

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Lucie Jirásková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv rosuvastatinu na hladinu mRNA
u vybraných potkaních cytochromů P450**

Bakalářská práce

Lucie Jirásková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Mgr. Michal Šiller, Ph.D.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Lucie Jirásková
Název práce	Vliv rosuvastatinu na hladinu mRNA u vybraných potkaních cytochromů P450
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav farmakologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Michal Šiller, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>V současné době patří rosuvastatin mezi nejvíce předepisované hypolipidemika, léčiva, která inhibují syntézu cholesterolu. Rosuvastatin není substrátem cytochromů P450 a proto je považován za relativně bezpečný z hlediska výskytu závažných nežádoucích účinků. Předmětem této bakalářské práce byl možný efekt rosuvastatinu na expresi mRNA u čtyř vybraných potkaních forem cytochromů P450 a to konkrétně na CYP3A1, CYP2E1, CYP2C6 a CYP2C11. V experimentální části bylo prokázáno mírné zvýšení hladiny mRNA CYP2C6 u potkanů kmených vysokocholesterolovou dietou s přídatkem rosuvastatinu, ve srovnání s kontrolní skupinou testovaných zvířat kmených pouze vysokocholesterolovou dietou. Na zbylé formy cytochromů P450 nebyl vliv rosuvastatin prokázán.</p>
Klíčová slova	xenobiotika, cytochromy P450, statiny, rosuvastatin
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification:

Author's first name and Suriname	Lucie Jirásková
Title	Effect of rosuvastatin on the level of mRNA of selected rat cytochromes P450
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Pharmacology , Faculty of Medicine, Palacky University at Olomouc
Supervisor	Mgr. Michal Šiller, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstract	Currently, rosuvastatin is the one of the most prescribed cholesterol lowering agents, drugs that inhibit cholesterol synthesis. Rosuvastatin isn't a substrate of cytochrome P450 and therefore is considered relatively safe in terms of serious adverse effects. The subject of this thesis was the possible effect of rosuvastatin on the expression of mRNA for four selected forms of rat cytochromes P450, specifically the CYP3A1, CYP2E1, CYP2C6 and CYP2C11. The experimental part proved a slight increase of mRNA levels CYP2C6 in rats fed high cholesterol diet with added rosuvastatin, compared with a control group of tested animals fed only high cholesterol diet. The effect of rosuvastatin on the remaining forms of cytochromes P450 hasn't been shown.
Keywords	xenobiotics, cytochromes P450, statins, rosuvastatin
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně s pomocí vedoucího práce a za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....

Lucie Jirásková

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Michalu Šillerovi, Ph.D. za odborné vedení při praktických experimentech i zpracování teoretické části, cenné rady a trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu farmakologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, že mi umožnili vypracovat bakalářskou práci na svém pracovišti.

Souhrn

Hyperlipidémie, spojená v mnoha případech s obezitou, je velmi závažným faktorem zvyšujícím riziko ischemické choroby srdeční, která je nejčastější příčinou mortality dospělé populace. Proto se vědci neustále zabývají výzkumem léčiv, která snižují hladinu plasmatických lipidů v játrech.

Tato bakalářská práce se nejprve stručně zabývá metabolismem xenobiotik, který významně ovlivňuje intenzitu účinku a zároveň dobu působení podaného léčiva.

Následuje kapitola věnovaná cytochromům P450, enzymům hrající nejdůležitější roli v oxidativním metabolismu klinicky používaných léčiv, ale i mnoha dalších látek. Dále je pozornost věnována vybraným zejména potkaním, ale i lidským formám cytochromů P450, které byly dále studovány v experimentální části této práce. Nejdůležitější z cytochromů P450 je CYP3A4. CYP3A4 má velmi širokou substrátovou specifitu a metabolizuje téměř 60 % všech klinicky používaných léčiv.

Další část práce se zabývá farmakologií látek ovlivňujících plasmatické lipoproteiny a to konkrétně látkami inhibující syntézu cholesterolu – statiny. Nejnovějším klinicky používaným syntetickým inhibitorem HMG-CoA reductasy je rosuvastatin. Klinické studie ukazují, že rosuvastatin, ve srovnání s jinými statiny, se méně účastní na lékových interakcích se současně podávanými léky.

V poslední kapitole teoretické části je popsán princip real-time PCR, což je moderní molekulárně-biologická technika umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. PCR je založena na opakujících se cyklech enzymové syntézy nových řetězců pomocí DNA-polymerasy. Výhodou této metody je, že umožňuje sledovat nárůst amplikonů během každého cyklu reakce v tzv. reálném čase.

Cílem experimentální části bylo zjistit, zda má podávání rosuvastatinu experimentálním zvířatům (potkanům) efekt na expresi mRNA u vybraných cytochromů P450 účastnící se metabolismu xenobiotik. Výsledky experimentu poukázaly na to, že při podávání rosuvastatinu došlo k mírnému zvýšení hladiny mRNA u CYP2C6.

Summary

Hyperlipidemia associated in many cases with obesity is a serious risk factor for coronary heart disease, which is the main cause of mortality in the adult population. Therefore, scientists are still interested in a research of drugs lowering blood plasma lipids in the liver.

At the beginning of this bachelor thesis the metabolism of xenobiotics, which significantly affects intensity and duration of the pharmacological effect of the drugs is shortly described.

This part is followed by a chapter describing the role of cytochromes P450 in the metabolism of drugs and many other chemical compounds. A brief information about the most important forms of cytochromes P450, which have been studied in the experimental part of this work, is included in this chapter. The CYP3A4 enzyme is the most important form of cytochromes P450 as it has a broad substrate specificity and is responsible for metabolism of almost 60 % of all clinically used drugs.

In the next chapter, the issue on therapy of dyslipidemia concentrating especially on statins – the drugs inhibiting the synthesis of cholesterol - is broadly discussed. The newest clinically used synthetic inhibitor of HMG-CoA reductase is rosuvastatin. Clinical studies show that rosuvastatin is less involved in drug interactions on the level of drug metabolism by cytochromes P450 with comparison to other statins.

The last chapter of the theoretical section describes the principle of real-time PCR, which is a modern technique of molecular biology which enables rapid, sensitive and reliable detection and quantification of a specific DNA or RNA segments. PCR is based on the repeating of thermal cycles of enzymatic synthesis of new nucleic acid molecules by DNA polymerase. The advantage of this method is the fact that it allows the monitoring of an increasing number of amplicons formed in each PCR cycle in real time.

The aim of the experimental part of this bachelor thesis was to determine whether rosuvastatin had a significant effect on the level of mRNA of several cytochromes P450 after administration to rats. The results have shown that the administration of rosuvastatin to rats has led to weak increase of CYP2C6 mRNA level.

Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámení se s problematikou metabolismu léčiv na úrovni CYP a z něj plynoucích potenciálních lékových interakcí se zaměřením na skupinu hypolipidemik.

Úkolem experimentální části bylo sledování vlivu rosuvastatinu, jednoho z nejpředepisovanějších hypolipidemik, na expresi vybraných potkaních CYP účastníků se metabolismu léčiv.

V rámci vypracování experimentální části jsem měla možnost osvojit si vybrané molekulárně-biologické techniky, čímž byl splněn předpokládaný cíl práce.

Obsah

Úvod	12
------------	----

Teoretická část

1. Metabolismus xenobiotik	13
2. Cytochromy P450 (CYP)	14
2.1 Vybrané formy CYP	17
2.1.1 CYP3A4	17
2.1.2 CYP2E1	19
2.1.3 CYP2C.....	19
2.2 Receptory zprostředkující indukci CYP	20
3. Farmakologie látek ovlivňujících plasmatické lipoproteiny	22
3.1 Plasmatické lipoproteiny.....	22
3.2 Hyperlipidémie (Hyperlipoproteinemie)	23
3.3 Léčiva snižující hladinu lipidů.....	23
3.3.1 Inhibitory HMG-CoA reductasy (statiny)	24
3.3.1.1 Lékové interakce se statiny	27
4. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	27
4.1 Real-Time PCR (qPCR).....	28

Experimentální část

5. Laboratorní materiál a chemikálie.....	30
5.1 Použitý biologický materiál	30
5.2 Chemikálie	30
5.2.1 Kity	31
5.3 Laboratorní pomůcky.....	31
6. Přístrojová technika.....	31
7. Použité metody.....	32

7.1	Izolace RNA	32
7.2	cDNA syntéza	32
7.3	Real-Time PCR.....	33
8.	Výsledky.....	35
8.1	CYP3A1.....	35
8.2	CYP2E1	36
8.3	CYP2C6.....	37
8.4	CYP2C11	38
9.	Diskuze.....	39
10.	Závěr.....	41
11.	Použitá literatura	42
12.	Seznam použitých zkratk.....	46

Úvod

Hypolipidemika patří v dnešní době mezi jedny z nepředepisovanějších léčiv vůbec. Je to dáno především značným výskytem civilizačních chorob, které s sebou dnešní uspěchaná doba přináší. V minulosti byla zaznamenána řada lékových interakcí některých hypolipidemik, vznikajících zejména z důvodů ovlivnění jejich metabolismu na úrovni cytochromů P450 (CYP). Na základě snížené eliminace hypolipidemik z organismu v důsledku inhibice jejich metabolismu CYP současně podaným inhibitorem dané formy CYP (léčivo či jiné xenobiotikum) docházelo k výskytu závažných nežádoucích účinků (myopatie, rhabdomyolýza). Tento fakt přiměl farmaceutické firmy k tomu, aby se zabývaly vývojem nových hypolipidemik s omezeným výskytem závažných nežádoucích účinků. Díky tomu se na trhu objevily v relativně nedávné době další látky s hypolipidemickým účinkem, které se od původních struktur liší v řadě fyzikálně-chemických vlastností. V předchozích letech byl zájem farmakologů zejména soustředěn na to, která hypolipidemika jsou metabolizována CYP a jaká forma CYP je za metabolismu daného hypolipidemika zodpovědná. Bylo zjištěno, že rosuvastatin není substrátem žádného z významných CYP podílejících se na metabolismu léčiv. Naproti tomu například atorvastatin je substrátem CYP3A4, což může vést k nežádoucím účinkům. Ve srovnání se studiem metabolismu hypolipidemik, CYP a případných lékových interakcích vyplývajících z poškozené biotransformace těchto léčiv, nebylo doposud věnováno dosti pozornosti možnému indukčnímu účinku hypolipidemik na významné CYP účastníci se metabolismu léčiv. Rosuvastatin není ve větší míře metabolizován CYP a tak je považován za relativně bezpečný z hlediska výskytu závažných nežádoucích účinků. Bylo proto zajímavé zabývat se studiem jeho možného účinku na expresi některých z významných CYP. Jako experimentální model byli zvoleni samci potkanů s vyvinutým metabolickým syndromem.

