

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2018**

**Dominika Dohnalová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Stanovení exprese mRNA transportních proteinů  
ABCG5 a ABCG8 u HHTg potkanů na dietě  
obohacené o přírodní látky**

**Bakalářská práce**

**Dominika Dohnalová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Matušková, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Zuzany Matuškové, Ph.D., s použitím zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne .....

Podpis: .....

## SOUHRN

Bakalářská práce se věnuje genovou expresí střevních transportérů ABCG5 a ABCG8 na úrovni mRNA u hereditárně hypertriglyceridemických potkanů, kteří byli na dietě obohacené o silymarin nebo n-3 polynenasycené mastné kyseliny nebo na kombinované dietě obsahující obě látky.

V literárním přehledu je popsána problematika metabolického syndromu, který je charakterizován souborem rizikových faktorů způsobující kardiovaskulární onemocnění či diabetes mellitus druhého typu. Jedním z faktorů metabolického syndromu je hypercholesterolemie, tedy zvýšená plazmatická koncentrace cholesterolu. Pro homeostázu cholesterolu je důležitá správná funkce transportních proteinů ABCG5 a ABCG8, které se podílí na eliminaci cholesterolu z těla. Bylo zjištěno, že n-3 polynenasycené mastné kyseliny samotné, ale i v kombinaci se silymarinem, tedy extraktem z ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*), zvyšují expresi mRNA jaterních transportérů ABCG5 a ABCG8. Ovšem otázkou je, zda ke stejnému efektu dochází i v tenkém střevě. Studie byla provedena na experimentálním zvířecím modelu metabolického syndromu – hereditárně hypertriglyceridemických potkanech. Tato zvířata mají zvýšenou plazmatickou koncentraci triglyceridů a jejich popisu se věnuje i další část literárního přehledu V závěru první části práce jsou uvedeny metody studia exprese mRNA, především princip metody real-time PCR.

Experimentální část se věnuje stanovení exprese mRNA genů *Abcg5* a *Abcg8* ve střevní tkáni potkana. Cílem práce bylo zjistit, jaká vliv má silymarin a n-3 polynenasycené mastné kyseliny na expresi mRNA střevních *Abcg5* a *Abcg8* a porovnat tento efekt s efektem pozorovaným u jaterních transportérů. Výsledky ukazují, že silymarin a n-3 polynenasycené mastné kyseliny nemají signifikantní vliv na expresi mRNA střevních transportérů ABCG5/8. Mechanismus působení vybraných látek je tedy pravděpodobně složitější.

## SUMMARY

This bachelor's thesis deals with the mRNA expression of intestinal transporters ABCG5 and ABCG8 in hereditary hypertriglyceridemic rats that were fed on a diet supplemented by silymarin or n-3 polyunsaturated fatty acids or diet containing both substances.

The issue of a metabolic syndrome is described in the literature review. It is characterized by many risk factors that can cause cardiovascular diseases or diabetes mellitus type II. One of those risk factors is hypercholesterolemia, the increased plasma concentration of cholesterol. The correct function of transporters ABCG5 and ABCG8 is important for cholesterol homeostasis. They help to get rid of cholesterol out of the body. It was recently observed that n-3 polyunsaturated fatty acids by themselves or combined with silymarin, an extract from Milk thistle (*Silybum marianum*), increase the mRNA expression of hepatic ABCG5 and ABCG8 transporters. But the question is, if the effect on intestinal transporters will be the same. The study was carried out on the animal experimental model of metabolic syndrome – hereditary hypertriglyceridemic rats. They have an increased plasma concentration of triglycerides. One part of the literature review is focused on the characteristic of these animals. Methods used for the determination of mRNA expression, particularly the basic principles of the real-time PCR, are described at the end of the theoretical part.

Experimental part is focused on determination of the mRNA expression of *Abcg5* and *Abcg8* genes in intestinal tissue of rats. The aim of the study was to determine the effect of silymarin and n-3 polyunsaturated acids on the mRNA expression of intestinal *Abcg5* and *Abcg8* and compare this effect with the effect observed on the transporters in the rat liver. Results show that silymarin and n-3 polyunsaturated fatty acids have no significant effect on the mRNA expression of ABCG5/8 transporters in the rat intestine. The mechanism of action of selected compounds is probably more complicated.

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Zuzaně Matuškové, Ph.D., za odborné vedení, připomínky a čas, který mi věnovala. Mé poděkování patří také PharmDr. Martinu Porubovi za pomoc při zpracování experimentální části a Ústavu farmakologie LF Univerzity Palackého za možnost využití jejich laboratoří.

