazem) a také některé složky rostlin a potravin jako je například grapefruitový džus obsahující bergamotin (Pelkonen *et al.,* 2008).

Fluorescenční *in situ* hybridizací byla zjištěna lokalizace *CYP3A4* na chromozomu 7q21.1 (Inoue *et al.,* 1992). U tohoto genu bylo popsáno více jak 20 mutací, avšak s neurčitou významností. V *in vitro* podmínkách byly popsány alely se sníženou (**8, *11, *13, *17*), žádnou (**20*) nebo zvýšenou (**18A*) metabolickou aktivitou CYP3A4. Avšak jejich nízká frekvence výskytu neumožňuje popsat známé rozdíly v aktivitě CYP3A4 mezi jednotlivými jedinci. Předpokládá se, že rozdíly v expresi *CYP3A4* jsou způsobeny variabilitou genů kódujících proteiny účastnících se regulace exprese *CYP3A4* (Božina *et al.*, 2009).

3.4. Regulace cytochromů P450

Z hlediska metabolismu je regulace CYPů velice důležitým dějem, který ovlivňuje farmakokinetiku xenobiotik. CYPy reguluje několik mechanismů, nejvýznamnějším z nich je aktivace exprese genů pro CYPy prostřednictvím jaderných receptorů. Dále jsou CYPy regulovány na úrovni mRNA, zvýšenou translací nebo stabilizací mRNA. Nezanedbatelný mechanismus regulace probíhá i na úrovni proteinů, kdy různé látky aktivují nebo inhibují jednotlivé CYPy (Hodgson *et al.,* 2010).

3.4.1. Jaderné receptory

Jaderné receptory tvoří největší skupinu transkripčních faktorů regulující různé biologické procesy včetně metabolismu. Tyto receptory jsou charakterizovány vysoce konzervovanými oblastmi: DNA vazebnou doménou (DBD) a ligand vazebnou doménou

(LBD). DBD se nachází na N-konci a obsahuje aktivační funkci-1 (AF-1). Tuto doménu tvoří dva α-helixy a dva zinkové prsty, které zajišťují specifitu vazby na DNA a dimerizaci receptoru. Na rozdíl od DBD, je LBD umístěna na C-konci a obsahuje AF-2 vážící koaktivátory. Obě domény spojuje tzv. hinge oblast nesoucí jaderný lokalizační signál (NLS). Aktivita jaderných receptorů je řízena vazbou ligandů, malých lipofilních molekul, které mohou být endogenního nebo exogenního původu. Ligandy se v cytosolu buňky váží na LBD, to způsobí konformační změnu, při které se odhalí NLS a celý komplex se translokuje do jádra. Zde dohází k dimerizaci následné vazbě na responzivní elementy v promotorech genů a aktivaci exprese (Staudinger *et* Lichti, 2007).

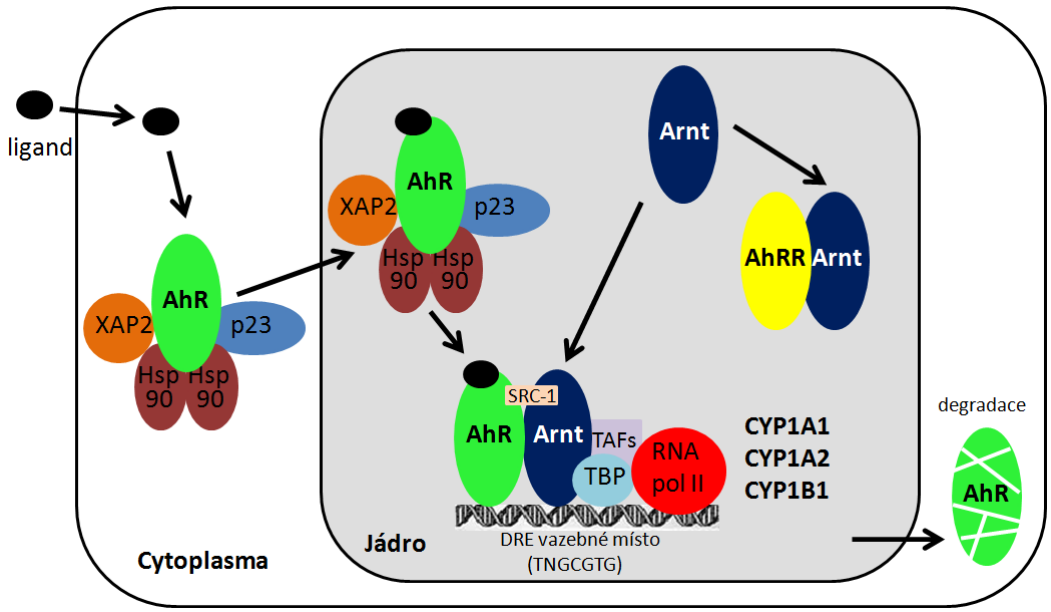
Exprese *CYPů* je regulována několika jadernými receptory. Geny rodiny CYP1 jsou transkripčně aktivovány prostřednictvím aryl uhlovodíkového receptoru (AhR). Zatímco indukce exprese genů rodin CYP2 a CYP3 může být aktivována i několika různými jadernými receptory, jakými jsou například pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní adrostanový receptor (CAR), glukokortikoidní receptor a receptor vitaminu D (Pávek *et* Dvořák, 2008).

3.4.1.1. Aryl uhlovodíkový receptor

Aryl uhlovodíkový receptor se účastní nejlépe popsaného mechanismu indukce exprese *CYPů*. Tento receptor náleží do rodiny transkripčních faktorů s charakteristickými strukturálními motivy bHLH (basic helix-loop-helix) a PAS (Per-Arnt-Sim; kde Per znamená *Drosophila* period clock protein, Arnt je AhR nuclear translocator a Sim je *Drosophila* single-minded protein). Motiv bHLH se nachází v N-koncové oblasti a účastní se vazby receptoru na DNA a heterodimerizaci receptoru. PAS doména přiléhající k C-konci bHLH motivu a slouží jako povrch k vytvoření heterodimeru s dalším proteinem obsahujícím PAS doménu (Zhou *et al.*, 2009).

AhR se nachází v cytosolu buňky v komplexu se dvěma chaperony heat-shock proteiny 90 (Hsp90), ko-chaperonem p23 a X-associated protein 2 (XAP2), které zajišťují správné složení a stabilizaci AhR (Petrulis *et* Perdew, 2002). Typickými ligandy AhR jsou hydrofobní, polycyklické aromatické uhlovodíky. Příkladem lignadů může být dioxin TCDD, 3–metylcholantren, benzo(a)pyren a β-naftoflavon (Murray *et al.*, 2005). AhR s ligandem vytváří v jádře heterodimer s Arnt a celý komplex ligand-AhR/Arnt se váže na responzivní elementy (DREs) podle Denison *et* Nagy, 2003), které se nachází v promotorové oblasti genů *CYP1A1*, *CYP1A2* a *CYP1B1* a jsou charakterizované

nesymetrickou sekvencí 5‘-T/GnGCGTG-3‘. Na heterodimer vázaný na DNA se váží ještě další molekuly koaktivátorů (například koaktivátor steroidního receptoru 1, SRC-1), TATA-vazebný protein (TBP), TBP-asociované faktory (TAFs) a nakonec RNA polymeráza (RNA pol II). Poté je zahájena transkripce *CYPů* viz Obr. č. 2 (Pávek *et* Dvořák, 2008).