Teoretická část

1. Metabolismus xenobiotik

Jedním z prvních kroků ke studiu metabolismu se stal v roce 1828 poznatek Friedricha Woehlera, který syntetizoval močovinu pomocí tepelného rozkladu kyanatanu amonného. Tato syntéza se stala důkazem toho, že veškeré děje v živých organismech jsou výsledkem chemických reakcí.

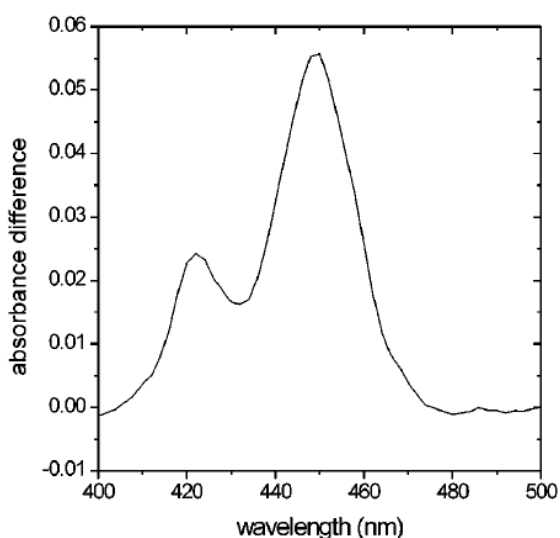
Každý živý organismus se skládá z látek tělu vlastních, ale neustále je nucen se potýkat s přísunem látek z vnějšího prostředí. Takové látky jsou označovány jako látky cizorodé neboli xenobiotika. Mezi xenobiotika patří zejména léčiva, environmentální polutanty, drogy nebo například průmyslové chemikálie.

Hlavním orgánem, ve kterém probíhá metabolismus cizorodých látek neboli také jinými slovy biotransformace, jsou játra. Dnes je již známo, že k přeměně xenobiotik dochází i v mnoha mimojaterních tkáních, mezi které patří ledviny, plíce, placenta či například střeva. Organismus se snaží cizorodé látky z těla vyloučit, především močí a stolicí. Tento děj však není tak jednoduchý, protože většina xenobiotik patří mezi látky nepolární povahy. Aby mohly být cizorodé látky snadněji vylučovány z těla, musí být převedeny na své polární metabolity (metabolismus neboli také biotransformace). Xenobiotika respektive léčiva mají na organismus řadu farmakologických, ale i toxických účinků. Biotransformací dochází ve většině případů k detoxikaci, tedy převedení parentního léčiva na méně toxický metabolit. Rychlost biotransformace tak ovlivňuje intenzitu účinku a zároveň dobu působení podaného léčiva. Někdy však může dojít k tvorbě metabolitů, které jsou více farmakologicky aktivní, případně toxické ve srovnání s parentní látkou. V tomto případě hovoříme o tzv. metabolické aktivaci.

Metabolismus léčiv bývá některými autory členěn do jednotlivých fází. Proces je zahajován *fází 0*, které ve většině případů odpovídá importu xenobiotika do buňky. Následuje *fáze I*. V této fázi dochází k oxidoredukčním a hydrolytickým reakcím. Výsledkem těchto reakcí je odhalení nebo vnesení polární funkční skupiny do molekuly parentní látky (např. -OH, -SH, -COOH). *Fáze II*. je také nazývána *fází konjugační*, protože při ní dochází ke zvýšení polaritě xenobiotik spojením s endogenní silně polární funkční skupinou, jejímž donorem je endogenní látka tzv. konjugační činidlo, například kyselina glukuronová či sírová. Poslední fáze je *fáze III.*, při které je zajištěn export metabolitů z buňky prostřednictvím řady transportérů (Dvořák *et Cvek*, 2011).

2. Cytochromy P450 (CYP)

Cytochromy P450 tvoří nadrodinu hemových (hemoproteinových) enzymů, které nesou hemovou prosthetickou skupinu (pevná integrální součást enzymu) (Lewis *et Ito*, 2008). CYP hrají nejdůležitější roli v oxidativním metabolismu klinicky používaných léčiv nebo jiných xenobiotik, a to zejména ve fázi I. (Martignoni *et al.*, 2006). Název cytochrom P450 vychází z faktu, že redukovaná forma enzymu v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje silné absorpční maximum v UV-VIS spektru při 450 nm, znázorněno na Obr. 1 (Anzenbacher *et Anzenbacherová*, 2001).



Obr. 1: Absorbční maximum v UV-VIS spektru při 450 nm komplexu CYP a CO.
(převzato z Choi *et al.*, 2003)

Fylogeneticky se jedná o velmi starý systém, který během evoluce zaznamenal mnoho změn. Přibližný počet známých CYP je podle GenBank databáze kolem 1200. CYP můžeme nalézt u bakterií, hub, rostlin, živočichů včetně člověka. Počet CYP u bakterií přesahuje 20, u člověka je jich kolem 60 a rostliny mají zhruba 300 různých CYP. Rostliny potřebují své CYP pro syntézu pigmentu, růstových regulátorů a pro syntézu obranných toxinů. Lidské CYP jsou zapojeny také v biosyntéze řady biologicky aktivních látek (Anzenbacher *et Anzenbacherová*, 2001).

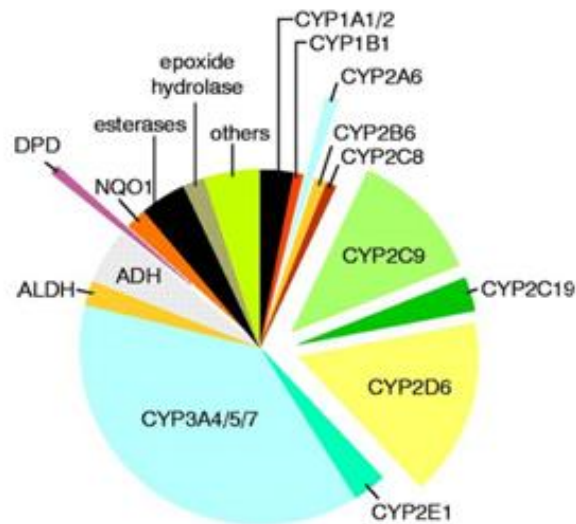
Velký počet objevených genů si vyžádal jednotnou nomenklaturu, založenou na shodě sekvencí aminokyselin v proteinovém řetězci jednotlivých forem. Nadrodina CYP se dělí na rodiny, které mají 40% shodu sekvencí v primární struktuře, podrodiny (55% shoda) a na konkrétní enzymy, které jsou doplněny arabskými číslicemi, které charakterizují různé funkce enzymů. V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 57 genů pro různé formy CYP, které lze zařadit do 18 rodin a 43 podrodin (<http://www.lfhk.cuni.cz>, 31.10.2011). Přehled vybraných forem CYP metabolizujících xenobiotika u člověka a potkana, jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Vybrané formy CYP podílející se na metabolismu xenobiotik u člověka a potkana, které byly sledovány v experimentální části bakalářské práce.

Rodina	Podrodina	Formy CYP u člověka	Formy CYP u potkana
CYP2	C	2C9	2C6 2C11*
	E	2E1	2E1
CYP3	A	3A4 3A5	3A1/3A23 3A2* 3A9* 3A18* 3A62

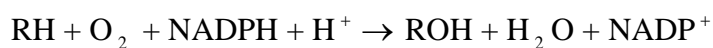
* odlišnost podle pohlaví

Jednotlivé CYP se liší v substrátové a reakční specifitě, v tkáňové a buněčné lokalizaci a ve způsobu regulace. CYP podílející se na metabolismu léčiv a jiných xenobiotik jsou lokalizovány v buňkách v membránách endoplazmatického retikula. Nejvíce se vyskytují v játrech, dále pak méně v dalších tkáních např. v plicích, srdci, mozku a placentě. Kvantitativní zastoupení forem jednotlivých CYP v játrech je zobrazeno na koláčovém grafu na Obr. 2.

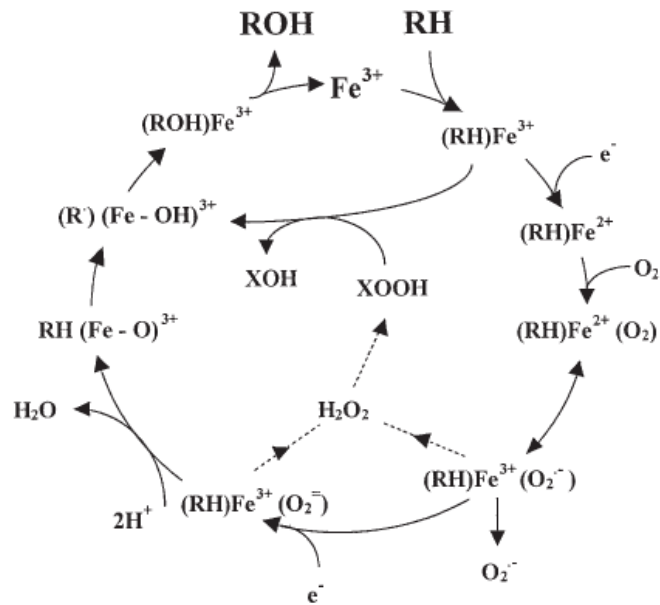


Obr. 2: Kvantitativní zastoupení forem jednotlivých CYP v játrech.
(převzato z Evans *et* Relling, 1999)

CYP jsou tzv. oxidasy se smíšenou funkcí, jinými slovy monooxygenasy. CYP jsou schopny vázat a aktivovat molekulu kyslíku, z níž jeden atom je vnášen do molekuly substrátu a druhý atom tvoří vodu. Proto jsou častým typem reakcí, které CYP katalyzují, hydroxylace. Katalytický cyklus CYP je zobrazen na Obr. 3.