## OBSAH

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | ÚVOD.....   | 1  |
| 2       | CÍLE PRÁCE.....   | 2  |
| 3       | LITERÁRNÍ PŘEHLED .....                                 | 3  |
| 3.1     | Metabolický syndrom.....                                | 3  |
| 3.2     | Alternativní léčba .....                                | 4  |
| 3.2.1   | Silymarin.....  | 4  |
| 3.2.2   | Polynenasycené mastné kyseliny.....                     | 5  |
| 3.2.2.1 | N-3 polynenasycené mastné kyseliny DHA a EPA .....      | 6  |
| 3.3     | ABC proteiny .....                                      | 6  |
| 3.3.1   | Transportní proteiny ABCG5 a ABCG8 .....                | 7  |
| 3.3.1.1 | Struktura ABCG5 a ABCG8 .....                           | 8  |
| 3.3.1.2 | Regulace a ovlivnění genové exprese Abcg5 a Abcg8 ..... | 9  |
| 3.3.1.3 | Sitosterolémie a role v ateroskleróze.....              | 10 |
| 3.4     | HHTg potkani.....                                       | 11 |
| 3.4.1   | Vznik modelu.....                                       | 11 |
| 3.4.2   | Charakteristika HHTg modelu.....                        | 12 |
| 3.5     | Metody studia exprese mRNA .....                        | 13 |
| 3.5.1   | Izolace mRNA .....                                      | 13 |
| 3.5.2   | Syntéza cDNA .....                                      | 13 |
| 3.5.3   | Real-time PCR.....                                      | 14 |
| 4       | MATERIÁL a METODY .....                                 | 17 |
| 4.1     | Biologický materiál.....                                | 17 |
| 4.2     | Použité soupravy a chemikálie.....                      | 17 |
| 4.3     | Seznam použitých přístrojů a zařízení .....             | 18 |
| 4.4     | Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....     | 18 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.4.1 | Izolace mRNA .....  | 18 |
| 4.4.2 | Syntéza cDNA .....  | 19 |
| 4.4.3 | Real-time PCR .....   | 21 |
| 4.4.4 | Analýza exprese mRNA pomocí $\Delta\Delta\text{Ct}$ metody..... | 27 |
| 4.4.5 | Statistické hodnocení výsledků.....                             | 28 |
| 5     | VÝSLEDKY .....  | 29 |
| 5.1   | Izolace mRNA.....   | 29 |
| 5.2   | Syntéza cDNA.....   | 31 |
| 5.3   | Real-time PCR .....   | 31 |
| 5.4   | Analýza exprese mRNA pomocí $\Delta\Delta\text{Ct}$ metody..... | 32 |
| 6     | DISKUZE .....   | 35 |
| 7     | ZÁVĚR .....   | 37 |
| 8     | LITERATURA .....  | 38 |



## SEZNAM SYMBOLŮ a ZKRATEK

|                |   |
|----------------|---|
| ABC            | ATP vázající protein (Adenosin triphosphate-binding cassette) |
| CCH            | Celkový cholesterol   |
| C <sub>t</sub> | Hodnota C <sub>t</sub> (treshold cycle)                       |
| DHA            | Dokosahexaenová kyselina                                      |
| EPA            | Eikosapentaneová kyselina                                     |
| HDL            | Lipoproteiny s vysokou hustotou                               |
| HHTg           | Hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani                    |
| HPRT           | Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza                     |
| LDL            | Lipoproteiny s nízkou hustotou                                |
| NBD            | Doména vázající nukleotid                                     |
| NCP1L1         | Niemann-Pick C1-like 1 protein                                |
| PUFA           | Polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)  |
| RT             | Reverzní transkripce  |
| STD            | Standardní laboratorní dieta                                  |
| TG             | Triglyceridy  |
| TMD            | Transmembránová doména  |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|   |    |
|---|----|
| Obr. 1: Ostropestřec mariánský ( <i>Silybum marianum</i> ) .....  | 4  |
| Obr. 2: Schématické znázornění biologické funkce transportních proteinů ABCG5/8 a NPC1L1 .....  | 8  |
| Obr. 3: Schematické znázornění transportních proteinů ABCG5 a ABCG8.....  | 9  |
| Obr. 4.: Hladina TG v krevní plazmě u normotriglyceridemické a hypertriglyceridemické linie potkanů na vysokosacharóзовé dietě v odlišných generacích .....         | 12 |
| Obr. 5: Modelová amplifikační křivka ilustrující běžně užívanou nomenklaturu během real-time PCR .....  | 15 |
| Obr. 6: Schéma pipetování cDNA na 384jamkovou mikrotitrační destičku. ....  | 22 |
| Obr. 7: Schéma pipetování PCR směsi s příslušnými chemikáliemi ze souprav TaqMan gene expression assay na 384jamkovou mikrotitrační destičku. ....                  | 22 |
| Obr. 8: Schéma pipetování cDNA na 1536jamkovou mikrotitrační destičku. ....   | 25 |
| Obr. 9: Schéma pipetování PCR směsi s příslušnými chemikáliemi ze souprav Taqman Gene expression assay na 1536jamkovou mikrotitrační destičku. ....                 | 26 |
| Obr. 10: Hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sledovaných genů transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 v tenkém střevě HHTg potkanů po čtyřech týdnech podávané diety. .... | 33 |