Obrázek č. 2: Schéma indukce exprese genů CYPů prostřednictvím AhR

(Nakresleno podle Pávek *et* Dvořák, 2008)

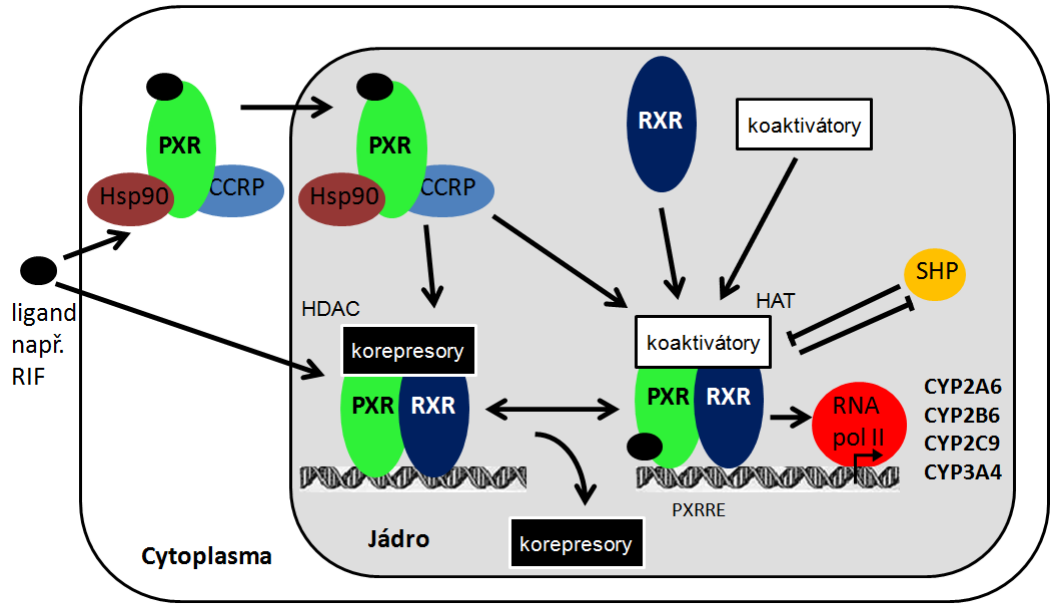
Po aktivaci exprese nebo také pokud nedojde k heterodimerizaci nebo navázání heterodimeru na DNA, je rozpoznána jaderná exportní sekvence (NES) receptoru a AhR je dopraven zpět do cytoplazmy. Exportovaný komplex AhR je ubiquitinován a degradován v proteazomu (Denison *et* Nagy, 2003).

Přenesení signálu z AhR je negativně zpětnovazebně regulováno, pomocí inhibice represorem AhR (AhRR). Doposud se předpokládají dva mechanismy působení AhRR. V prvním mechanismu AhRR soutěží s AhR o vazbu na DREs, avšak bez uplatnění kompetice AhR a AhRR o Arnt. Komplex Arnt-AhRR vázaný na DREs může navázat ko-represory a histondeacetylasy, jejichž působení vede k inaktivaci transkripce. Druhý mechanismus je nezávislý na kompetitivní vazbě s Arnt nebo DREs. Jedná se o transrepresi pravděpodobně dimerem AhRR-Arnt. Prozatím není zřejmé, jestli se Arnt transreprese účastní a také zda AhRR netvoří komplex s jinými proteiny nebo dokonce jestli transrepresi nezajišťuje sám (Hahn *et al.*, 2009).

3.4.1.2. Pregnanový X receptor

V roce 1988 byl Kliewerem a spolupracovníky objeven PXR, který je rozhodujícím činitelem při regulaci exprese *CYP3A4* (Lehmann *et al.*, 1998). Bylo zjištěno, že PXR má velkou LBD a proto je schopen vázat širokou škálu ligandů (Watkins *et al.*, 2001), mezi které patří přirozeně se vyskytující steroidy pregnenolon a progesteron, syntetické glukokortikoidy a anti-glukokortikoidy (Kliewer *et al.*, 1998). Mezi důležité ligandy PXR patří léčiva jako je antibiotikum rifampicin (Goodwin *et al.*, 1999).

Bez navázaného ligandu může PXR setrvávat jak v cytoplazmě, tak i v jádře buňky jak je znázorněno na Obr. č. 3. V cytoplazmě se nachází v komplexu s Hsp90 a cytoplazmatickým CAR retenčním proteinem (CCRP). Avšak v jádře je vázán ve formě heterodimeru s retinoid X receptorem (RXR) a korepresorovým komplexem obsahující SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) na PXR responzivní elementy (PXRRE). Mediátor SMRT váže histon deacetylasu (HDAC), která deacetylací histonů kondenzuje chromatin a vede tak k transkripční represi genů (Pávek *et* Dvořák, 2008).



Obrázek č. 3: Schéma indukce exprese genů CYPů prostřednictvím PXR

(Nakresleno podle Pávek *et* Dvořák, 2008)

V přítomnosti ligandu PXR v jádře vymění korepresorový komplex za koaktivátorový a PXR v cytoplazmě vytvoří hetorodimer PXR/RXR (Pávek *et* Dvořák, 2008). Ten je translokován do jádra a váže se na PXRRE, který se nachází na 5‘-flanking regionu

CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9 a *CYP3A4* a obsahuje motiv přímé, převrácené nebo obrácené repetice 5‘-AG(G/T)TCA-3‘, oddělené 3 - 6kb úsekem (Kliewer *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2006). Na komplex ligand-PXR/RXR se váže SRC-1, který usnadňuje tvorbu transkripčního komplexu obsahujícího RNA pol II a také přichycení histon acetyltransferasy (HAT), která dekondenzuje chromatin a umožní transkripci genů (Pávek *et* Dvořák, 2008).

Expresi indukovanou PXR inhibuje jaderný receptor pojmenovaný jako small heterodimer partner (SHP). Tento receptor postrádá DBD a váže se přímo na PXR, tím způsobuje represi genů aktivovaných PXR (Ourlin *et al.*, 2002). Naopak aktivovaný PXR inhibuje expresi SHP, což umožní transkripci PXR regulovaných genů (Li *et* Chiang, 2006).

4. Materiál a metodika

4.1. Použité chemikálie

Název chemikálie	Firma	Katalogové číslo
akrylamid/bis-akrylamid 40 %	Bio Basic	A0007
APS	Sigma-Aldrich	MKBC7986
bovinní sérový albumin	Bio Basic	AD0023
Bradfordovo činidlo	Sigma-Aldrich	B2916
bromfenolová modř		B0126
deoxycholát sodný		30970
dNTP: dATP	Takara	4026
dCTP		4028
dGTP		4027
dTTP		4029
DMSO 99,9 %	Sigma-Aldrich	D8418
DTT		43815
Dulbecco´s Modified Eagle´s medium		D6546
EDTA		EDS
FBS	PAA	A15-104
glycerol	Bio Basic	GB0232
KCl	Lachner	30076-AP0
L-glutamin	Sigma-Aldrich	G6392
Light Cycler® 480 Syber Green I Master	Roche Diagnostic	04 707 516 001
MEM non-essential amino acid solution 100x	Sigma-Aldrich	M7145
metanol 99,97 %	Lach-Ner	20038-AT0
$Na_2HPO_4.12H_2O$		30061-AP0
Page Ruler TM Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	26619
penicilin - streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333
ponceau S rouge		P3504
protilátka primární:	Santa Cruz Biotechnology	
aktinu (I-19), kozí polyklonální IgG		sc-1616
CYP1A1 (G-18), kozí polyklonální IgG		sc-9828
CYP2A6 (F16 P2 D8), myší monoklonální IgG_1		sc-53615
CYP2B6 (H-110), králičí polyklonální IgG		sc-67224
CYP2C9/19 (C-21), kozí polyklonální IgG		sc-23436
CYP3A4 (HL-3), myší monoklonální IgG		sc-53850

Název chemikálie	Firma	Katalogové číslo
protilátka sekundární:		
kozí proti-myší IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005
králičí proti-kozí IgG-HRP		sc-2768
kozí proti-králičí IgG-HRP		sc-2004
random primer (6 mer)	Takara	3801
reakční pufr M-MuLV RT	Finnzymes	F-572B
reverzní transkriptáza M-MuLV RT RNase H^-	Thermo Scientific	F-572S
RNasový inhibitor	Takara	2311A
rifampicin	Sigma Aldrich	R8883
RNase free water	Bio Basic	DD1005
SDS	Sigma-Aldrich	L3771
sibutramin	Sigma-Aldrich	R8883
sušené mléko 1,3 % Laktino®	Promil	
TBS 10x	Bio Basic	A0027
TCDD	Sigma-Aldrich	48599
TEMED	Bio Basic	TB0508
Tris		TB0194
Tris-Glycin pufr 10x		A0029
Tris-Glycin-SDS pufr 10x		A0031
Tri Reagent	Molecular Research Center	TR 118
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787
trypanová modř		T6146
Tween20		P137-9
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2048

Tabulka č. 1: Sekvence jednotlivých F a R primerů k příslušným genům

Gen	Sekvence F primeru	Sekvence R primeru
CYP1A1	5'- TCCGGGACATCACAGACAGC-3'	5'- ACCCTGGGGTTCATCACCAA-3' [(1)]
CYP1A2	5'-CATCCCCCACAGCACAACAA-3'	5'-TCCCACTTGGCCAGGACTTC-3' [(1)]
CYP2A6	5'-TGCAAGGGCTGGAGGACTTC-3'	5'-AGGGTGGTGCTGACGGTCTC-3' [(2)]
CYP2B6	5'-GGCCATACGGGAGGCCCTTG-3'	5'-AGGGCCCCTTGGATTTCCG-3' [(3)]
CYP2C9	5'- TCCTATCATTGATTACTTCCCG-3'	5'- AACTGCAGTGTTTTCCAAGC-3' [(4)]
CYP3A4	5'-TTCAGCAAGAAGAACAAGGACAA-3'	5'-GGTTGAAGAAGTCCTCCTAAGC-3' [(5)]
GAPDH	5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTGGTCG-3' [(1)]

Použité zdroje: 1 - Dvořák *et al.*, 2008; 2 - Onica *et al.*, 2008; 3 - Monreau *et al.*, 2007; 4 - Duret *et al.*, 2006; 5 - Pávek *et al.*, 2007. Sekvence byly nasyntetizovány firmou Genri-Biotech.