Nově vzniklé metabolity jsou často dále konjugovány s endogenními látkami za vzniku vysoce polárních látek, které jsou zpravidla snadno eliminovány z těla ve stolici nebo v moči. CYP hrají významnou úlohu i v oxidativním metabolismu endogenních molekul, jako jsou vitaminy, žlučové kyseliny a hormony.



Obr. 3: Katalytický cyklus CYP.

(převzato z Anzenbacher *et al.* Anzenbacherová, 2001)

2.1 Vybrané formy CYP

2.1.1 CYP3A4

Nejdůležitější z cytochromů P450 metabolizující léčiva je CYP3A4. Jeho struktura je zobrazena na Obr. 4. Tento enzym se vyskytuje nejvíce v játrech (tvoří až 30 % jaterních CYP) a ve střevě (70 % střevních CYP). CYP3A4 má velmi širokou substrátovou specifitu a metabolizuje téměř 60 % všech klinicky používaných léčiv (<http://www.lfhk.cuni.cz>, 31.10.2011). Tento fakt však může vést ke vzniku nežádoucích lékových interakcí na úrovni metabolismu léčiv, které mohou mít pro člověka v krajních případech i velmi závažné následky. Exprese CYP3A4 může být značně zvýšena prostřednictvím aktivace transkripčních faktorů, některými látkami fungujícími jako induktory. Indukce CYP3A4 je vyvolána především aktivací PXR receptoru (Pregnanový X receptor). Silným induktorem CYP3A je například rifampicin. Velmi studovaným inhibítorem CYP3A u člověka i zvířat je ketoconazol, který interaguje s mnoha substráty CYP3A a může být příčinou řady lékových interakcí.

U potkanů je CYP3A podrodina zastoupena zejména formou CYP3A1, CYP3A9 či CYP3A18. Typické substráty, inhibitory a induktory CYP3A4 jsou uvedeny v Tab. II.

Tab. II: Přehled nejdůležitějších substrátů, inhibitorů a induktorů CYP3A4.

(převzato z <http://www.psychresidentonline.com>, 26.3.2012)

CYP3A4		
substrát	inhibitor	induktor
antiarytmika, triazolové benzodiazepiny, statiny s výjimkou rosuvastatinu a pravastatinu, karbamazepin, kyselina valproová, kodein, buprenorfin, makrolidová antibiotika (erythromycin, klarithromycin), betablokátory, paroxetin, imipramin, sertralin	ketokonazol, itraconazol, fluoxetin, fluvoxamin, diltiazem, verapamil, nefazodon, haloperidol, pimozid, ciprofloxacin, norfloxacin	rifampicin, karbamazepin, ritonavir, modafinil, fenobarbital, fenytoin



Obr. 4: Struktura CYP3A4.

(převzato z Henry, 2004)

2.1.2 CYP2E1

Struktura CYP2E je mezidruhově velmi podobná, například lidský CYP2E1 je s potkaním identický z 80 % (Martignoni *et al.*, 2006). CYP2E1 tvoří přibližně 6 % z celkové hladiny CYP v játrech a účastní se metabolismu přibližně 2% léčiv. Ve fyziologických procesech hraje důležitou roli v detoxifikaci. Je známo, že se tento enzym podílí na biotransformaci jak ethanolu a acetonu, tak i řady jiných nízkomolekulárních látek jako je například chloroform, ethylen dibromid, benzen nebo vinylchlorid. Dále je CYP2E1 zodpovědný za metabolismus nitroaminů, čímž se podílí na vzniku jejich karcinogenních metabolitů. Hladina CYP2E1 je ovlivněna nejen ethanol, acetonem a pyrazolem, ale i patologickým stavem (cukrovka, hladovka). CYP2E1 může být indukován některými komponentami v jídle, např. diallylsulfidem obsaženým v česneku nebo v cibuli. Přehled nejvýznamnějších substrátů, inhibitorů a induktorů je uveden v Tab. III.

Tab. III: Přehled nejdůležitějších substrátů, inhibitorů a induktorů CYP2E1.

(převzato z <http://medicine.iupui.edu>, 26.3.2012)

CYP2E1		
substrát	inhibitor	induktor
enfluran, isofluran, halotan, acetaminofen, chlorzoxazon, teofylin, etanol, N, N-dimethylformamid	diethyldithiokarbamát, disulfiram	ethanol, izoniazid

2.1.3 CYP2C

Podrodina CYP2C u člověka zahrnuje 4 formy: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. CYP2C metabolizují přibližně 16 % klinicky používaných léčiv (Doherty *et Charman*, 2002). CYP2C8 a CYP2C9 představují 95 % veškerých CYP2C u člověka. Zbylé formy CYP18 a CYP19 mají zastoupení pouze 5% z CYP2C a jejich exprese je minoritní (Romkes *et al.*, 1991). CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19 proteiny jsou primárně lokalizovány v játrech, kde tvoří přibližně 20 % všech jaterních CYP (Shimada *et al.*, 1994). CYP2C9

metabolizuje řadu klinicky významných léčiv. Nejvýznamnějším inhibítorem CYP2C9 je sulfafenazol, který se váže na hemovou skupinu CYP2C9. Mezi další významné inhibitory CYP2C9 patří například flukonazol, inhibitory HMG-CoA reduktas a fluvastatin (Transon *et al.*, 1996).

U potkanů jsou nejvýznamnější formy CYP2C6 a CYP2C11, které metabolizují podobné substráty jako lidský CYP2C9 (například diklofenak). Přehled nejvýznamnějších substrátů, inhibitorů a induktorů CYP2C6 je uveden v Tab. IV.

Tab. IV: Přehled nejdůležitějších substrátů, inhibitorů a induktorů CYP2C6.

(převzato <http://medicine.iupui.edu>, 26.3.2012)

CYP2C9		
substrát	inhibitor	induktor
nesteroidní antiflogistika, perorální antidiabetika, sartany, fluvastatin, warfarin,	flukonazol, amiodaron, lovastatin, sulfafenazol, fenofibrat, sertralin	rifampicin

2.2 Receptory zprostředkující indukci CYP

K indukci CYP dochází díky interakci řady xenobiotik s tzv. transkripčním faktorem, jejímž výsledkem je zvyšování hladiny mRNA a následná syntéza proteinů daného enzymu. Transkripční aktivace je zprostředkována především intracelulárními receptory. Mezi tyto intracelulární receptory patří, PXR receptor (Pregnane X Receptor), CAR receptor (Constitutive Androstane Receptor), AhR receptor (Aryl Hydrocarbon Receptor) a PPAR α receptor (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha).

Pregnanový X receptor (PXR) je jaderný ligandem-aktivovaný transkripční faktor, který je aktivován strukturálně odlišnými sloučeninami a slouží jako xenosenzor steroidů a xenobiotik (Chang *et Waxman*, 2005). U lidí je tento receptor exprimován převážně v játrech, ledvinách a v tenkém střevě, kde reguluje transkripci velkého souboru genů. PXR má také významnou úlohu jako regulátor metabolismu lipidů, sacharidů, cholesterolu, žlučových kyselin a vitamínu D. Transkripčně aktivní forma PXR je heterodimer PXR-RXR, kde RXR je

receptor pro kyselinu *cis*-retinovou (Retinoid X Receptor). Mezi ligandy PXR receptoru patří řada klinicky používaných léčiv, jako je například rifampicin. Cílovým genem PXR receptoru je gen pro CYP3A4. U potkanů je ligandem pro PXR například dexamethason, který indukuje CYP2B.

Dalším receptorem zprostředkujícím indukci některých CYP je AhR. AhR receptor se vyskytuje především v cytoplazmě jater, placenty, a srdce. Mezi jeho hlavní ligandy patří organické sloučeniny, jako jsou polyaromatické uhlovodíky, dioxiny a polychlorované bifenyly (Dvořák *et Cvek*, 2011). Po vazbě ligandu na AhR dochází ke konformační změně receptoru a ten se následně translokuje do jádra. Zde tvoří heterodimer AhR-ARNT (AhR jaderný translokátor), který se váže na specifické DNA elementy – DRE (Dioxin-Responsive Elements) nebo XRE (Xenobiotic-Responsive Elements). Následuje transkripce příslušného úseku DNA (Kawajiri *et Fujuu* – Kuriyama, 2007). AhR zprostředkovává především indukci CYP1A1 a 1A2 (Roberts *et al.*, 2000).

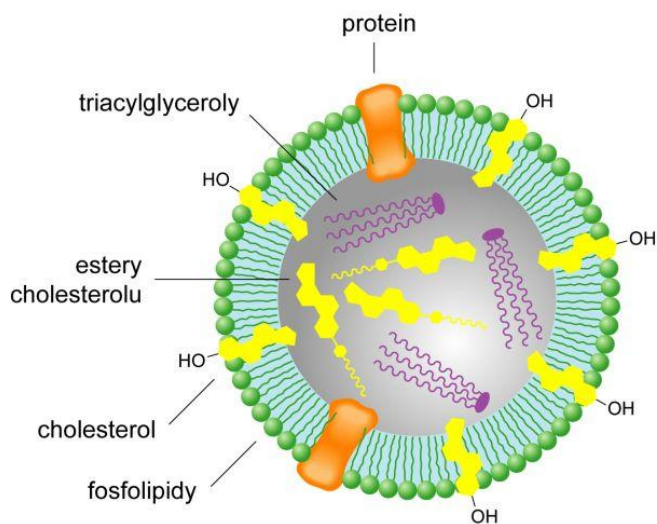
CAR receptor, neboli NR1I3 je lokalizován v cytosolu jater a ledvin. Transkripčně aktivní forma CAR je CAR-RXR, tento heterodimer se váže na příslušné úseky DNA. Mechanismus aktivace CAR není ještě zcela známý (Dvořák *et Cvek*, 2011). CAR zprostředkovává indukci zejména CYP2C9 a CYP3A4.