## SEZNAM TABULEK

|  |    |
|--|----|
| Tab. 1: Složení směsi templát-primer. ....   | 20 |
| Tab. 2: Složení PCR směsi s reverzní transkriptasou. ....  | 21 |
| Tab. 3: Výpočet objemu pipetovaného do zdrojové destičky pro cDNA. ....  | 23 |
| Tab. 4: Výpočet objemu pipetovaného do zdrojové destičky pro PCR směs. ....                                    | 24 |
| Tab. 5: Objem jedné jamky na 1536jamkové destičce. ....  | 27 |
| Tab. 6: Podmínky real-time PCR amplifikace.....  | 27 |
| Tab. 7: Koncentrace a míra čistoty izolované mRNA stanovené pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60.....    | 30 |
| Tab. 8: Normalizace vzorků zpracovaných metodou $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ke kontrolní hodnotě 1.....            | 32 |
| Tab. 9: Průměr a směrodatné odchylky normalizovaných vzorků zpracovaných metodou $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ..... | 33 |

# 1 ÚVOD

Metabolický syndrom je soubor onemocnění způsobený několika rizikovými faktory, které mohou vést ke vzniku diabetu druhého typu nebo kardiovaskulárního onemocnění. Jedním z mnoha faktorů je i zvýšená hladina cholesterolu. Vzhledem k různým faktorům neexistuje jeden lék, který by vyléčil metabolický syndrom. Jsou ale látky, které mohou ovlivnit některé z těchto faktorů. Mezi látky s již ověřeným hypolipidemickým účinkem lze zařadit silymarin, tedy extrakt z ostropestřce mariánského (Mesheimish *et al.*, 2007), či n-3 polynenasycené mastné kyseliny (Fukunaga *et al.*, 2016).

Objev transportérů ABCG5 a ABCG8, které jsou zodpovědné za eliminaci cholesterolu a rostlinných sterolů z organismu, umožnil studovat látky, které mohou ovlivnit jejich expresi na různých úrovních. Látky zvyšující expresi transportérů ABCG5/8 na úrovni mRNA i na úrovni proteinu by mohly pomoci v léčbě metabolického syndromu. Pro studium metabolického syndromu byl vyšlechtěn zvířecí experimentální model – tzv. HHTg potkan, který má zvýšenou plazmatickou koncentraci triglyceridů (TG). Tento model byl využit při studiu (data nepublikována) vlivu silymarinu, n-3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA) a jejich kombinace na expresi mRNA *Abcg5* a *Abcg8* v jaterní tkáni HHTg potkana. Zjistilo se, že samotné PUFA způsobují zvýšení v expresi mRNA jaterních genů *Abcg5* i *Abcg8*. Studie navíc ukázala, že kombinace PUFA se silymarinem ještě podporuje zvýšení v expresi mRNA obou jaterních genů. Cílem této práce je tedy zjistit, zda PUFA a silymarin mají stejný efekt na expresi mRNA genů *Abcg5* a *Abcg8* ve střevní tkáni u stejných laboratorních zvířat.

## 2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše zaměřené na vlastnosti transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 a možnosti jejich ovlivnění.
- Stanovení exprese střevních transportérů ABCG5 a ABCG8 na úrovni mRNA u HHTg potkanů pomocí real-time PCR.
- Porovnání výsledků mezi jednotlivými skupinami potkanů, lišícími se podávanou stravou. Statistické vyhodnocení výsledků.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom je označení pro soubor metabolických rizikových faktorů, které způsobují vznik kardiovaskulárních onemocnění a diabetes druhého typu (Mottillo *et al.*, 2010). Kritéria pro diagnostiku metabolického syndromu byla stanovena Mezinárodní diabetologickou federací (International Diabetes Federation). Je zde zařazeno pět kritérií, z nichž musí pacient splňovat minimálně tři, aby se mohlo mluvit o metabolickém syndromu. Kritéria zahrnují širší obvod pasu, zvýšené hladiny TG, snížené hladiny lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL), hypertenze a zvýšená koncentrace krevní glukózy.

Čím dál častěji se dává větší důraz na viscerální obezitu, která je hlavním znakem tohoto syndromu. Viscerální obezita je měřena obvodem pasu a je u každé etnické populace jiná (Alberti *et al.*, 2005). V evropské populaci je zvýšené riziko výskytu metabolického syndromu při obvodu pasu vyšším než 90 cm u mužů a vyšším než 80 cm u žen. Pokud je obvod pasu u mužů vyšší než 102 cm a u žen vyšší než 88 cm, riziko se podstatně zvyšuje (Alberti *et al.*, 2009).

Nejběžnějším symptomem metabolického syndromu je dyslipidemie, porucha metabolismu tuků. Dyslipidemie je charakterizována zvýšenou hladinou TG, celkového cholesterolu (CCH), lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) a sníženou hladinou HDL v krevní plazmě (Poruba *et al.*, 2015a). Celková plazmatická hladina cholesterolu je dána koncentrací obou HDL a LDL lipoproteinů. Částice LDL transportují cholesterol z jater do periferních tkání a mají vysokou aterosklerotickou aktivitu, zatímco HDL částice mají antiaterosklerotickou aktivitu a mají důležitou roli při transportu cholesterolu z okolních tkání zpět do jater (Poruba *et al.*, 2015b).