4.2. Použité roztoky

4x dělící pufr:

1,5M Tris-HCl o pH 8,8

72,6 g Tris

400 ml ddH_2O

Kultivační médium pro HEPG2 a LS174T:

500 ml Dulbecco´s Modified Eagle´s medium (DMEM)

5 ml L – glutamin

5 ml neesenciálních aminokyselin

5 ml penicilin/streptomycin

50 ml FBS

2x loading pufr:

2,5 ml 4x zaostřovací pufr

4 ml 10% SDS

2 ml glycerol

2 mg bromfenolová modř

0,31 g DTT

10 ml dH_2O

Lyzační pufr RIPA:

150mM NaCl

10mM Tris (pH 7,2)

0,1% SDS

1% Triton X-100

1% deoxycholát sodný

5mM EDTA

1x migrační pufr:

100 ml 10x Tris-Glycin–SDS pufr

900 ml H_2O

10x PBS:

40 g NaCl

1 g KCl

16,05 g $Na_2HPO_4.12H_2O$

1 g $KH_2PO_4.12H_2O$

500 ml dH_2O

upravit pH na 7,4

Ponceau S:

0,5 g Ponceau S

5 ml kyselina octová

100 ml dH_2O

1x TBS/Tween:

100 ml 10x TBS

900 ml dH_2O

500 µl Tween20

1x transferový pufr:

100 ml 10x Tris-Glycin pufr

200 ml metanol

700 ml dH_2O

4x zaostřovací pufr:

0,5M Tris-HCl o pH 6,6

24 g Tris

400 ml ddH_2O

4.3. Použité laboratorní přístroje

Název přístroje	Typ přístroje	Firma
centrifuga	Centrifuge 5415 R	Eppendorf
cycler	Light Cycler 2.0	Roche
flow box	ESCO Class II Type A2	Labculture
inkubátor	Contherm Mitre 4000 Series	Contherm Scientific
mikroskop	HT-NIB-100	All Pro Corporation
spektrofotometr	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
spektrofotometr	Infinite M260	Tecan
termoblok	Accublock Digital dry bathe	Labnet International
třepačka	Mini Rocket MR-1	Biosan
váha	ABS 80-4	Kern & Sohn
vodní lázeň	LCB 22D	Labtech
vortex	Reax Top	Heidolph
vyvolávací automat	XR 24 PRO	Dürr

4.4. Biologický materiál

Jako biologický materiál byly použity jak primární kultury lidských hepatocytů, tak i komerční nádorové linie. Primární kultury lidských hepatocytů byly získány resekcí od multiorgánových dárců, kteří byli celkem tři. Vzorky byly označeny jako HH2 (muž, 64 let), LH36 (muž, 53 let) a LH38 (muž, 58 let). Primární kultury lidských hepatocytů byly použity pro studium indukce exprese genů CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 3A4 a pro stanovení hladiny proteinů CYP1A1, 2A6, 2B6, 2C9 a 3A4. Z komerčních kultur byly použity lidské hepatokarcinomové linie HepG2 (ECACC, 85011430) a lidské adenokarcinomové linie LS174T (ECACC, 87060401) pro studium exprese genu a stanovení hladiny proteinu CYP1A1 respektive CYP3A4.

4.4.1. Kultivační podmínky

Pro kultivaci nádorových linií HepG2 a LS174T bylo použito komerční DMEM médium obohacené o další složky viz kap. 4.2. Primární kultury lidských hepatocytů byly po izolaci (Pichard-Garcia *et al.*, 2002) kultivovány v ISOM médiu (Isom *et al.*, 1985) obohaceném o 2 % fetálního telecího séra na kultivačních deskách pokrytých kolagenem (BD Biosciences). Následující den bylo médium vyměněno za bezsérové a po 48h

stabilizaci byly kultury připravené k ošetření. Jak nádorové linie, tak i primární kultury lidských hepatocytů byly kultivovány při 37 °C, 5% CO_2 a 95% vlhkosti.

Kultury hepatocytů i nádorové linie byly ošetřeny médiem obsahujícím různou koncentraci sibutraminu 5, 10 nebo 25 ng/ml. Testované koncentrace SIB byly zvoleny na základě plazmatické koncentrace SIB a jeho metabolitů po užití jedné 15 mg dávky SIB (viz kap. 3.2.1). Jako negativní kontrola byly použity buňky ošetřené médiem obsahujícím 0,1% dimethylsulfoxid (DMSO), jako pozitivní kontrola buňky ošetřené 5nM TCDD nebo 10μM rifampicinem (RIF) v závislosti na studovaném CYPu. Takto ošetřené kultury byly inkubovány 24 hodin pro izolaci mRNA nebo 48 hodin pro izolaci proteinů.

4.5. Izolace RNA z buněčných kultur

Z jednotlivých kultur byla po 24h inkubaci vyizolována RNA pomocí Tri Reagentu. Po odstranění kultivačního média a po promytí buněk 1 ml 1x PBS, byly buňky zlyzovány přidáním 1 ml Tri Reagentu. K lyzátu v mikrozkumavkách bylo přidáno 200 µl chloroformu. Mikrozkumavky byly ručně třepány po dobu 1 min, následně byly inkubovány 5 min při laboratorní teplotě a poté byly centrifugovány (13000 rpm, 4 °C, 15 min). Centrifugací došlo k separaci na dvě fáze oddělené rozhraním. Spodní červená fenol-chloroformová fáze a interfáze obsahovala DNA a proteiny. Horní bezbarvá vodná fáze obsahovala RNA. Vodní fáze s RNA byla přenesena do čistých mikrozkumavek, precipitována 500 µl isopropanolu a lehce vortexována. Následně inkubována 5 min při laboratorní teplotě a poté centrifugována (13000 rpm, 4 °C, 13 min). Po centrifugaci byl supernatant odstraněn, bílý pelet obsahující RNA byl promyt 1 ml 75% etanolu a centrifugován (13000 rpm, 4 °C, 15 min). Jestliže byl pelet po centrifugaci stále viditelný, byl předchozí krok zopakován. Pelet byl vysušen ve flowboxu a rozpuštěn v 10–20 µl RNase free water.

Koncentrace a čistota vyizolované RNA byly zjištěny pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000. Pro jedno měření byly použity 2 µl vzorku. Koncentrace RNA byla zjištěna absorbancí vzorku při 260 nm. U vzorku byla změřena také čistota RNA (poměr absorbancí vzorku při 260 nm a 280 nm), která se pohybovala v rozmezí hodnot 1,5 a 2,0. Vzorky s vysokou koncentrací RNA byly naředěny na koncentraci přibližně 2000 ng/µl a opět proměřeny.

4.5.1. Přepis RNA do cDNA

Vzorky vyizolované RNA byly naředěny s RNase free water tak, aby výsledný roztok obsahoval 1000 ng RNA na objem 5 µl. K takto naředěným vzorkům byl přidán 1 µl random primerů o koncentraci 100 pmol/µl. Vzorky byly poté inkubovány 5 min při 65 °C, zchlazeny na ledu, krátce centrifugovány a bylo k nim přidáno 6 µl mixu. Složení mixu viz Tab. č. 2. Vzorky s mixem byly krátce centrifugovány, inkubovány 1 h při 42 °C, poté 10 min při 65 °C a zchlazeny na ledu 2 min. Nasyntetizovaná cDNA byla zředěna 48 µl RNase free water, zvortexována a uchována při -20 °C.