PPAR α , nazývaný také NR1C1 je ligandem-aktivovaný transkripční faktor. Mezi tyto ligandy patří hypolipidemické fibráty léčiv (gemfibrozil, klofibrát a fenofibrát), které jsou klinicky používané k léčbě hyperlipidémie. Dalšími ligandy mohou být přírodní komponenty, zejména mastné kyseliny a jejich deriváty, jako například eikosanoidy. PPAR α jsou tedy exprimovány především v tkáních, kde dochází ke katabolismu mastných kyselin. Transkripčně aktivní forma PPAR α tvoří heterodimer s RXR γ , který se významně podílí na metabolismu lipidů v játrech a v β -oxidaci mastných kyselin. PPAR α -RXR γ se váže na specifické PPRE (Peroxisome Proliferator Response Elements) nacházející se v promotorové oblasti cílových genů. PPAR α kontroluje genovou expresi různých CYP hlodavců i lidí a reguluje metabolismus celé řady endogenních látek, ale i xenobiotik (Barbier *et al.*, 2004).

3. Farmakologie látek ovlivňujících plasmatické lipoproteiny

3.1 Plasmatické lipoproteiny

Lipidy (cholesterol a triacylglycerol) musí být transportovány vodným prostředím, tedy v krevní plasmě a lymfě, ve formě lipoproteinů. Lipoproteiny jsou složeny z nepolárního lipidového jádra obsahujícího cholesterylestery a triacylglyceroly. Na povrchu sférické částice se nachází vrstva tvořená apoproteiny, fosfolipidy a neesterifikovaným cholesterolem (Škottová *et* Večeřa, 2004). Struktura lipoproteinu je znázorněna na Obr. 5. Podle své hustoty lipoproteiny dělíme do čtyř tříd: chylomikrony, VLDL (Very Low Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins) a HDL (High Density Lipoproteins).



Obr. 5: Struktura krevního lipoproteinů.

(převzato z <http://vydavatelstvi.vscht.cz>, 9.2.2012)

Lipoproteiny mají funkci v uvolňování volných mastných kyselin pro svaly a tukovou tkáň, kde slouží jako zdroj energie a jsou stárány jako triacylglyceroly. Lipoproteiny také zasahují do přenosu cholesterolu ze střeva do jater, z jater do ostatních tkání a z ostatních tkání zpět do jater (<http://www.medicabaze.cz>, 7.2.2012).

3.2 Hyperlipidémie (Hyperlipoproteinemie)

Hyperlipidémie (HLP) je způsobena zvýšenou hladinou lipidů, tedy cholesterolu a triacylglycerolů. Na vzniku hyperlipidémie se podílí jak faktory genetické (primární hyperlipidémie), tak faktory vnějšího prostředí (sekundární hyperlipidémie), především životní styl konkrétního jedince. Zvýšené sérové koncentrace LDL-cholesterolu jsou spojeny se zvýšeným ukládáním cholesterolu ve stěnách cév, což způsobuje aterosklerózu (Obr. 6), zvláště pokud je současně snížena koncentrace HDL (Lüllman *et al.*, 2001).

HPL spolu s dalšími poruchami, jako je například rezistence k insulinu, snížená hladina HDL-cholesterolu, hypertenze nebo obezita, zvyšuje riziko ischemické choroby srdeční, která je nejčastější příčinou závažné morbiditativy i mortality dospělé populace (<http://www.svl.cz>, 27.10. 2011).



Obr. 6: Ateroskleróza - postupné vytváření aterosklerotického plátu, který na obrázku vpravo zaujímá přes polovinu průsvitu cévy.

(převzato z <http://inovace.cz>, 9.2.2012)

3.3 Léčiva snižující hladinu lipidů

K léčbě hyperlipidémie jsou klinicky používána léčiva s různým mechanismem účinku. Tato léčiva se nazývají hypolipidemika a jejich společnou funkcí je snížení hladiny lipidů. Léčiva snižující hladinu plasmatického cholesterolu se nazývají hypocholesterolemika a léčiva snižující především hladinu plasmatického triacylglycerolu jsou hypotriglyceridemika. Hypolipidemika jsou užívána především u primárních hyperlipidemií. U sekundárních hyperlipidemií se nejdříve musí dosáhnout snížení koncentrace lipoproteinů dietou (Lüllman *et al.*, 2001).

Princip působení hypolipidemik spočívá ve snížení obsahu cholesterolu v játrech na základě inhibice absorpce žlučových kyselin (cholestyramin, kolestipol) nebo inhibice absorpce cholesterolu v tenkém střevě (ezetimib) či aktivace receptorů PPAR α vedoucí ve výsledku k nárůstu HDL-cholesterolu (cholesterolový transport z tkání do jater) a k poklesu triacylglycerolů (fenofibráty) nebo inhibici aktivity HMG-CoA reductasy (statiny) (Škottová *et* Večeřa, 2004; <http://www.medicabaze.cz>, 26.3.2012). Přehled hypercholesterolemik a jejich žádoucí i nežádoucí účinky jsou uvedeny v Tab. V.

Tab. V: Léčiva snižující hladinu plasmatického cholesterolu.

(převzato ze Škottová *et* Večeřa, 2004)

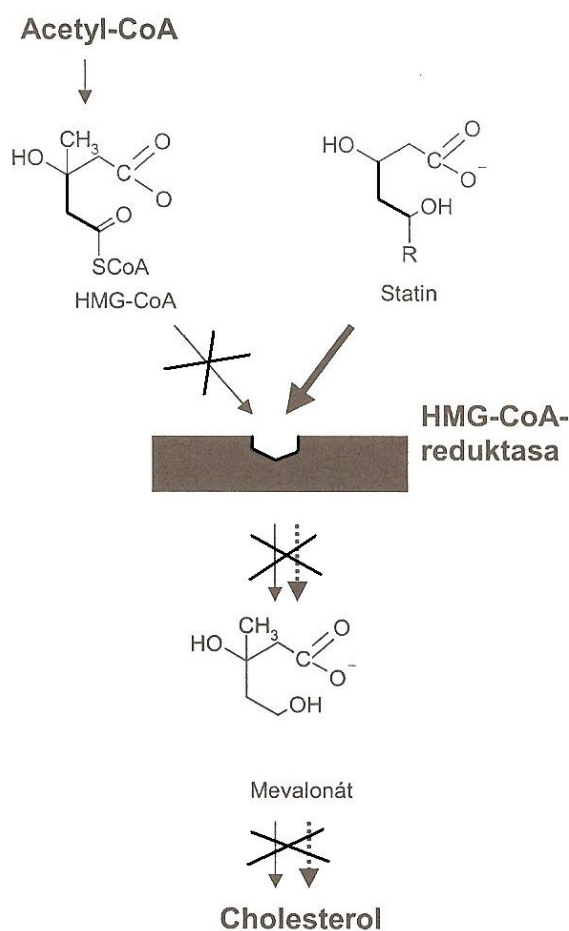
Skupina	Látka	Účinky	Vedlejší účinky	Kontraindikace
Inhibitory absorpce žlučové kyseliny	cholestyramin kolestipol	LDL ↓ HDL ↑ TAG ↔ nebo ↑	Konstipace, ↓ absorpce léčiv	HPL III ↑ TAG
Inhibitory absorpce cholesterolu	ezetimib	LDL ↓ HDL ↑ TAG ↓	Bolesti hlavy, břicha Průjem	Jaterní choroby
Inhibitory HMG-CoA reductasy (statiny)	atorvastatin fluvastatin lovastatin pravastatin pitavastatin rosuvastatin simvastatin	LDL ↓ HDL ↑ TAG ↓	Myopatie, ↑ jaterních enzymů	Jaterní choroby

3.3.1 Inhibitory HMG-CoA reductasy (statiny)

Statiny jsou látky, které zasahují na úrovni endogenní syntézy cholesterolu. Jedná se o inhibitory klíčového enzymu pro syntézu cholesterolu, blokují přeměnu HMG-CoA (hydroxymethylglutaryl-coenzym A) na mevalonát. Statiny představují primární formu terapie pro pacienty s poruchou metabolismu lipidů, při kterém může docházet k výskytu infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhodě. Statiny snižují hladinu celkového

plasmatického cholesterolu o 17 – 29 %, což má za následek snížení LDL cholesterolu o 24 – 61 %. Naopak statiny zvyšují hladinu HDL cholesterolu o 10 % (Evans *et* Rees, 2002). Ukazuje se, že statiny mají významné účinky na mechanismy a procesy zapojené v ateroskleróze, ischemické cévní mozkové příhodě, demenci, osteoporóze nebo diabetes mellitus (Górecká *et al.*, 2004).

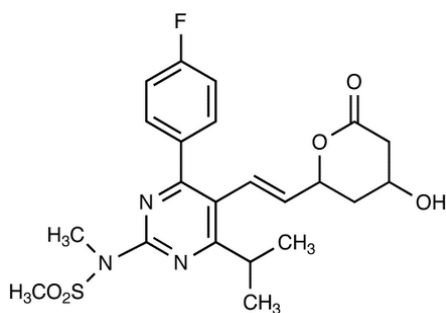
Mechanismus účinku statinů je založen na kompetici s HMG-CoA o vazbu na aktivní místo HMG-CoA reductasy. Statiny se naváží na enzym podobnou částí molekuly jako má HMG-CoA a tím zabrání jeho navázání do aktivního místa enzymu. Dochází k blokaci tvorby mevalonátu a následně k inhibici syntézy cholesterolu (Obr. 7) (Škottová *et* Večeřa, 2004).