Mezi další faktory patří inzulinová rezistence, kdy i přes produkci inzulinu beta buňkami slinivky břišní nedochází v těle ke snižování krevní glukózy. U těchto pacientů se může časem rozvinout diabetes druhého typu.

Výše zmíněné faktory jsou nejběžnějšími riziky vzniku kardiovaskulárních onemocnění jako je ateroskleróza, ucpávání tepen, infarkt myokardu, mrtvice nebo periferní cévní onemocnění (Weber *et Noels*, 2011).

### 3.2 Alternativní léčba

Vzhledem k rozmanitým faktorům, které mohou vzájemně způsobit vznik metabolického syndromu, neexistuje jeden lék, který by všechny pozitivně ovlivnil. Přesto lze použít extrakty z rostlin s vysokým obsahem polyfenolů jako podpůrnou léčbu metabolického syndromu. Pro tyto účely je využíván ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) z čeledi hvězdicovité (*Asteraceae*).



Obr. 1: Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) (převzato z publikace Qavami *et al.*, 2013).

Dalšími látkami, které pozitivně ovlivňují některé z faktorů metabolického syndromu, jsou polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Již v roce 1930 bylo zjištěno, že n-6 PUFA jsou esenciální v lidské potravě. Později byly spojeny s prevencí aterosklerózy a s jejich schopností snižovat hladinu cholesterolu v krevní plazmě (Dyerberg, 1986).

#### 3.2.1 Silymarin

Silymarin je standardizovaný extrakt získaný ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Ostropestřec mariánský je jednoletá nebo dvouletá bylina z čeledi hvězdicovité (*Asteraceae*), která roste ve středomořském pásmu, ale i v suchých oblastech střední Evropy, Severní a Jižní Ameriky, střední a východní části Asie a jižní

Austrálie (Radjabian a Huseini, 2010). Již po staletí se užívaly extrakty z těchto semen na potíže se zažívacím traktem a játry, a to vše díky jeho antioxidačním vlastnostem (Valenzuela *et* Garrido, 1994). Dnes dostupný standardizovaný extrakt ze sušených plodů (semen) ostropestřce obsahuje přibližně 60 % silymarinu. Silymarin se pak dále skládá především ze 4 strukturálních flavolignanových izomerů: silybin (50–60 %), isosilybin (přibližně 5 %), silikristin (přibližně 20 %) a silydianin (přibližně 10 %), ale i dalších složek jako taxifolin (5 %). Hlavní účinnou složkou silymarinu je silybin a předpokládá se, že je zodpovědný za mnoho pozitivních vlastností silymarinu (Saller *et al.*, 2007).

Při vážné dyslipidemii by se mohl použít silymarin jako doplněk léčby, protože snižuje množství TG a CCH a zvyšuje HDL cholesterol v krevní plazmě. Zvýšení plazmatické koncentrace HDL cholesterolu je také považováno za prevenci kardiovaskulárních chorob, neboť HDL cholesterol se podílí na zpětném transportu cholesterolu do jater. Na eliminaci cholesterolu z organismu se podílí tzv. ABC transportéry (ABCG5 a ABCG8), které jsou také pozitivně ovlivněny pravidelnou dávkou silymarinu ve stravě (Poruba *et al.*, 2015a). Silymarin má pozitivní vliv i na metabolismus glukózy. Huseini *et al.* (2006) prokázali, že silymarin znatelně snižuje hladinu TG a zlepšuje toleranci glukózy u pacientů trpících diabetem druhého typu.

Nevýhodou standardizovaného extraktu silymarinu je jeho nízká biologická dostupnost (přibližně 2 % z dávky), která je způsobená jeho špatnou rozpustností ve vodě. Nízká biologická dostupnost silymarinu tak limituje jeho terapeutické využití. Pro tyto účely byla vytvořena jiná forma tohoto extraktu, která má vyšší biologickou dostupnost. Jednou z možností, jak zvýšit biologickou dostupnost látky, je její mikronizace, která zlepšuje vstřebatelnost doplňků stravy i léčiv. Druhou variantou je vývoj léčiva ve formě fytozomů, tedy ve formě komplexu léčiva či přírodních aktivních látek s fosfolipidy. Mikronizovaná forma silymarinu zvyšuje biologickou dostupnost až o 85 % v porovnání se standardním extraktem. Silymarin ve formě fytozomů má pak biologickou dostupnost až šestkrát vyšší (Poruba *et al.*, 2015b).