Tabulka č. 2: Složení mixu pro přepis RNA do cDNA

Složka	Objem pro 1 reakci [µl]
reverzní transkriptáza	0,6
RNasový inhibitor	0,3
dNTP [10mM]	0,6
10x reakční pufr	1,2
H_2O	3,3
Celkový objem 1 reakce [µl]	6

4.5.2. Kvantitativní reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce

Nasyntetizovaná cDNA byla použita jako templát pro kvantitativní reverzní transkripční polymerázovou řetězovou reakci qRT-PCR. Reakce pro jednotlivé vzorky byly provedeny v dubletech. Pro qRT-PCR byl připraven mix (viz Tab. č. 3), sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v Tab. č. 1. Mix byl rozpipetován po 7 µl do kapilár v chladícím bloku. K mixu byly přidány 3 µl cDNA. Uzavřené kapiláry byly centrifugovány 1 min při 1500 rpm, poté byly umístěny do Light Cycleru, na kterém byl nastaven teplotní a časový průběh reakce pro viz Tab. č. 4.

Následně byla vypočítána relativní kvantifikace z hodnot C_T (cycle threshold), tj. počtu cyklů, při kterém fluorescence vzorku překročila prahovou hodnotu (threshold). Výpočet byl proveden pomocí metody *delta delta* C_T ($\Delta\Delta C_T$). Pro jednotlivé vzorky a kontroly byla vypočítána hodnota ΔC_T odečtením aritmetického průměru C_T pro určitý CYP od aritmetického průměru C_T pro GAPDH (house keeping gen). Pro získání hodnoty $\Delta\Delta C_T$ byla od ΔC_T všech vzorků a kontrol odečtena hodnota ΔC_T negativní kontroly (DMSO). Po dosazení hodnoty $\Delta\Delta C_T$ do vztahu $x = 2^{-\Delta\Delta CT}$, byla získána hodnota x, tj. násobek indukce oproti negativní kontrole (fold induction). Hodnoty relativní kvantifikace

exprese byly statisticky vyhodnoceny studentovým T-testem pomocí programu Microsoft Excel.

Tabulka č. 3: Složení mixu pro qRT-PCR

Složka	Objem pro 1 vzorek [µl]
F + R primery [5µM]	1
Syber Green	2
ddPCR H_2O	4
Celkový objem pro 1 vzorek [µl]	7

Tabulka č. 4: Teplotní a časový průběh qRT-PCR

Proces	Teplota pro CYP / GAPDH	Čas	Počet cyklů pro CYP / GAPDH
aktivace polymerázy	95°C	10 min	1x
denaturace	95°C	10 s	
annealing	65°C / 68°C	7 s	35x / 30x
elongace	72°C	17 s	
analýza teploty tání	-		1x

Poznámka: u CYP2A6 probíhal annealing při 70°C

4.6. Izolace proteinů

Po 48 hodinové kultivaci buněk bylo médium odstraněno a buňky promyty 1x PBS. Do jamek kultivační desky byl přidán 1 ml 1x PBS, buňky byly seškrábány a suspenze byly přeneseny do mikrozkumavek, které byly centrifugovány (4500 rpm, 5 min). Supernatant byl odebrán a k peletě bylo přidáno 150 µl lyzačního pufru RIPA. Následovalo vortexování po dobu 10 minut, centrifugace (13000 rpm, 4 °C, 13 min) a odebrání supernatantu. Koncentrace proteinů v supernatantu byla stanovena metodou Bradfordové.

4.6.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Vyizolované proteiny byly separovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE). Pro separaci byl připraven PA gel složený ze dvou gelů o různém zesíťování: horní gel tzv. zaostřovací se 4% zesíťováním

a spodní gel tzv. dělící s 10% zesíťováním (složení viz Tab. č. 5). Vzorky proteinů byly smíchány s H_2O a s 2x LB v poměru 1:1, aby výsledné množství proteinu ve všech vzorcích stejné. Takto připravené vzorky byly zvortexovány, centrifugovány, inkubovány v termobloku 5 min při 95 °C a zchlazeny. Následně byly vzorky napipetovány do PA gelu, pro odečtení molekulové hmotnosti rozseparovaných proteinů byly přidány 3 µl markeru.

Tabulka č. 5: Složení dělícího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE

Složka	**10% dělící gel**	**4% zaostřovací gel**
	Objem	
H_2O	7,8 ml	3,74 ml
dělící /zaostřovací pufr	4 ml	1,5 ml
akrylamid	4 ml	600 µl
10% SDS	160 µl	60 µl
TEMED	16 µl	6 µl
APS	160 µl	45 µl

Separace v elektroforetické aparatuře naplněné migračním pufrem probíhala v jednom zaostřovacím gelu o tloušťce 1,5 mm při konstantní hodnotě proudu 10 mA přibližně 20 min, kdy došlo k zakoncentrování proteinů do úzkého pruhu v místě rozhranní mezi gely. Následná separace v jednom dělícím gelu probíhala při konstantní hodnotě proudu 20 mA po přibližně 40 min, během ní došlo k rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti.

4.6.2. Western Blot

Metoda western blot slouží k navázání proteinů z gelu na membránu z polyvinylidendifluoridu (PVDF). V prvním kroku byla PVDF membrána (Immobilon®-P Transfer Membranes, Millipore, kat. č. IPVH00010) hydratována v metanolu, promyta v dH_2O a ponořena na 5 min do dH_2O. Dělící gel s proteiny byl umístěn do tzv. sendviče, který byl složen z několika vrstev: houbičky, filtračního papíru, dělícího gelu, PVDF membrány, filtračního papíru a houbičky. Všechny vrstvy byly navlhčeny transferovým pufrem. Připravený sendvič byl umístěn do transferové komory obsahující transferový pufr. Transfer probíhal 90 min při konstantním proudu 300 mA.

Po skončení transferu byla membrána vyjmuta, promyta v dH_2O, obarvena v ponceau S, opět promyta v dH_2O a usušena na filtračním papíře. Obarvením v ponceau S došlo k červenému reverzibilnímu zviditelnění jednotlivých proužků proteinů.

4.6.3. Imunodetekce proteinů

Z PVDF membrány byla vyřezána oblast odpovídající proteinům o molekulové hmotnosti 36 až 73 kDa. Vyříznutý proužek PVDF membrány byl hydratován v metanolu a promyt v dH_2O. Ponceau S bylo odstraněno z PVDF membrány transferovým pufrem. Následně byla PVDF membrána promyta v dH_2O a poté v 1x TBS/Tween. PVDF membrána byla blokována v 5% roztoku sušeného mléka v 1x TBS/Tween po dobu 1 h.

Poté byla na membránu nanesena primární protilátka (Ab) v 5 ml 5% BSA v 1x TBS/Tween v poměru viz Tab. č. 6. Membrána v roztoku primární Ab byla umístěna přes noc na třepačku do lednice.

Druhý den byla membrána třikrát po 15 min promyta v 1x TBS/Tween. Následovalo nanesení sekundární Ab konjugované s křenovou peroxidasou v 5 ml roztoku 2,5% sušeného mléka v 1x TBS/Tween v poměru viz Tab. č. 6. Membrána se sekundární Ab byla inkubována na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 1 h. Opět následovalo promytí membrány třikrát po 15 min v 1x TBS/Tween.

Membrána byla vložena do vyvolávací kazety a rovnoměrně převrstvena 500 µl detekčního substrátu luminolu, který vznikl smícháním složek A a B v poměru 1:1. Takto pokrytá membrána byla inkubována při laboratorní teplotě 3 min, poté byl substrát odstraněn. Signál z membrány byl zachycen na fotografický film (Amersham Hyperfilm™ ECL, Ge Healthcare Limited, kat. č. 28906837) a vyvolán automatem (XR 24 PRO, Dürr).