Obr. 7: Mechanismus inhibice syntézy cholesterolu statiny.
(upraveno dle Škottová *et* Večeřa, 2004)

V současné době je k léčbě a prevenci aterosklerotických onemocnění klinicky využíváno 7 forem statinů - simvastatin, lovastatin, atorvastatin, fluvastatin, pravastatin, rosuvastatin a pitavastatin. Mezi statiny byl řazen také cerivastatin, který byl příčinou mnoha případů rhabdomyolýzy převážně v kombinované léčbě s gemfibrozilem a proto byl v roce 2001 stažen ze světového trhu (Staffa *et al.*, 2002).

Nejnovějším klinicky používaným syntetickým inhibitorem HMG-CoA reductasy je rosuvastatin (Obr. 8). Na českém trhu se objevil v roce 2008. Rosuvastatin podobně jako další hydrofilní statiny (např. pravastatin, pitavastatin) pomalu pasivně difunduje přes buněčné stěny, což zvyšuje jeho cílený účinek na hepatocyty (Neuvonen *et al.*, 2006). Klinické studie ukazují, že rosuvastatin je tolerován při monoterapii i při kombinované léčbě (Cheng, 2004). Ze všech statinů má rosuvastatin nejvyšší účinnost na snižování koncentrací celkového a LDL cholesterolu.



Obr. 8: Stuktura laktonové formy rosuvastatinu.

(převzato z <http://www.medicalisotopes.com>, 5.3.2012)

Některé lipofilní statiny, mezi které patří především simvastatin, atorvastatin a lovastatin jsou metabolizovány CYP, avšak hydrofilní statiny (pravastatin, rosuvastatin a pitavastatin) nepodléhají prakticky vůbec metabolismu prostřednictvím CYP a jsou vylučovány močí a stolicí téměř v nezměněné podobě (Schachter, 2005). V metabolismu lipofilních statinů jako je lovastatin, simvastatin a atorvastatin je zapojen především CYP3A4, který oxiduje laktonové formy statinů ve střevní stěně a játrech na různé metabolity (Prueksaritanont *et al.*, 1997). Bylo zjištěno, že zhruba 10 % rosuvastatinu je metabolizováno CYP2C9 (Neuvonen *et al.*, 2006), avšak tento krok je klinicky spíše nevýznamný.

3.3.1.1 Lékové interakce se statiny

Na základě mnoha klinických testů je prokázána bezpečnost a velká tolerance statinů z hlediska lékových interakcí. V některých případech však může dojít k nežádoucím účinkům, mezi které patří například gastrointestinální potíže, kožní projevy, závratě nebo trombocytopenie. Nepřesné dávkování statinů, které způsobuje vysokou koncentraci těchto léčiv v periferní krvi a svalových buňkách nebo nesprávná kombinovaná léčba má za následek mnohem závažnější důsledek – myotoxicitu, která se vyskytuje v rozsahu od mírné myopatie až po závažnou rhabdomyolýzu (Neuvonen *et al.*, 2006). Jedná se o onemocnění se svalovými symptomy a nárůstem hladiny kreatin kinasy. Ke klinicky významnějším lékovým interakcím patří především ty, které jsou zprostředkované inhibitory CYP (Neuvonen, 2010). K lékovým interakcím, které vedou ke vzniku svalové toxicity, dochází především při kombinovaném užívání simvastatinu, lovastatinu nebo atorvastatinu s inhibitory CYP3A4, jako je například ritonavir, erytromycin, itraconazol a ketokonazol. Rosuvastatin patří mezi polární statiny, není tedy metabolizován CYP3A4, tudíž jeho používání v klinické praxi není spojeno s výskytem závažných lékových interakcí.

4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Zavedení polymerázové řetězové reakce v roce 1985 znamenal především pro molekulární biology obrovský přínos. PCR je moderní technika umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. Výhodou této metody je získání specifické sekvence DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech. PCR je založena na opakujících se cyklech enzymové syntézy nových řetězců pomocí DNA-polymerasy. Úsek nukleotidové sekvence, který chceme syntetizovat je ohraničen připojením dvou specifických primerů. Tyto primery nasedají na řetězec DNA, tak aby jejich 3' konce směřovaly proti sobě. Následuje přidání DNA-polymerasy (př. *Taq* DNA-polymerasa) a nukleotidů, čímž zahájíme syntézu nových vláken na templátových řetězcích (Šmarda *et al.*, 2008). V každém cyklu dochází v ideálním případě ke zdvojení amplifikované sekvence, jejíž množství tak exponenciálně roste (<http://www.generi-biotech.com>, 11.3.2012).

Během PCR se pravidelně střídají 3 kroky:

- denaturace dvouřetězcových molekul DNA při teplotě 94 – 97 °C
- připojení primerů k odděleným řetězcům DNA při teplotě 30 – 65 °C
- syntéza nových vláken DNA pomocí DNA-polymerasy při teplotě 65 – 75°C

Reakce PCR probíhá v tzv. termocykléru, v němž se teplota mění automaticky v přesných časových intervalech. Výsledkem PCR je mnohonásobně zmnožený cílový úsek DNA. Zmnožené úseky DNA též nazývané amplikony o velikosti desítek až tisíců bp jsou prokázány pomocí elektroforézy v agarózovém popřípadě polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (Šmarda *et al.*, 2008).

4.1 Real-Time PCR (qPCR)

Metoda real-time PCR je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že umožňuje sledovat nárůst amplikonů během každého cyklu reakce v tzv. reálném čase. U klasické PCR detekujeme pomocí elektroforézy až konečný produkt. Real-time PCR se provádí s pomocí speciálních termocyklerů, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR. Výhoda této metody také spočívá v tom, že umožňuje přesné stanovení výchozího počtu kopií templátové sekvence DNA, tedy je schopna kvantifikace (<http://www.generi-biotech.com>, 12.3.2012). Množství qPCR produktu se detekuje během každého cyklu na základě fluorescenčního signálu excitovaného z místa navázané fluorescenční sondy nebo barviva na syntetizovanou DNA.

Fluorescenční substráty lze dělit do dvou skupin:

- **nespecifické** – interkalační barviva vážící se nespecificky na dvouvláknovou DNA, příklad SYBR Green
- **specifické** – fluorescenčně značené sondy (próby) vážící se na střední část amplifikovaného produktu, příklad TaqMan

Dvojitě fluorescenčně značené sondy obsahují kromě fluoroforu také zhášec, který přijímá energii z fluoroforu ve formě světla a způsobuje její rozptýlení buď ve formě světla s vyšší vlnovou délkou, nebo tepla. Pro kvantitativní detekci produktu qPCR lze také použít fluorescenčně značené primery (Šmarda *et al.*, 2008).

Produkty z qPCR je možné kvantifikovat buď relativně, porovnáváním s jinou skupinou vzorků například s kontrolními vzorky, nebo absolutně z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známé koncentraci. Při hodnocení platí, čím vyšší koncentrace DNA (RNA) v testovaném vzorku, tím rychleji přibývá fluorescence (<http://www.lfhk.cuni.cz>, 12.3.2012).

qPCR má velice široké využití, například v detailním studiu genové exprese, diagnostice některých patogenů, dále je tato kvantitativní metoda užívána v klinické diagnostice pro genotypizační analýzu bodových mutací, delecí nebo chromosomových aberací (Šmarda *et al.*, 2008).

Experimentální část

5. Laboratorní materiál a chemikálie

5.1 Použitý biologický materiál

Všechny experimenty na zvířatech byly schváleny etickou komisí MŠMT ČR.

Samci hereditárně hypertriglyceridemických (HHTg) potkanů (230-280 g, sedm potkanů v každé skupině) byli krmeni *ad libitum* vysokocholesterolovou dietou (VCHD) a VCHD + 0,03% rosuvastatinu. Zvířata dostávala tyto diety 21 dní, po 12 hodinovém lačnění byli potkani uvedeni do celkové anestezie intramuskulární injekcí fentanylu ($40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), dexmedetomidinu ($200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a diazepamu ($5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Játra byla odebrána a promyta v ledové sacharóze (sacharóza 42,79 g, EDTA 0,186 g, neionizovaná voda do 500 ml, pH 7,4, připraveno čerstvé den předem), zvážena, 30 mg odebráno do RNA lateru na PCR stanovení a vzorky byly uloženy při -20°C .

(podle experimentu Klimeš *et al.*, 1995)

5.2 Chemikálie

- cholesterol na přípravu experimentálních diet (Sigma Aldrich, USA)
- rosuvastatin pro experimenty (Crestor tbl. 40 mg, Astra Zeneca, UK)
- ethanol 96 %, Ph. Eur. 5, ČL 2005 (Lachner, ČR)
- RNasa-Free Water (QIAGEN, Německo)
- Nuclease-Free water (QIAGEN, Německo)
- RNA later (RNA Stabilization Reagent) (QIAGEN, Německo)
- Fentanyl Torrex inj. (fentanyl) (Torrex Chiesi Pharma GmmH, Rakousko)
- Dexdomitor inj. (dexmedetomidin) (Orion Corporation, Finsko)
- Apaurin inj. (diazepam) (Krka d. d., Slovinsko)

5.2.1 Kity

- RNasy[®] Plus Mini Kit (QIAGEN, Německo)
- QIAshredder[™] (QIAGEN, Německo)
- LightCycler[®] 480 Probes Master Roche, Francie)
- LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche Francie)
- Transcriptor Hight Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Francie)

5.3 **Laboratorní pomůcky**

- automatické pipety o objemu: 0,1 – 2,5 µl; 0,5 – 10 µl; 2 -20 µl; 10 – 100 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- PCR destičky (96 jamek) (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- qPCR destičky (96 jamek) (Roche, Francie)
- pipetovací špičky s duálním filtrem (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- čisté a sterilní PCR pipetovací špičky (Eppendorf, Hamburg, Německo)

6. **Přístrojová technika**

- homogenizátor DIAx 900 (Heidolph, Německo)
- centrifuga 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- PCR box DNA/RNA UV CLEANER, UVC/T (BioTech, Praha, Česká republika)
- Flow Box SCS – I (MERCY, Brno, Česká republika)
- Spektrofotometr Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Praha, Česká Republika)
- Mastercycler eppgradient S (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- analytické váhy GR-202 (Schoeller Instruments (Praha, Česká republika)
- termocyklér LightCycler 480 II (Roche, Francie)

7. Použité metody

7.1 Izolace RNA

Potkaním samcům se speciální vysokocholesterolovou dietou a dietou obohacenou o rosuvastatin byly chirurgicky odebrány jaterní alikvoty. Odebrané alikvoty potkaních jater byly uchovány RNA later při -20 °C. Jaterní tkáň byla homogenizována pomocí homogenizátoru DIAX 900 a následně použita k izolaci celkové RNA. Izolace celkové RNA byla prováděna pomocí kitu RNasy[®] Plus Mini Kit a QIAshredder[™] od firmy QIAGEN. Koncentrace a čistota vyizolované RNA byla stanovena pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000. Zjištěné koncentrace RNA z jednotlivých alikvotů jsou uvedeny v tabulce Tab. VI.