### **3.2.2 Polynenasycené mastné kyseliny**

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) patří do rodiny přirozeně se vyskytujících kyselin. Jsou jednoduše získávány z každodenní potravy. Hlavními zdroji n-6 PUFA jsou rostlinné oleje ze slunečnice, kukuřice nebo řepky. Hlavní složkou těchto olejů je



kyselina linolová s funkčním vzorcem  $C_{17}H_{31}COOH$ . Jejich název n-6 je odvozen od polohy první dvojné vazby na uhlíkatém řetězci počítající od konce, zde je tedy první dvojná vazba na C6 od konce. Od kyseliny linolové jsou pak odvozeny n-3 polynenasycené mastné kyseliny, dokosahexaenová (DHA) a eikosapentaenová (EPA), které tvoří hlavní část PUFA v mořských rybích olejích. Poloha první dvojné vazby je tedy u těchto kyselin na C3 od konce (Calder, 2004). Polynenasycené mastné kyseliny jsou esenciální mastné kyseliny se schopností snižovat cholesterol v krevní plazmě. Původně nebyly n-3 polynenasycené mastné kyseliny považovány za esenciální. Zlom však nastal v 50. a 60. letech, kdy bylo zjištěno, že rybí oleje snižují cholesterol ještě více než ty rostlinné. V roce 1972 byl pak jejich pozitivní účinek potvrzen při léčbě srdeční aterosklerózy, kdy byla použita strava bohatá na mořské plody (Dyerberg, 1986).

### **3.2.2.1 N-3 polynenasycené mastné kyseliny DHA a EPA**

Hlavními složkami rybích olejů jsou především kyseliny DHA a EPA. Konzumace těchto dlouhých řetězců n-3 PUFA slouží k ochraně proti patologickým procesům, které vedou ke kardiovaskulárním onemocněním (ateroskleróza), a procesům, které mohou způsobit smrt (infarkt myokardu, mrtvice). Řetězce n-3 PUFA také snižují hladinu TG v krevní plazmě, snižují krevní tlak a svými protizánětlivými účinky snižují zánětlivé procesy ve stěnách cév. Působením na všechny tyto faktory může vést ke snížení rizika vzniku aterosklerózy. Na základě prospěšných vlastností n-3 PUFA mohou tyto látky preventivně užívat pacienti, kteří již prodělali infarkt myokardu (Calder, 2004).

Polynenasycené mastné kyseliny odvádí mastné kyseliny z TG k oxidaci a zároveň pozitivně regulují expresi genů kódující proteiny, které se podílí na oxidaci mastných kyselin. Souběžně negativně regulují geny kódující proteiny podílející se na syntéze lipidů. Dokonce způsobují ukládání glukózy ve formě glykogenu, čímž ovlivňují hned několik faktorů způsobujících metabolický syndrom a snižují riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Clarke, 2001).

## **3.3 ABC proteiny**

Proteiny s označením ABC (Adenosin triphosphate-binding cassette proteins) patří do jedné z největších superrodin proteinů. Jsou přítomny ve všech živých druzích od *Archaea* až po *Homo sapiens sapiens*. Jsou rozeznávány podle dlouhé oblasti, která na

sebe váže adenosintrifosfát (ATP). Tato oblast je složena přibližně ze 100 aminokyselin. Proteiny ABC katalyzují široké spektrum fyziologických funkcí, ale většina z nich se podílí na transportu, proto se jim také říká transportéry.

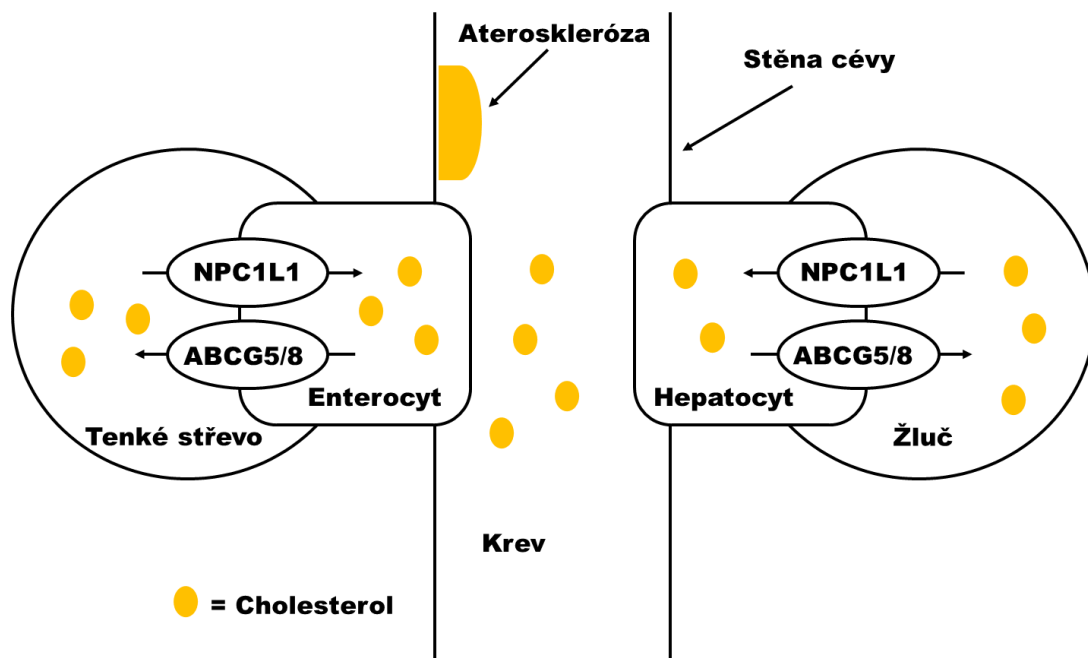
Transportéry ABC obsahují jednu nebo dvě domény vázající ATP neboli domény vázající nukleotid (NBD), a jednu nebo dvě transmembránové domény (TMD). Transmembránové domény obvykle tvoří šest  $\alpha$ -helixů procházejících přes membránu. Asociace jedné TMD s jednou NBD dává vznik polovičnímu ABC transportéru, tudíž ABC transportéry pracují jako homodimery nebo heterodimery. Rodiny ABC transportérů přenáší různé substráty proti jejich koncentračnímu gradientu pomocí energie získané z hydrolýzy ATP. Prokaryotické ABC transportéry dělíme na exportéry i importéry, zatímco u eukaryotických transportérů jsou zatím známy jen exportéry. 45 lidských a myších ABC proteinů, zahrnující exportéry a netransportní proteiny, bylo rozděleno do sedmi podrodin označeny písmeny A až G. Zvláštní vlastností ABC proteinů je jejich spojení s výskytem různých onemocnění (Goffeau *et De Hertogh*, 2013).