Tabulka č. 6: Poměr ředění primárních a sekundárních Ab proti jednotlivým CYPům

Detekovaný CYP	Poměr ředění	
	primární Ab	sekundární Ab
1A1	1:500	1:5000
2A6	1:250	1:1000
2B6	1:500	1:5000
2C9	1:500	1:7000
3A4	1:1000	1:2000

5. Výsledky

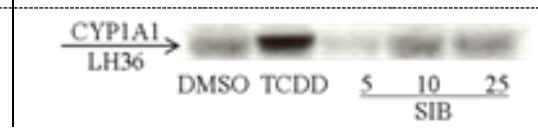
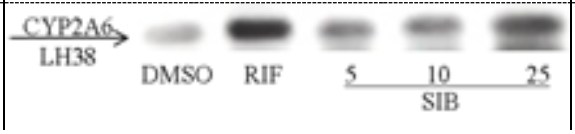
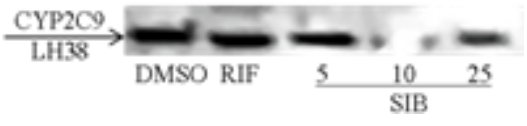
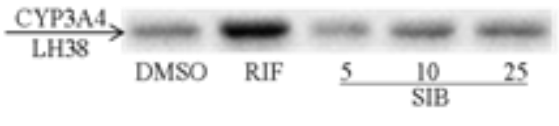
5.1. Vliv sibutraminu na expresi vybraných CYPů v primárních kulturách lidských hepatocytů

Ve třech primárních kulturách lidských hepatocytů (HH2, LH36, LH38) byl zkoumán účinek tří koncentrací SIB (5, 10 a 25 ng/ml) na indukci exprese mRNA šesti genů pro CYPy: 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C9 a 3A4. Zároveň byly detekovány hladiny proteinů těchto CYPů. Protein CYP1A2 nebyl samostatně detekován, protože je pravděpodobné, že kvůli vysoké homologii s proteinem CYP1A1, se protilátka proti CYP1A1 váže i na CYP1A2. Pro srovnání účinku sibutraminu byla exprese genů CYPů indukována působením modelových induktorů 5nM TCDD pro CYP1A1, CYP1A2 a 10 μM RIF pro CYP2A6, 2B6, 2C9 a 3A4. Protože byl testovaný SIB rozpuštěn v DMSO, byly buňky sloužící jako negativní kontrola inkubovány s 0,1% DMSO. Pro izolaci mRNA trvala inkubace hepatocytů s látkami 24 h, zatímco pro izolaci proteinů 48 h.

Metodou qRT-PCR byly získány hodnoty relativní exprese. Hladiny proteinů CYPů byly analyzovány western blotem s následnou imunodetekcí. Správnost dávkování proteinů byla ověřena imunodetekcí aktinu. Hodnoty relativní kvantifikace exprese a western blot analýzy jsou shrnuty v tabulce č. 7.

Z předložených dat v tab. č. 7 je patrné, že sibutramin není významným induktorem vybraných CYPů s výjimkou CYP2A6 v LH38 a CYP2B6 v HH2, kdy v obou případech zvýšená exprese mRNA korelovala se zvýšenou hladinou proteinů. U ostatních vzorků nebyla indukce CYPů zaznamenána, i když u CYP1A1 v LH38 byla exprese mRNA statisticky významně odlišná od negativní kontroly, na úrovni proteinů nebyl tento rozdíl detekován.

Tabulka č. 7: Relativní kvantifikace exprese mRNA vybraných CYPů a jejich western blot analýza v primárních kulturách lidských hepatocytů HH2, LH36 a LH38

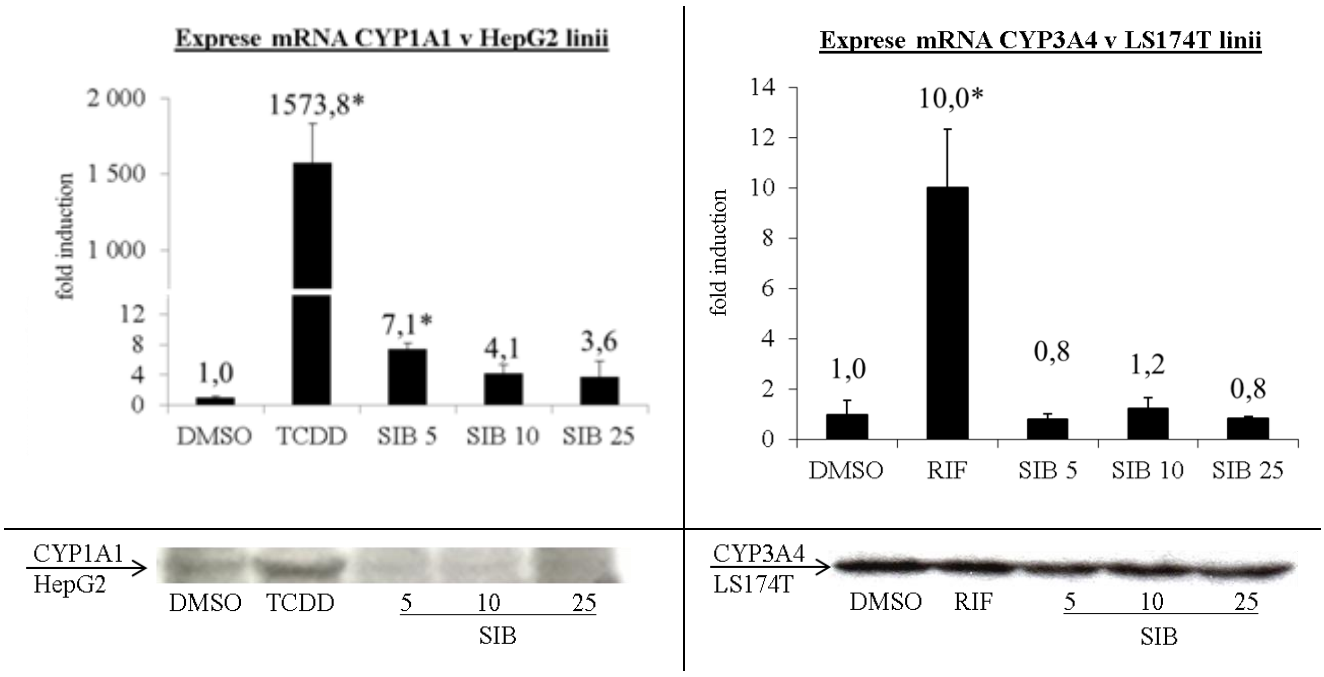
Ošetření	CYP1A1			CYP1A2		
	HH2	**LH36**	**LH38**	**HH2**	**LH36**	**LH38**
DMSO	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TCDD	12,5*	37,7*	27,3*	18,8*	31,0*	1,7
SIB 5	0,4	0,7	1,3	0,8	1,1	0,6
SIB10	0,6	0,5	ND	0,9	1,1	ND
SIB 25	0,5	0,4	1,7*	0,8	0,8	0,9
						
	CYP2A6			**CYP2B6**		
	HH2	**LH36**	**LH38**	**HH2**	**LH36**	**LH38**
DMSO	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
RIF	2,5*	4,3*	3,4*	2,5*	6,4*	0,8
SIB 5	0,7	1,6	0,9	1,1	1,6	0,8
SIB10	0,8	1,7	ND	1,6	1,6	ND
SIB 25	0,6	0,8	2,9*	4,6*	0,6	0,9
						
	CYP2C9			**CYP3A4**		
	HH2	**LH36**	**LH38**	**HH2**	**LH36**	**LH38**
DMSO	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
RIF	3,3*	2,7*	0,8	6,3*	58,5*	7,0*
SIB 5	0,7	1,1	0,6	0,6	0,9	0,9
SIB10	0,7	1,1	ND	0,8	0,9	ND
SIB 25	0,5	0,8	1,0	0,4	0,6	0,9
						

*- statisticky významně odlišný výsledek od negativní kontroly ($p < 0,05$),

ND – není definováno, nepodařilo se vyizolovat dostatečné množství mRNA

5.2. Vliv sibutraminu na expresi vybraných CYPů v nádorových liniích

V HepG2 linii byl zkoumán účinek tří koncentrací SIB (5, 10 a 25 ng/ml) na expresi mRNA a hladinu proteinu CYP1A1, naopak účinek na CYP3A4 byl zkoumán v LS174T linii. Účinek sibutraminu byl srovnán s působením 5nM TCDD na expresi CYP1A1 a 10 μM RIF na CYP3A4. Jako negativní kontrola byly opět použity buňky inkubované s 0,1% DMSO. Pro izolaci mRNA trvala inkubace buněk nádorových linií s látkami 24 h, zatímco pro izolaci proteinů 48 h. Jak hodnoty relativní kvantifikace exprese získané qRT-PCR, tak i analýzy western blot obou nádorových linií shrnuje Obr. č. 4.



Obrázek č. 4: Exprese a hladina proteinů CYP1A1 a CYP3A4 v nádorových liniích

Nalevo je graf ilustrující indukci exprese mRNA CYP1A1 v HepG2 linii a napravo indukci exprese mRNA CYP3A4 v LS174T linii. Příslušné výsledky western blot analýz jsou umístěny pod grafy. Směrodatné odchylky hodnot jsou vypočteny z dubletu měření. *- statisticky významně odlišný výsledek od negativní kontroly ($p < 0,05$). Obdobné výsledky byly získány v dalších dvou nezávislých pokusech.