Tab. VI: Koncentrace a čistota jednotlivých jaterních alikvotů stanovená pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000.

Sample ID	UserID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	
HCD	1	Default	6.5.2011	10:29	2422,73	60,568	29,436	2,06	2,16
	2	Default	6.5.2011	10:29	2481,11	62,028	30,022	2,07	2,14
	3	Default	6.5.2011	10:30	2812,81	70,32	34,137	2,06	2,07
	4	Default	6.5.2011	10:30	3080,83	77,021	38,194	2,02	2,07
	5	Default	6.5.2011	10:31	1721,9	43,048	20,697	2,08	2,22
	6	Default	6.5.2011	10:31	3361,64	84,041	43,12	1,95	1,99
	7	Default	6.5.2011	10:32	2464,3	61,607	29,769	2,07	1,99
HCD+0,03%	8	Default	5.5.2011	11:45	2774,86	69,371	33,781	2,05	1,99
	9	Default	5.5.2011	11:46	1753,8	43,845	20,72	2,12	1,5
	10	Default	5.5.2011	11:46	2841,72	71,043	34,17	2,08	1,74
	11	Default	5.5.2011	11:47	2447,76	61,194	29,154	2,1	1,99
	12	Default	5.5.2011	11:47	2380,22	59,505	28,411	2,09	1,63
	13	Default	5.5.2011	11:48	2271,7	56,792	27,054	2,1	1,83
	14	Default	5.5.2011	11:48	2473,31	61,833	29,917	2,07	1,83

7.2 cDNA syntéza

Do reakce k cDNA syntéze bylo použito na základě optimalizace metody množství 1 µg vyizolované celkové RNA. Pro cDNA syntézu byly dále použity random hexamer primery a Transcriptor Hight Fidelity cDNA Synthesis Kit od firmy QIAGEN.

7.3 Real-Time PCR

qPCR experimenty byly provedeny pomocí kitů LightCycler[®] 480 Probes Master, LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master od firmy Roche. qPCR reakce byla provedena buď pomocí Sybr green techniky nebo pomocí hydrolytických sond. Pro zjištění kontaminace vyizolované RNA genomovou DNA byly připraveny tzv. non-template kontroly. V případě experimentů využívajících SYBR Green, byla koncentrace primerů 0,5 μM. V případě experimentů s hydrolytickou sondou byly koncentrace primerů 0,5 μM a koncentrace sondy 0,1 μM v reakční směsi.

V rámci qPCR experimentu byly stanovovány hladiny mRNA u CYP2E1, CYP3A1, CYP2C6 a CYP2C11. Hladina mRNA CYP2E1 byla stanovována pomocí sondy. Každý vzorek byl napipetován do 96 jamkové PCR destičky v triplikátu (Tab. VII).

Pro zjištění změny hladiny mRNA u jednotlivých potkanů byla použita metoda relativní kvantifikace pomocí referenčního genu hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasy (HPRT) s použitím komparativní $\Delta\Delta C_t$ metody. V qPCR experimentu byly použity tyto primery:

HPRT pro Sybr green experiment

Fw 5'-GAAGAGCTACTGTAATGACCAGTC-3'

Rev 5'-CGTTCTTTCCAGTTAAAGTTGAGAGA-3'

HPRT pro experiment se sondou

Fw 5'-CTCCTCAGACCGCTTTTCC-3'

Rev 5'-TCATAACCTGGTTCATCATCACTAA-3'

CYP3A1 Fw 5'-GTGCTCCTCTACGGATTTGGGA-3'

Rev 5'-TCCACATCGAATTTCCATAAACCC-3'

CYP2E1 Fw 5'-CCACCAGCACAACTCTGAGATA-3'

Rev 5'-CCCAATAACCCTGTCAATTTCT-3'

CYP2C11 Fw 5'-TGAGGAAGAGCAAAGGTGCCCT-3'

Rev 5'-ATTGCAGACCTGTAGCCATGGGGA-3'

CYP2C6 Fw 5'-GCCTTGTGGAGGAACTGAGG-3'

Rev 5'-GCACAGCCCAGGATAAACGT-3'

Próby pro dané experimenty byly vybrány pomocí softwaru firmy Roche (<https://www.roche-applied-science.com>). Pro detekci hladiny mRNA byla vybrána próba č. 92 a próba č. 95 pro referenční gen HPRT.

Tab. VII: Návrh 96 jamkové PCR destičky s jednotlivými vzorky v triplikátech

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	13	14										
E	13	14										
F	13	14										
G	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O									
H	nRT	nRT	nRT									

vzorek 1 - 7: jednotlivé vzorky od potkanů s vysokocholesterolovou dietou (VCHD) v triplikátu

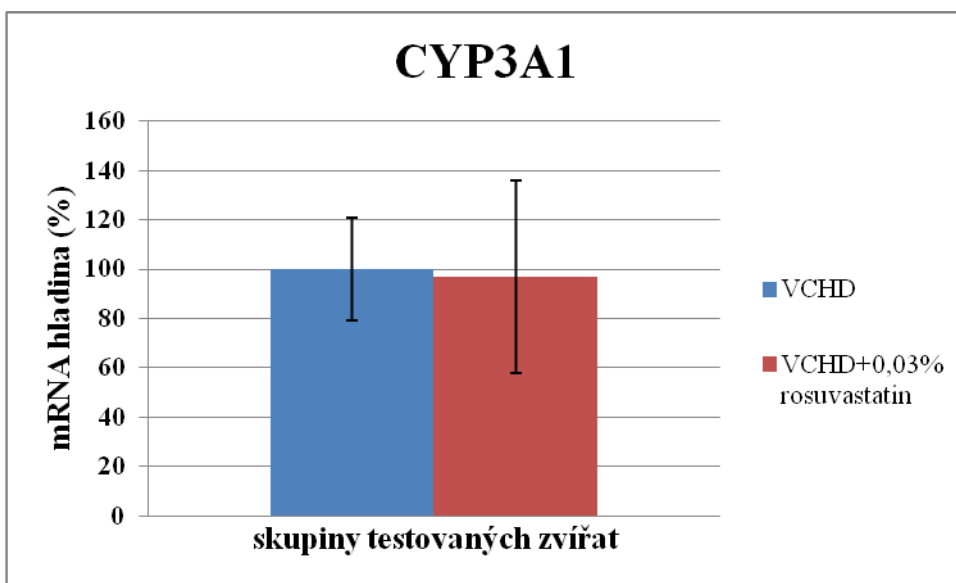
vzorek 8 – 14: jednotlivé vzorky od potkanů s vysokocholesterolovou dietou obohacenou o rosuvastatin (VCHD+0,03% rosuvastatin)

nRT – non-template kontroly

8. Výsledky

U experimentálních zvířat byl sledován vliv rosuvastatinu ve vysokocholesterolové dietě na změny hladiny mRNA u 4 nejvýznamnějších CYP podílejících se na metabolismu xenobiotik, respektive léčiv. Každý vzorek (v každé skupině celkem 7 potkanů) byl testován v triplicátu. Hladiny mRNA u jednotlivých zvířat byly zjištěny pomocí komparativní C_t metody za použití referenčního genu pro HPRT. Výsledky jednotlivých experimentů byly dále statisticky zpracovány pomocí programu QC expert s důrazem na sledování rozdílu v hladinách mRNA pro daný CYP a daný typ diety (vysokocholesterolová dieta, VCHD versus vysokocholesterolová dieta s přidavkem rosuvastatinu, VCHD+0,03% rosuvastatin). Výsledky byly vyjádřeny procentuálně, kdy hladina mRNA u HHTg potkanů s vysokocholesterolovou dietou (VCHD) byla stanovena jako 100%.

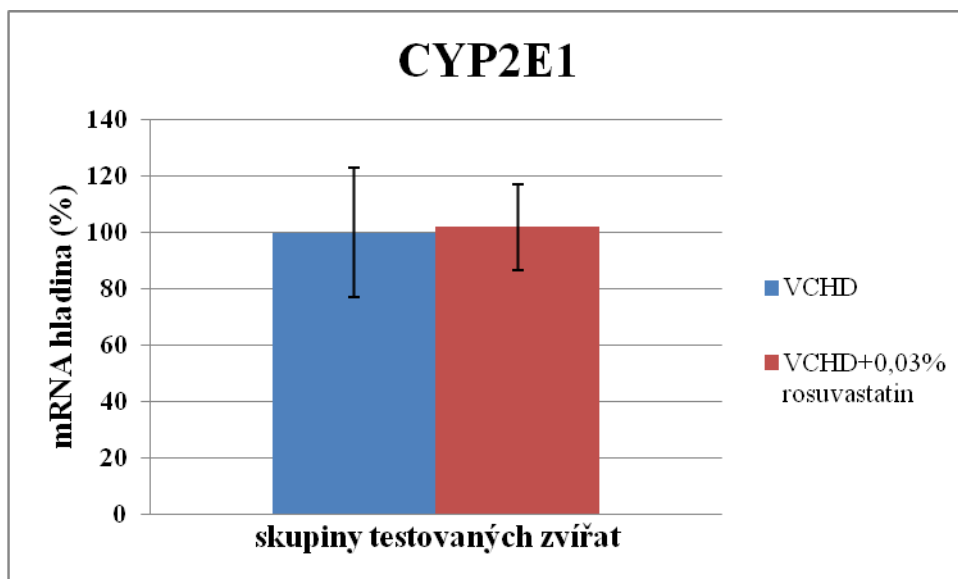
8.1 CYP3A1



Graf 1: Rozdíl v expresi genu pro CYP3A1 mezi HHTg potkany s VCHD a VCHD+0,03% rosuvastatin; hladina mRNA u HHTg potkanů s VCHD je zvolena jako 100 %; počet zvířat v každé skupině $n = 7$.