### 3.3.1 Transportní proteiny ABCG5 a ABCG8

Cholesterol je esenciální složkou savčích buněčných membrán a hraje zásadní roli v embryonickém vývoji, diferenciaci buněk, vedení nervových impulzů, fluiditě membrány a syntéze steroidů. Proto je normální hladina cholesterolu pro lidské zdraví velmi důležitá. Na druhou stranu příliš mnoho cholesterolu vede k patologickým následkům. Nekontrovaná tvorba cholesterolu v buňkách vede k poruše membrán a urychluje apoptózu. Akumulace cholesterolu v krvi způsobuje hyperlipidemii a aterosklerotické kardiovaskulární onemocnění, které je jedno z nejčastějších příčin smrti na celém světě a může vést k předčasnému propuknutí Alzheimerovy choroby (Barton, 2013).

Cholesterolová homeostáza je v těle udržována především *de novo* syntézou, intestinální absorpcí, žlučovou a fekální exkrecí. Ke snížení plazmatické hladiny cholesterolu je zapotřebí snížit absorpci cholesterolu nebo zvýšit jeho eliminaci. Klíčovou roli v absorpci cholesterolu má specifický transportní protein Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). Tento protein zprostředkovává absorpci cholesterolu ve střevě a resorpci cholesterolu ze žluče. Inhibitorem transportního proteinu NPC1L1 je klinicky užívaný ezetimib, jehož působením dochází ke snížení absorpce cholesterolu v tenkém střevě

a zároveň blokaci jeho resorpce ze žluče zpět do hepatocytů (Krysiak *et al.*, 2014). Pravým opakem NPC1L1 jsou heterodimery ABC transportních proteinů podrodiny G, zástupci 5 (ABCG5) a 8 (ABCG8). Tyto transportní proteiny jsou lokalizovány na apikální membráně enterocytů s kly a na kanalikulární membráně hepatocytů. Starají se o zpětnou exkreci absorbovaného cholesterolu a rostlinných sterolů z buňky (tedy enterocytu nebo hepatocytu). Působí jako effluxní pumpy, které ve výsledku snižují absorpci cholesterolu z lumen střeva, zatímco v játrech zvyšují jeho sekreci do žluče. Snižují tedy obsah cholesterolu v plazmě, což opět přispívá ke snížení rizika výskytu aterosklerózy. (Stender *et al.*, 2014).

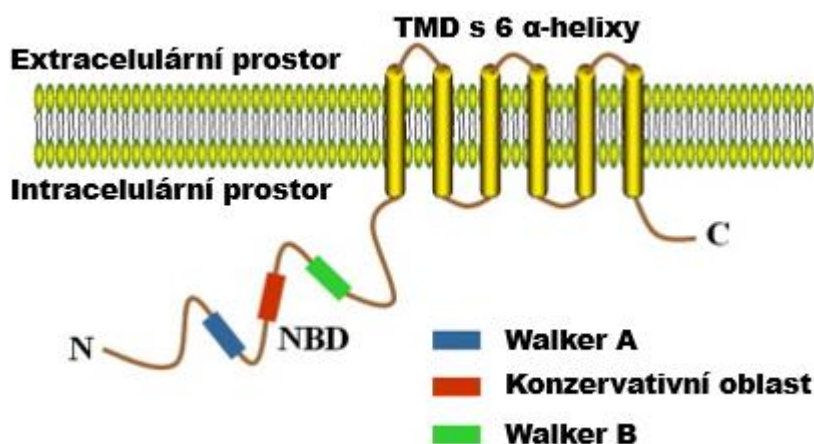


Obr. 2: Schématické znázornění biologické funkce transportních proteinů ABCG5/8 a NPC1L1 (schéma sestaveno na základě publikace Stender *et al.*, 2014).