Na Obr. č. 4 je vidět, že v HepG2 linii došlo ke statisticky významné indukci exprese mRNA CYP1A1 působením SIB o koncentraci 5 ng/ml. Tato signifikance byla potvrzena jen u jednoho ze třech nezávislých opakování a představuje tak spíš experimentální variabilitu než vlastní účinek sibutraminu. Příslušná western blot analýza zvýšení hladiny proteinu CYP1A1 nepotvrdila. V LS174T linii sibutramin neindukoval expresi CYP3A4.

V této linii byly detekovány stejné hladiny proteinů jak u pozitivní kontroly (RIF), tak i u ostatních vzorků.

6. Diskuze

V této práci byla zkoumána schopnost sibutraminu indukovat expresi cytochromů P450 podílejících se na metabolizmu léčiv v primárních kulturách lidských hepatocytů a v lidských nádorových liniích HepG2 a LS174T. Primární kultury lidských hepatocytů poskytují užitečný model pro studium metabolizmu xenobiotik *in vitro*, jelikož buňky mají aktivní veškeré biotransformační dráhy typické pro hepatocyty a navíc odrážejí polymorfismus genů kódující jednotlivé komponenty metabolismu. Primární kultury lidských hepatocytů tedy umožňují testovat vliv nejen sibutraminu, ale také jeho metabolitů. Na druhou stranu buňky lidských nádorových linií mají některé biotransformační procesy potlačeny, ale i přes to jsou dostatečným modelem pro testování indukční schopnosti látek aktivovat expresi genů skrz jaderné receptory.

Z předložených výsledků vyplývá, že SIB není induktorem vybraných CYPů v primárních kulturách lidských hepatocytů, ani v nádorových liniích HepG2 a LS174T. Lze soudit, že tento lék nezpůsobuje mezilékové interakce indukcí enzymů metabolizující xenobiotika. Nicméně ve dvou různých vzorcích hepatocytů byla detekována indukce CYP2A6 a CYP2B6 a to jak na úrovni mRNA, tak i proteinu. Jedním z možných vysvětlení tohoto fenoménu může být genový polymorfismus biotransformačních enzymů, v jehož důsledku je SIB v těchto kulturách odlišně biotransformován. Příkladem může být nedávno popsána alelová varianta CYP2B6*6, jejíž přítomnost asociovala s nižší clearancí sibutraminových metabolitů (Chung *et al.*, 2011). Ať už jako důsledek delší doby expozice či kvalitativní nebo kvantitativní změny obsahu metabolitů, jejich přítomnost může indukovat expresi CYP2B6 a zároveň také CYP2A6, protože exprese těchto CYPů je řízena podobnými mechanismy.

Jestliže SIB může u některých jedinců ovlivňovat expresi CYP2A6 a CYP2B6, pak by měl být zvážen vliv společně užívaných léčiv, jež ovlivňují tyto CYPy. Jako příklad může sloužit protidestičkový lék klopidogrel, který inhibuje katalytickou aktivitu CYP2B6 a zabraňuje tak tvorbě aktivních metabolitů SIB tímto CYPem (Bae *et al.*, 2011).

7. Závěr

V této diplomové práci jsem zkoumala účinek sibutraminu na expresi vybraných cytochromů P450. Jednalo se o CYPy rodin 1-3, jež mají významný podíl na metabolismu xenobiotik. Vliv sibutraminu jsem testovala na dvou odlišných modelech, použila jsem primární kultury lidských hepatocytů a také lidské nádorové linie HepG2 a LS174T.

V primárních kulturách lidských hepatocytů jsem stanovila vliv SIB na expresi mRNA CYPů: 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C9 a 3A4 a také na hladinu jejich proteinů. V HepG2 linii jsem otestovala vliv SIB na expresi mRNA CYP1A1 a na hladinu jeho proteinu, obdobně jsem v LS174T linii zkoumala vliv na CYP3A4. Účinek sibutraminu byl v obou modelech srovnán s účinkem modelových aktivátorů xenobiotických receptorů. Pro transaktivaci exprese CYPů podrodiny 1A aryl uhlovodíkovým receptorem byl použit TCDD, zatímco druhá a třetí rodina CYPů byla transaktivována rifampicinem skrze pregnanový X receptor.

Z předložených výsledků vyplývá, že sibutramin neindukuje expresi CYPů, avšak u některých jedinců může zvyšovat expresi CYP2A6 a CYP2B6. Terapie sibutraminem tak může u některých jedinců ovlivňovat farmakokinetické vlastnosti léčiv, jež jsou užívány společně s tímto lékem a jsou metabolizovány CYP2A6 nebo CYP2B6.

8. Použitá literatura

8.1. Knihy a vědecké články

Abolfathi Z., Couture J., Vallée F., LeBel M., Tanguay M. a Masson E.: A pilot study to evaluate the pharmacokinetics of sibutramine in healthy subjects under fasting and fed conditions. *The Journal of Pharmaceutical Sciences* 7, 345-349, 2004.

Al Koudsi N., Ahluwalia J. S., Lin S. K., Sellers E. M. a Tyndale R. F.: A novel CYP2A6 allele (CYP2A6*35) resulting in an amino-acid substitution (Asn438Tyr) is associated with lower CYP2A6 activity in vivo. *The Pharmacogenomics Journal* 9, 274-282, 2009.

Aoyama T., Yamano S., Guzelian P. S., Gelboin H. V. a Gonzalez F. J.: Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B_1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4790-4793, 1990.

Bae S. K., Cao S., Seo K. A., Kim H., Kim M. J., Shon J. H., Liu K. H., Zhou H. H. a Shin J. G.: Cytochrome P450 2B6 Catalyzes the Formation of Pharmacologically Active Sibutramine (N-{1-[1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]-3-methylbutyl}-N,N-dimethylamine) Metabolites in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 36, 1679–1688, 2008.

Bae J. W., Jang C. G. a Lee S. Y.: Effects of clopidogrel on the pharmacokinetics of sibutramine and its active metabolites. *Journal of Clinical Pharmacology* 51, 1704-1711, 2011.

Baldwin S. J., Bloomer J. C., Smith G. J., Ayrton A. D., Clarke S. E. a Chenery R.J.: Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica* 25, 261–270, 1995.

Bloom S. R., Kuhajda F. P., Laher I., Pi-Sunyer X., Ronnett G., Tan T. M. M. a Weigle D. S.: The Obesity Epidemic – Pharmacological Challenges. *Molecular Interventions* 8, 82-98, 2008.

Božina N. Bradamante V. a Lovrić M.: Genetic Polymorphism of Metabolic Enzymes P450 (CYP) as a Susceptibility Factor for Drug Response, Toxicity, and Cancer Risk. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 60, 217-242, 2009.

Butler M. A., Iwasaki M., Geugerinch F. P. a Kadlubar F. F.: Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 86, 7696-7700, 1989.

Connoley I. P., Liu Y. L., Frost I., Reckless I. P., Heal D. J. a Stock M. J.: Thermogenic effects of sibutramine and its metabolites. *British Journal of Pharmacology* 126, 1487-1495, 1999.

Coutinho W.: The first decade of sibutramine and orlistat: a reappraisal of their expanding roles in the treatment of obesity and associated conditions. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 53, 262-270, 2009.

Denison M. s. a Nagy S. R.: Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43, 309–334, 2003.

Devlin M. J., Yanovski S. Z. a Wilson G. T.: Obesity: What Mental Health Professionals Need to Know. *American Journal of Psychiatry* 157, 854-866, 2000.

Di Y. M., Chow V. D., Yang L. P. a Zhou S.F.: Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6. *Current Drug Metabolism* 10, 754-780, 2009.

Dostálek M., Janoštíková E., Juřica J. a Zahradníková L.: Farmakokinetika. Grada Publishing, Praha, 2006.

Duret C., Daujat-Chavanieu M., Pascussi J. M., Pichard-Garcia L., Balaguer P., Fabre J. M., Vilarem M. J., Maurel P. a Gerbal-Chaloin S.: Ketoconazole and Miconazole Are Antagonists of the Human Glucocorticoid Receptor: Consequences on the Expression and Function of the Constitutive Androstane Receptor and the Pregnane X Receptor. *Molecular Pharmacology* 70, 329–339, 2006.

Dvorak Z., Vrzal R., Henklova P., Jancova P., Anzenbacherova E., Maurel P., Svecova L., Pavek P., Ehrmann J., Havlik R., Bednar P., Lemr K. a Ulrichova J.: JNK inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 75, 580-588, 2008.

El Gendy MA, Soshilov AA, Denison MS, El-Kadi AO.: Transcriptional and posttranslational inhibition of dioxin-mediated induction of CYP1A1 by harmine and harmol. *Toxicology Letters* 208, 51-61, 2012.