Na základě statistického zpracování výsledků nebyl prokázán vliv rosuvastatinu v podávané dietě na hladinu mRNA pro CYP3A1 ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat.

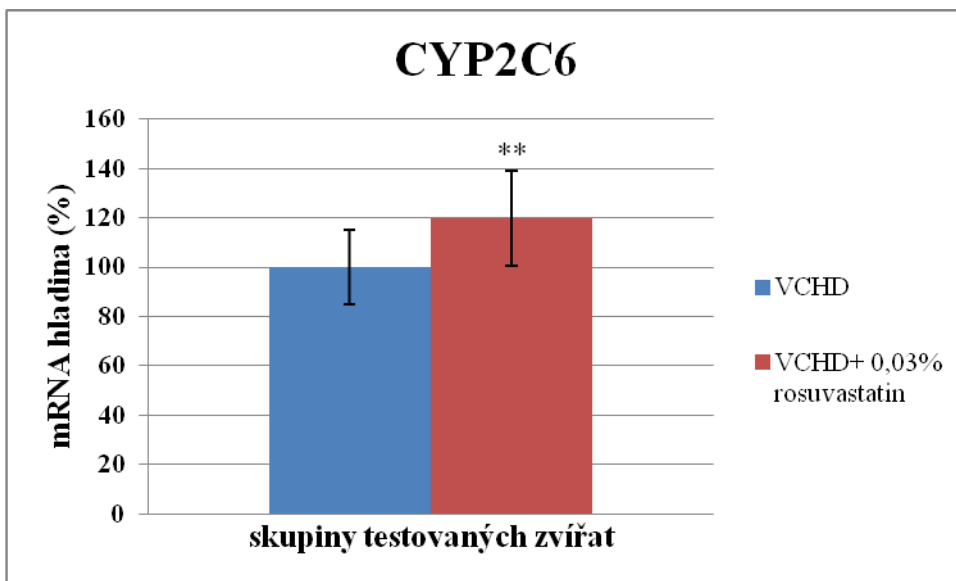
8.2 CYP2E1



Graf 2: Rozdíl v expresi genu pro CYP2E1 u HHTg potkanů s VCHD a VCHD+0,03% rosuvastatin; hladina mRNA u HHTg potkanů s VCHD je zvolena jako 100 %; počet zvířat v každé skupině n = 7.

Přítomnost rosuvastatinu ve vysokocholesterolové dietě nevedla ke zvýšení ani ke snížení hladiny mRNA CYP2E1 ve srovnání s kontrolní skupinou testovaných zvířat.

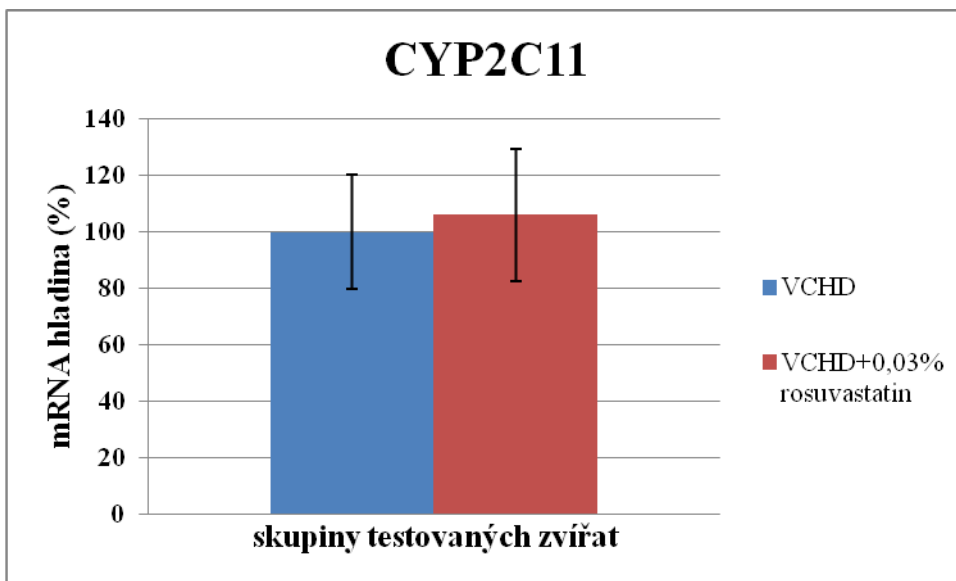
8.3 CYP2C6



Graf 3: Rozdíl v expresi genu pro CYP2C6 u HHTg potkanů s VCHD a VCHD+0,03% rosuvastatin; hladina mRNA u HHTg potkanů s VCHD je zvolena jako 100 %; počet zvířat v každé skupině n = 7; hladina významnosti ** p<0,01

Na základě vyhodnocení výsledků bylo prokázáno statisticky významné (p<0,01) zvýšení hladiny mRNA pro CYP2C6 u potkanů krmených vysokocholesterolovou dietou s přídavkem rosuvastatinu ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat. Hladina mRNA u HHTg potkanů krmených VCHD s 0,03% rosuvastatinem se zvýšila o 20 % (0,833x).

8.4 CYP2C11



Graf 4: Rozdíl v expresi genu pro CYP2C11 u HHTg potkanů s VCHD a VCHD+0,03% rosuvastatin; hladina mRNA u HHTg potkanů s VCHD je zvolena jako 100 %; počet zvířat v každé skupině n = 7.

V případě CYP2C11 nebyl prokázán vliv rosuvastatinu ve vysokocholesterolové dietě na expresi genu pro CYP2C11 na úrovni mRNA.

9. Diskuze

Rosuvastatin patří mezi statiny, látky inhibující HMG-CoA reduktasu, které snižují syntézu plasmatického cholesterolu. Ze všech statinů rosuvastatin nejpříznivěji ovlivňuje hladinu LDL (rizikového faktoru aterosklerózy a ischemické choroby srdeční) i HDL cholesterolu. Rosuvastatin jako jediný z klinicky používaných statinů obsahuje polarizovanou methylosulfonamidovou skupinu, díky níž velmi specificky interaguje s aktivním místem HMG-CoA reduktasy a je dostatečně koncentrován v hepatocytech (Vaverková, 2008). Výhodou rosuvastatinu vůči ostatním statinům, je tedy jeho účinnost na snížení hladiny LDL cholesterolu v nízkých dávkách.

V minulosti byl studován do značné míry zejména metabolismus statinů na úrovni CYP a z něj vyplývající možné lékové interakce se současně podávanými substráty a případně inhibitory dané formy CYP. Výsledky takovýchto experimentů s rosuvastatinem jasně signalizují prakticky nulové riziko vzniku lékových interakcí na úrovni metabolismu CYP, je-li rosuvastatin podáván souběžně s významnými inhibitory/induktory CYP3A4 případně dalších forem CYP (Crouse, 2008).

Na druhou stranu je nutné zmínit, že v minulosti nebyl ve větší míře sledován možný vliv statinů na expresi nejvýznamnějších CYP účastníků se metabolismu léčiv. Vědci pod vedením Thomase Kocarka zjistili ve studii s potkaními hepatocyty i v *in vivo* experimentu, že lovastatin, simvastatin či fluvastatin zvyšují hladinu mRNA u CYP2B6 a CYP3A, atorvastatin ovlivňuje pouze CYP3A (Kocarek *et Reddy*, 1996). V experimentu s lidskými hepatocyty byl dále prokázán indukční účinek lovastatinu, simvastatinu, atorvastatinu a fluvastatinu na expresi mRNA u lidských CYP2B, CYP3A a CYP4A (Kocarek *et al*, 2002).

Jak již bylo zmíněno výše v textu, z hlediska lékových interakcí na úrovni CYP patří rosuvastatin mezi bezpečná hypocholesterolemika. Navíc je rosuvastatin (lékový přípravek Crestor, Astra Zeneca) v současnosti jeden z nejpředepisovanějších léků vůbec. V rámci bakalářské práce bylo tedy zajímavé sledovat vliv tohoto léčiva na expresi 4 nejvýznamnějších CYP podílejících se na biotransformaci léčiv.

Ve srovnání s předchozími studiemi používajícími převážně buněčné kultury byli jako experimentální model zvoleni speciálně vyšlechtění potkani s vyvinutým metabolickým syndromem (HHTg potkani), kteří mají predispozici k rozvoji aterosklerózy. HHTg potkani v kontrolní skupině byli krmeni vysokocholesterolovou dietou a potkani v druhé skupině byli krmeni taktéž vysokocholesterolovou dietou avšak s přídatkem rosuvastatinu. Experimentální

model byl volen tak, abychom se více přiblížili k reálným podmínkám *in vivo*, při kterých je indikována terapie rosuvastatinem. V předložené práci byl sledován vliv rosuvastatinu konkrétně na expresi CYP3A1, CYP2E1, CYP2C6 a CYP2C11. Experimenty neodhalily žádný statisticky významný efekt rosuvastatinu na změnu hladiny mRNA CYP3A1, CYP2C11 a CYP2E1 u potkanů krměných dietou obohacenou o rosuvastatin ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat. V případě CYP2C6 však byla zjištěna tendence ke zvýšení hladiny mRNA u potkanů krměných vysokocholesterolovou dietou obohacenou o rosuvastatin ve srovnání se skupinou kontrolních zvířat. Feidt *et al.* (2010) zjistili, že všechny statiny s výjimkou pravastatinu vykazovaly indukční efekt na enzymovou aktivitu vybraných CYP v lidských hepatocytech a baktosomech exprimujících čisté formy enzymů. Míra indukčního efektu na aktivitu CYP klesala v následujícím pořadí: atorvastatin > simvastatin > lovastatin > rosuvastatin. Nejvíce byly statiny indukčovány enzymy CYP2C8 (enzymová aktivita zvýšena až dvacetinásobně) a CYP3A4, následovaly CYP2C9, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6. Aktivita CYP1A2 byla naopak ovlivněna zcela nepatrně (Feidt *et al.*, 2010).