### 3.3.1.1 Struktura ABCG5 a ABCG8

Geny transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 se nachází na chromozomu 2p21. Každý gen je složen ze 13 exonů a 12 intronů. Oba geny kódují dva odlišné proteiny ABCG5 (sterolin-1) a ABCG8 (sterolin-2). Každý protein má poblíž N konce vazebné místo pro ATP, TMD tvořenou 6 helixy a NBD. Doména vázající nukleotid obsahuje dva konzervativní peptidové motivy (Walker A a B) a konzervativní oblast, specifická pro ABC proteiny, jako je znázorněno na Obr. 3 (Yu *et al.*, 2014). Pokud jsou

transportéry exprimovány samostatně, nejsou funkční. Aby získaly transportní funkci pro steroly, musí tvořit heterodimery.



Obr. 3: Schematické znázornění transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 (převzato a upraveno z Yu *et al.*, 2014).

NBD: doména vázající nukleotid, N: N-terminus, C: C-terminus, TMD: transmembránová doména

### 3.3.1.2 Regulace a ovlivnění genové exprese *Abcg5* a *Abcg8*

Expres mRNA genů *Abcg5* a *Abcg8* je primárně regulována na úrovni transkripce. Za hlavní regulátor exprese mRNA *Abcg5* a *Abcg8* je považován jaterní X receptor  $\alpha$  ( $LXR\alpha$ ). Jedná se o ligandem aktivovaný jaderný transkripční faktor, který se podílí na kontrole metabolismu lipidů (Yu *et al.*, 2014). Dalším jaderným transkripčním faktorem je transkripční faktor  $4\alpha$  v hepatocytech ( $HNF4\alpha$ ) a GATA-vázající protein 4 ( $GATA4$ ) (Sumi *et al.*, 2007).

Kim *et al.* (2012) dokázali u transgenních myši exprimovat gen *Fat-1* získaný z háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*), který kóduje enzym desaturasu, uplatňující se v metabolismu PUFA. Tento enzym, který se nenachází u savců, je schopen přeměnit n-6 PUFA na n-3 PUFA. U *Fat-1* transgenních myši byla zvýšena exprese jaterní mRNA genů *Abcg5* a *Abcg8* po podání diety s vysokým obsahem tuku. Vysvětlením pro tuto zvýšenou expresi je aktivace  $HNF4\alpha$ , která byla v této studii detekována. Dle této studie jsou n-3 PUFA považovány za pozitivní regulátory exprese mRNA *Abcg5* a *Abcg8*

(Kim *et al.*, 2012). Metabolismus cholesterolu je také ovlivněn hormonem štítné žlázy, trijodthyroninem, který zvyšuje genovou expresi jaterních Abcg5 a Abcg8.

Další pozitivní vliv na expresi transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 v játrech mají plody palmy euterpe brazilské (*Euterpe oleracea*), díky nimž se zvýšila exprese mRNA Abcg5 a Abcg8 u potkanů, kteří měli potravou indukovanou hypercholesterolémií, tedy zvýšenou hladinu cholesterolu (de Souza *et al.*, 2012). Také rybí tuk, který je bohatý na n-3 PUFA, významně indukuje expresi mRNA Abcg5 a Abcg8 u potkanů (Takahashi, 2011).

Večeřa *et al.* (2011) testovali potkany, kterým byla podávána potrava obohacená o cholesterol a silymarin. Tato studie též prokázala zvýšení exprese transportních proteinů ABCG5, ABCG8 i ABCA1 v játrech u studovaných potkanů. Transportér ABCA1 se podílí na transportu cholesterolu k HDL částicím. Studie prokázala, že silymarin reguluje metabolismus lipidů nejen díky své schopnosti regulovat absorpci cholesterolu z tenkého střeva (Sobolová *et al.*, 2006), ale také pravděpodobně ovlivněním exprese mRNA těchto tří transportních proteinů (Večeřa *et al.*, 2011).

Bakteriální endotoxin má také vliv na expresi transportérů ABCG5/8. Endotoxin je lipopolysacharid, který přispívá k zánětlivým procesům. Je hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií a je uvolněn až po buněčném dělení bakteriálních buněk nebo při jejich lýze. U myší, kterým byly podávány malé dávky lipopolysacharidu, docházelo ke snížení eliminace cholesterolu do žluče, stejně tak i ke snížení exprese jaterních transportérů ABCG5 a ABCG8 (Khovidhunkit *et al.*, 2003).

### **3.3.1.3 Sitosterolémie a role v ateroskleróze**

Případná mutace genů na chromozomu 2p21, které kódují transportéry ABCG5 a ABCG8, a následný nedostatek jejich exprese má za následek autozomálně recesivní onemocnění zvané sitosterolémie. Pacienti s tímto onemocněním vykazují výrazně zvýšené hladiny fytoosterolů a jen lehce zvýšené hladiny cholesterolu v plazmě. To je dáno hyperabsorpcí přírodních sterolů a cholesterolu z tenkého střeva a jejich redukovanou exkrecí do žluče. Mezi nejčastější fytoosteroly patří sitosterol, stigmasterol a kampesterol.