Faucette S. R., Wang H., Hamilton G. A., Jolley S. L., Gilbert D., Lindley C., Yan B., Negishi M. a LeCluyse E. L.: Regulation of CYP2B6 in Primary Human Hepatocytes by Prototypical Inducers. *Drug Metabolism and Disposition* 32, 348–358 2004.

Fernandez-Salguero P., Hoffman S. M. G., Cholerton S., Mohrenweiser H., Raunio H., Rautio A., Pelkonen O., Huang J. D., Evans W. E., Idle J. R. a Frank J. Gonzalez F. J.: A Genetic Polymorphism in Coumarin 7-Hydroxylation: Sequence of the Human CYP2A Genes and Identification of Variant CYP2A6 Alleles. *American Journal of Human Genetics* 57, 651-660, 1995.

Finucane M. M., Stevens G. A., Cowan M. J., Danaei G., Lin J. K., Paciorek Ch. J., Singh G. M., Gutierrez H. R., Lu Y., Bahalim A. N., Farzadfar F., Riley L. M. a Ezzati M.: National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health

examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9,1 million participants. *Lancet* 377, 557-567, 2011.

Garfinkel D.: Studies on pig liver microsomes I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. Reprinted from *Archives of Biochemistry and Biophysics* 77, 493–509, 1958. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 409, 7–15, 2003.

Glandt M. a Raz I.: Present and Future: Pharmacologic Treatment of Obesity. *Journal of Obesity* 2011, Article ID 636181, 2011.

Goodwin B., Hodgson E. a Liddle Ch.: The Orphan Human Pregnane X Receptor Mediates the Transcriptional Activation of CYP3A4 by Rifampicin through a Distal Enhancer Module. *Molecular Pharmacology* 56, 1329-1339, 1999.

Hahn M. E., Lenka L. Allan L. L. a Sherr D. H.: Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: Complex interactions involving the AHR repressor. *Biochemical Pharmacology* 77, 485-497, 2009.

Hockley S. L., Arlt V. M., Brewer D., te Poele R., Workman P., Giddings I. a Phillips D. H.: AHR- and DNA-Damage-Mediated Gene Expression Responses Induced by Benzo(a)pyrene in Human Cell Lines. *Chemical Research in Toxicology* 20, 1797–1810, 2007.

Hodgson E.: A Textbook of Modern Toxicology Fourth Edition, *John Wiley & Sons*, New Jersey, 2010.

Champe C. A., Harvey R. A. a Ferrier D. R.: Lippincott´s Illustrated Reviews - Biochemistry 4th edition. Wolters Kluwer; Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2008.

Chapelot D., Marmonier C., Thomas F., Hanotin C.: Modalities of the food intake-reducing effect of sibutramine in humans. *Physiology and Behavior* 68, 299–308, 2000.

Chung J. Y., Jang S. B., Lee Y. J., Park M. S. a Park K.: Effect of CYP2B6 Genotype on the Pharmacokinetics of Sibutramine and Active Metabolites in Healthy Subjects. *Journal of Clinical Pharmacology* 51, 53-59, 2011.

Inoue K., Inazawa J., Nakagawa H., Shimada T., Yamazaki H., Guengerich F. P. a Abe T.: Assignment of the human cytochrome P-450 nifedipine oxidase gene (CYP3A4) to chromosome 7 at band q22.1 by fluorescence in situ hybridization. *The Japanese Journal of Human Genetics* 37, 133-138, 1992.

Ioannides-Demos L. L., Piccenna L. a McNeil J. J.: Pharmacotherapies for Obesity: Past, Current, and Future Therapies. *Journal of Obesity* 2011, Article ID 179674, 2011.

Isom H. C., Secott T., Georgoff I., Woodworth C. a Mummaw J.: Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 3252–3256, 1985.

Itoh M., Nakajima M., Higashi E., Yoshida R., Nagata K., Yamazoe Y. a Yokoi T.: Induction of Human CYP2A6 Is Mediated by the Pregnane X Receptor with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator 1α. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319, 693–702, 2006.

James W. P. T., Caterson I. D., Coutinho W., Finer N., Van Gaal L. F., Maggioni A. P., Torp-Pedersen Ch., Sharma A. M., Shepherd G. M., Rode R. A. a Renz Ch. L.: Effect of Sibutramine on Cardiovascular Outcomes in Overweight and Obese Subjects. *The New England Journal of Medicine* 363, 905-917, 2010.

Kall M. A., Vang O. a Clausen J.: Effects of dietary broccoli on human *in vivo* drug metabolizing enzymes: evaluation of caffeine, oestrone and chlorzoxazone metabolism. *Carcinogenesis* 17, 793-799, 1996.

Kalow W. a Tang B. K.: Caffeine as a metabolic probe: exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 49, 44-48, 1991.

Kliewer S. A., Moore J. T., Wade L., Staudinger J. L., Watson M. A., Jones S. A., McKee D. D., Oliver B. B., Willson T. M., Zetterström R. H., Perlmann T. a Lehmann J. M.: An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a Novel Steroid Signaling Pathway. *Cell* 92, 73-82, 1998.

Kliewer S. A., Goodwin B. a Willson T. M.: The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews* 23, 687–702, 2002.

Klingenberg M.: Pigments of rat liver microsomes. Reprinted from *Archives of Biochemistry and Biophysics* 75, 376–386, 1958. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 409, 2–6, 2003.

Lake B. G., Ball S. E., Renwick A. B., Tredger J. M., Kao J., Beamand J. A. a Price R. J.: Induction of CYP3A isoforms in cultured precision-cut human liver slices. *Xenobiotica* 27, 1165-1173, 1997.

Lean M. E. J.: How does sibutramine work? *International Journal of Obesity* 25, Suppl. 4, S8–S11, 2001.

Lehmann J. M., McKee D. D., Watson M. A., Willson T. M., Moore J. T. a Kliewer S. A.: The Human Orphan Nuclear Receptor PXR Is Activated by Compounds That Regulate CYP3A4 Gene Expression and Cause Drug Interactions. *Journal of Clinical Investigation* 102, 1016-1023, 1998.

Li T. a Chiang J. Y.: Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnane X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4alpha and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug Metabolism and Disposition* 34, 756-764, 2006.

Link M., Hakala K. S., Wsól V., Kostiainen R. a Ketola R. A.: Metabolite profile of sibutramine in human urine: a liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric study. *Journal of Mass Spectrometry* 41, 1171–1178, 2006.

Luque C. A. a Rey J. A.: The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug. *European Journal of Pharmacology* 440, 119– 128, 2002.

Mäenpää J. Juvonen R., Raunio H., Rautio A. a Pelkonen O.: Metabolic Interactions of Methoxsalen and Coumarin in Humans and Mice. *Biochemical Pharmacology* 48, 1363-1369, 1994.

Martin H., Sarsat J. P., de Waziers I., Housset C., Balladur P., Beaune P., Albaladejo V. a Lerche-Langrand C.: Induction of cytochrome P450 2B6 and 3A4 expression by phenobarbital and cyclophosphamide in cultured human liver slices. *Pharmaceutical Research* 20, 557-568, 2003.

Masubuchi Y., Nakano T., Ose A. a Horie T.: Differential selectivity in carbamazepine-induced inactivation of cytochrome P450 enzymes in rat and human liver. *Archives of Toxicology* 75, 538-543, 2001.

McCune J. S., Hawke R. L., LeCluyse E. L., Gillenwater H. H., Hamilton G., Ritchie J., Lindley C.: In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 68, 356-366, 2000.

Mo S. L., Liu Y. H., Duan W., Wei M. Q., Kanwar J. R. a Zhou S. F.: Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6. *Current Drug Metabolism* 10, 730-753, 2009.

Mo S. L., Zhou Z. W., Yang L. P., Wei M. Q. a Zhou S. F.: New Insights into the Structural Features and Functional Relevance of Human Cytochrome P450 2C9. Part I. *Current Drug Metabolism* 10, 1075-1126, 2009.

Moreau A., Maurel P., Vilarem M. J. a Pascussi J. M.: Constitutive androstane receptor–vitamin D receptor crosstalk: Consequence on CYP24 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 76–82, 2007.

Murray I. A., Reen, R. K., Leathery N., Ramadoss P., Bonati L., Gonzalez F. J. Peters J. M. a Perdew G. H.: Evidence that ligand binding is a key determinant of Ah receptor-mediated transcriptional activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 442, 59-71, 2005.