Na základě výsledků získaných v *in vitro* či *in vivo* experimentech nelze vyloučit potenciální indukční účinek rosuvastatinu na aktivitu některých lidských případně potkaních CYP účastnících se metabolismu léčiv. Uvážíme-li však fakt, že byl prokázán pouze slabý či nulový indukční účinek na zvýšení hladiny mRNA, proteinu či aktivity významných CYP účastnících se metabolismu léčiv jak u potkana či u člověka, je z hlediska možných lékových interakcí indukční efekt rosuvastatinu na úrovni CYP klinicky spíše nevýznamný.

10. Závěr

V předložené bakalářské práci byl sledován efekt rosuvastatinu na hladinu mRNA u vybraných potkaních CYP (CYP3A1, CYP2E1, CYP2C6 a CYP2C11). Výsledky experimentální části práce poukázaly na mírné zvýšení hladiny mRNA u CYP2C6 a to 0,8 krát ve srovnání s kontrolní skupinou testovaných zvířat. Experimenty provedené v rámci předložené bakalářské práce by měly být dále doplněny dalším studiem vlivu rosuvastatinu na genovou expresi studovaných potkaních CYP na úrovni proteinu a případně enzymové aktivity daných CYP, které by potvrdily, případně vyvrátily výsledky této ministudie.

11. Použitá literatura

1. Roberts E.A., Harper P.A., Wong J.M., Wang Y., Yang S. (2000): Failure of Ah receptor to mediate induction of cytochromes P450 in the CYP1 family in the human hepatoma line SK-Hep-1. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 384: 190 - 8.
2. Kawajiri K., Fujii-Kuriyama Y. (2007): Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464: 207 - 212.
3. Choi S.J., Kim M., Kim S. and Jeon J.K. (2003): Microplate Assay Measurement of Cytochrome P450-Carbon Monoxide Complexes. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 332 - 335.
4. Henry C. (2004): CRYSTAL STRUCTURE REVEALS SURPRISES Drug-metabolizing enzyme active site is found to be smaller than expected. *Chemical & Engineering News*, 82: 7.
5. Doherty M.M., Charman W.N. (2002): The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism?. *Clinical Pharmacokinetics*, 41: 235 – 253.
6. Lewis D.F.V., Ito Y. (2008): *Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and other Xenobiotics*, Chapter I: Cytochrome P450 Structure and Function: An Evolutionary, editor: Costas Ioannides, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK; ISBN – 13: 9780854042746.
7. Kocarek T.A., Dahn M.S., Cai H., Strom S.C., Mercer-Haines N.A. (2002): Regulation of CYP2B6 and CYP3A expression by hydroxymethylglutaryl coenzyme a inhibitors in primary cultured human hepatocytes. *Drug metabolism and Disposition*, 30: 1400 – 1405.
8. Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 737 – 747.
9. Martignoni M., Groothuis G.M., de Kanter R. (2006): Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2: 875 – 894.

10. Dvořák Z., Cvek B. (2011): Vybrané kapitoly z buněčné biologie. Univerzita Palackého v Olomouci, 1. vydání, skripta, ISBN: 978-80-244-2724-9.
11. Škottová N., Večeřa R. (2004): Farmakologie látek ovlivňujících plasmatické lipoproteiny (antihyperlipidemika – hypolipidemika). Univerzita Palackého v Olomouci, 1. vydání, skripta, ISBN: 80-244-0816-3.
12. Romkes M., Faletto M.B., Blaisdell J.A., Raucy J.L., Goldstein J.A. (1991): Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry*, 30: 3247 – 3255.
13. 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 drug, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270: 414 – 423.
14. Transon C., Leemann T., Dayer P. (1996): In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 50: 209-215.
15. Chang T.K., Waxman D.J. (2005): Pregnane X receptor-mediated transcription. *Methods in Enzymology*, 400: 588 – 598.
16. Barbier O., Fontaine C., Fruchart J.Ch., Staels B. (2004): Genomic and non-genomic interactions of PPAR α with xenobiotic-metabolizing enzymes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15: 324 – 330.
17. Lüllman H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D. (2001): Barevný atlas farmakologie. GRADA Publishing, 2. přepracované a doplněné vydání, ISBN: 80-7169-973-X.
18. Evans M., Rees A. (2002): The myotoxicity of statins. *Current Opinion in Lipidology*, 13: 415 – 420.
19. Górecká K., Tilšer I., Nachtigal P., Kopecký M., Vlček Jiří. (2004): Extralipidové účinky statinů - nový pohled na farmakodynamiku inhibitorů HMG-CoA reduktázy. *Remedia*, 14: 355 – 363.

20. Staffa L.A., Cheng J., Green L. (2002): Cerivastatin and report of fatal rhabdomyolysis. *The New England journal of medicine*, 346: 539 – 540.
21. Cheng W.M. (2004): Rosuvastatin in the Management of Hyperlipidemia. *Clinical Therapeutics*, 26: 1368 - 1387.
22. Neuvonen P.J., Niemi M., Backman J.T. (2006): Drug interaction with lipid-lowering drugs: Mechanisms and clinical relevance. *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 80: 565 – 81.
23. Schachter M. (2005): Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & clinical pharmacology*, 19: 117 – 126.
24. Prueksaritanont T., Gorham L.M., Ma B., Liu L., Yu X., Zhao J.J., et al. (1997): In vitro metabolism of simvastatin in human [SBT] identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s, *Drug metabolism and disposition*, 25: 1191 – 1199.
25. Neuvonen P.J. (2010): Drug interaction with HMG-CoA reductase inhibitors (statins): The importance of CYP enzymes, transporters and pharmacogenetics, *Current Opinion in Investigational Drugs*, 11: 323 – 332.
26. Kocarek T.A., Reddy A.B. (1996): Regulation of cytochrome P450 expression by inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase in primary cultured rat hepatocytes and rat liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 24: 1197-1204.
27. Feidt D.M., Klein K., Hofmann U., Riedmaier S., Knobloch D., Thasler W.E., Weiss T.S., Schwab M., Zanger U.M. (2010): Profiling induction of cytochrome p450 enzyme activity by statins using a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail assay in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 38: 1589 – 1597.
28. Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. (2008): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně, 1. dotisk 1. vydání, ISBN: 978-80-210-3841-7.
29. Evans WE, Relling MV. (1999): Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 286:487-491.
30. Vaverková H. (2008): Rosuvastatin. *Remedia*, 324–330.

31. Klimeš I., Vrána A., Kuneš J., Šeböková E., Dobešová Z., Štolba P., Zicha J. (1995): Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolit alterations in hypertension. *Blood Press*, 4: 137 – 142.
32. Crouse J.R. (2008): An evaluation of rosuvastatin: pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4:1-18.

Internetové zdroje

1. <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/P450.htm>, 31.10.2011
2. <http://www.psychresidentonline.com/CYP450%20drug%20interactions.htm>, 26.3.2012
3. http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&categId=33&cname=Vnit%C5%99n%C3%AD+I%C3%A9ka%C5%99stv%C3%AD&letter=L&termId=2464&tname=Lipoproteiny+-+metabolismus&h=empty#jump, 7.2.2012
4. http://www.svl.cz/Files/nastenka/page_4766/Version1/ICHS.pdf, 27.10. 2011
5. <http://inovace.cz/novinky/326-nova-metoda-v-boji-proti-infarktu-ci-mozkove-mrtvici>, 9.2.2012
6. <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2005/01/05.pdf>, 9.2.2012.
7. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es_002_v1/hesla/lipoproteiny_krevni.html, 9.2.2012
8. http://www.medicalisotopes.com/display_product.php?catnum=13434&alpha=0&caller=INDEX, 5.3.2012.
9. <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>, 11.3.2012, 12.3.2012
10. <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>, 12.3.2012
11. <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/DDIs/table.aspx>, 26.3.2012
12. http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&termId=3292&tname=Hypolipidemia; 26.3.2012
13. <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>

12. Seznam použitých zkratk

CYP	cytochrom P450
UV-VIS	Ultraviolet–Visible Spectroscopy (ultrafialové záření)
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-coenzym A
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PXR	Pregnane X Receptor (pregnanový X receptor)
CAR	Constitutive Androstane Receptor (konstitutivní androstanový receptor)
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor (receptor pro polyaromatické uhlovodíky)
PPAR α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (receptory alpha aktivované peroxisomovým proliferátorem)
PXR-RXR	heterodimer Pregnane X Receptor-Retinoid X Receptor
AhR-ARNT	heterodimer - AhR jaderný translokátor
DRE	Dioxin-Responsive Elements
XRE	Xenobiotic-Responsive Elements
CAR-RXR	heterodimer Constitutive Androstane Receptor-Retinoid X Receptor
RXR γ	Retinoid X Receptor γ (receptor pro kyselinu <i>cis</i> -retinovou γ)
PPAR α -RXR γ	heterodimer Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α - Retinoid X Receptor γ
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Elements
VLDL	Very Low Density Lipoproteins (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou)
LDL	Low Density Lipoproteins (lipoproteiny s nízkou hustotou)
HDL	High Density Lipoproteins (lipoproteiny s vysokou hustotou)
TAG	triacylglycerol
HPL III	hyperlipidemie III
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)

HHTg	hereditární hypertriglyceridemie
HPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasa (referenční gen)
Fw	Forward primer
Rev	Reverse primer