Nakajima M., Yamamoto T., Nunoya K. I., Tsuyoshi Y., Nagashima K. Inoue K. Funae Y., Shimada N., Kamataki T. a Kuroiwa Y.: Role of Human Cytochrome P4502A6 in C-Oxidation of Nicotine. *Drug Metabolism and Disposition* 24, 1212- 1217, 1996.

Nebert D. W., Nelson D. R., Coon M. J., Estabrook R. W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C. a Johnson E. F.: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and Cell Biology* 10, 1-14, 1991.

Omura T. a Sato R.: A New Cytochrome in Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 237, 1375-1376, 1962.

Onica T., Nichols K., Larin M., Ng L., Maslen A., Dvorak Z., Pascussi J. M., Vilarem M. J., Maurel P. a Kirby G. M.: Dexamethasone-Mediated Up-Regulation of Human CYP2A6 Involves the Glucocorticoid Receptor and Increased Binding of Hepatic Nuclear Factor 4 to the Proximal Promoter. *Molecular Pharmacology* 73, 451–460, 2008.

de Onis M., Blössner M. a Borghi E.: Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *American Journal of Clinical Nutrition* 92, 1257-1264, 2010.

Ourlin J. C., Lasserre F., Pineau T., Fabre J. M., Sa-Cunha A., Maurel P., Vilarem M. J. a Pascussi J. M.: The small heterodimer partner interacts with the pregnane X receptor and represses its transcriptional activity. *Molecular Endocrinology* 17, 1693-1703, 2003.

Padwal R., Li S. K. a Lau D. C. W.: Long-term pharmacotherapy for overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Obesity* 27, 1437–1446, 2003.

Pavek P., Cerveny L., Svecova L., Brysch M., Libra A., Vrzal R., Nachtigal P., Staud F., Ulrichova J., Fendrich Z. a Dvorak Z.: Examination of Glucocorticoid Receptor α-Mediated Transcriptional Regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 Genes in Placental Trophoblast Cell Lines. *Placenta* 28, 1004-1011, 2007.

Pávek P. a Dvořák Z.: Xenobiotic-Induced Transcriptional Regulation of Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues. *Current Drug Metabolism* 9, 129-143, 2008.

Pelkonen O., Rautio A., Raunio H. a Pasanen M.: CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 144, 139–147, 2000.

Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J. a Raunio H.: Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology* 82, 667–715, 2008.

Petrulis J. a Perdew G. H.: The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chemico-Biological Interactions* 141, 25–40, 2002.

Pichard-Garcia L., Gerbal-Chaloin S., Ferrini J. B., Fabre J. M. a Maurel P.: Use of long-term cultures of human hepatocytes to study cytochrome P450 gene expression. *Methods in Enzymology* 357, 311-21, 2002.

Rae J. M. Johnson M. D., Lippman M. E. a Flickhart D. A.: Rifampin Is a Selective, Pleiotropic Inducer of Drug Metabolism Genes in Human Hepatocytes: Studies with cDNA and Oligonucleotide Expression Arrays. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299, 849-857, 2001.

Rendic S.: Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews* 34(1-2), 83–448, 2002.

Richter T., Mürdter T. E., Heinkele G., Pleiss J., Tatzel S., Schwab M., Eichelbaum M. a Zanger U. M.: Potent Mechanism-Based Inhibition of Human CYP2B6 by Clopidogrel

and Ticlopidine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308, 189-197, 2004.

Rucker D., Padwal R., Li S. K., Curioni C. a Lau D. C. W.: Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *British Medical Journal* 335, 1194-1199, 2007.

Seliskar M. a Rozman D.: Mammalian cytochromes P450—Importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 458-466, 2007.

Seo K. A., Kim H., Ku H. Y., Ahn H. J., Park S. J., Bae S. K., Shin J. G.. a Liu K. H.: The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. *Chemico-Biological Interactions* 174, 141–146, 2008.

Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y. a Guengerich F. P.: 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270, 414-423, 1994.

Schweikl H., Taylor J. A., Kitareewan S., Linko P., Nagorney D. a Goldstein J. A.: Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver. *Pharmacogenetics* 5, 239-49, 1993.

Staudinger J. L. a Lichti K.: Cell Signaling and Nuclear Receptors: New Opportunities for Molecular Pharmaceuticals in Liver Disease. *Molecular Pharmaceutics* 5, 17-34, 2007.

Takahashi H. a Echizen H.: Pharmacogenetics of Warfarin Elimination and its Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetics* 40, 587-603, 2001.

Watkins R. E., Wisely G. B., Moore L. B., Collins J. L., Lambert M. H., Williams S. P., Willson T. M., Kliewer S. A. a Redinbo M. R.: The Human Nuclear Xenobiotic Receptor PXR: Structural Determinants of Directed Promiscuity. *Science* 292, 2329-2333, 2001.

Yun Ch., Shimada T. a Guengerich F. P.: Purification and Characterization of Human Liver Microsomal Cytochrome-P-450 2A6. *Molecular Pharmacology* 40, 679-685, 1991.

Zhou S. F.: Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. *Current Drug Metabolism* 9, 310-322, 2008.

Zhou S. F., Yang L. P., Wei M. Q., Duan W. a Chan E.: Insights into the Structure, Function, and Regulation of Human Cytochrome P450 1A2. *Current Drug Metabolism* 10, 713-729, 2009.

Zhou S. F., Zhou Z. W., Yang L.P. a Cai J. P.: Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Current Medicinal Chemistry* 16, 480-675, 2009.

8.2. Internetové zdroje

[1] http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/; staženo dne 21. 2. 2012

[2] http://www.vzp.cz/klienti/aktuality/pruzkum-obezity-2011; staženo dne 21. 2. 2012

[3] http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2010/01/news_detail_000985.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1; staženo dne 21. 2. 2012

[4] http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm191652.htm; staženo dne 21. 2. 2012

[5] http://www.mhra.gov.uk/Howweregulate/Medicines/Herbalmedicines/HerbalSafetyNews/Currentsafetyissues/CON094159; staženo dne 4. 3. 2012

[6] Příbalový leták k léku MERIDIA®: http://www.rxabbott.com/pdf/meridia.pdf; staženo dne 4. 3. 2012

[7] http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2008/ucm 116998.htm; staženo dne 4. 3. 2012

[8] http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/Generalsafetyinformationandadvice/Herbal medicines/Herbalsafetyupdates/Allherbalsafetyupdates/CON108766; staženo dne 4. 3. 2012

[9] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/; staženo dne 5. 3. 2012

[10] http://www.cypalleles.ki.se/; staženo dne 19. 1. 2012

[11] http://www.cypalleles.ki.se/cyp2b6.htm; staženo dne 19. 1. 2012

9. Seznam použitých zkratek a symbolů

5-HT	5-hydroxytryptamin
Ab	protilátka
AF	aktivační funkce
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
AhRR	represor aryl uhlovodíkového receptoru
APS	persíran amonný
Arnt	AhR nuclear translocator
bHLH	basic helix-loop-helix
BMI	body mass index, tělesný hmotnostní index
BSA	bovinní sérový albumin
CAR	konstitutivní adrostanový receptor
CCRP	retenční protein konstitutivního adrostanového receptoru
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom P450
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DBD	DNA vazebná doména
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DREs	dioxin odpovědné elementy
F primer	přímý primer
FBS	fetální bovinní sérum
ECACC	The European Collection of Cell Cultures
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
HAT	histon acetyltransferasy
HDAC	histon deacetylasy
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HepG2	lidská hepatokarcinomová linie
HH2	vzorek lidských hepatocytů
Hsp90	heat-shock protein o velikosti 90 kDa
LB	loading pufr

LBD	ligand vazebná domain
LH36/38	vzorky lidských hepatocytů
LS174T	lidská adenokarcinomová linie
M	metabolit sibutraminu
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NES	jaderná exportní sekvence
p23	prostaglandin E syntasa 3
PA	polyakrylamid
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	fosfátový pufr s chloridem sodným
Per	*Drosophila* period clock protein
PVDF	polyvinylidendifluorid
PXR	pregnanový X receptor
PXRRE	odpovědné elementy pregnanového X receptoru
qRT-PCR	kvantitativní reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce
R primer	zpětný primer
RNA pol II	RNA polymeráza II
RIF	rifampicin
RXR	retinoidní X receptor
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SHP	small heterodimer partner
SIB	sibutramin
SIM	drosophila single-minded protein
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SRC-1	koaktivátor steroidního receptoru 1
TAFs	TBP-asociované faktory
TBP	TATA-vazebný protein
TBS	tris pufr
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEMED	*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylethylenediamin
XAP2	X-associated protein 2