Pacienti s tímto onemocněním jsou především ohroženi předčasným rozvojem aterosklerózy a zvýšeným rizikem vzniku kardiovaskulárního onemocnění (Salen *et al.*, 2002). Ale ne vždy hrozí toto riziko, např. řepkový olej obsahující fytoosteroly přispívá

naopak k ochraně proti aterosklerogenezi. V řepkovém oleji jsou kromě fytosterolů také obsaženy látky s vysokou biologickou aktivitou, např. polyfenoly, tokoferoly (známé jako vitamín E) či koenzym Q (Xu *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že hladina rostlinných sterolů tedy nekoreluje s tvorbou ateroskleróz, proto není jejich aterogenní účinek přesně znám (Brown *et al.*, 2009).

Sitosterolémii lze léčit ezetimibem, který funguje jako inhibitor NPC1L1 transportéru. Jeho hypolipidemický účinek se využívá při dysfunkci transportérů ABCG5 a ABCG8. Sitosterolémie je však velmi vzácné onemocnění a na celém světě je prokázáno asi 100 případů (Matušková *et al.*, 2014).

Inhibice zpětného transportu cholesterolu z buněk může přispívat k ukládání cholesterolu v tepnách, zvláště u pacientů trpících obezitou, diabetem 2. typu nebo metabolickým syndromem (McGillicuddy *et al.*, 2009).

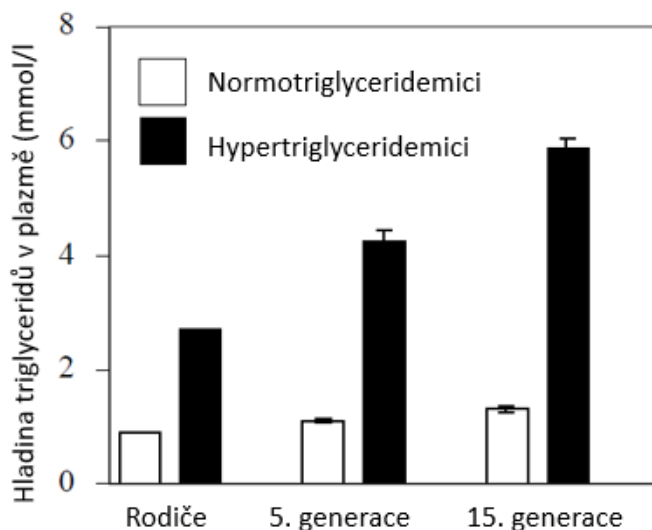
### **3.4 HHTg potkani**

Hypertriglyceridémie je rizikovým faktorem onemocnění tepen a účastní se vzniku aterosklerózy a hypertenze. Její přítomnost souvisí i s dalšími metabolickými poruchami, jako je inzulinová rezistence nebo snížený HDL-cholesterol. Všechny tyto poruchy se řadí mezi symptomy metabolického syndromu a patří mezi nejvýznamnější rizika kardiovaskulárních chorob. Z tohoto důvodu byl vyšlechtěn potkan, který má zvýšené plazmatické koncentrace TG. Tento potkan se označuje jako HHTg (hereditárně hypertriglyceridemický) a slouží ke studiu poruch metabolického syndromu (Zicha *et al.*, 2006).

#### **3.4.1 Vznik modelu**

Model HHTg potkana byl vyšlechtěn v Praze v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) a byl vyšlechtěn jako genetický model lidské hypertriglyceridémie z potkanů kmene Wistar. Doc. Antonín Vrána *et al.* (1990) pozorovali během svého experimentu, že vysokosacharózová dieta vede u potkanů k různým metabolickým a dalším patologickým změnám. Největší změna byla v plazmatické hladině TG. Jelikož koncentrace TG byla příliš vysoká, zkřížil tři páry potkanů s nejvyšší plazmatickou hladinou TG a tři páry naopak s nejnižší hladinou. Tímto křížením vznikla „normotriglyceridemická“ a „hypertriglyceridemická“ linie. Jejich potomci byly do desáté generace křížení ve vztahu bratranec x sestřenice, a poté křížení ve vztahu

bratr x sestra (Klimeš *et al.*, 1995). Protože je normotriglyceridemická linie méně fertilní a pomalu vymírá, začali se tito Wistar potkani používat jako kontroly (Vrána *et al.*, 1993). Na Obr. 4 je patrný velký rozdíl v hladině triglyceridů mezi patnáctou generací HHTg potkanů a normotriglyceridemickou kontrolou.



Obr. 4.: Hladina TG v krevní plazmě u normotriglyceridemické a hypertriglyceridemické linie potkanů na vysokosacharóзовé dietě v odlišných generacích (převzato a upraveno z Vrána *et Kazdová*, 1990).

### 3.4.2 Charakteristika HHTg modelu

Hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani byly vytvořeni jako nový genetický model pro studium metabolických abnormalit. Tito HHTg potkani vykazují hypertriglyceridémii, poruchy tolerance glukózy, hyperinzulinémii a inzulinovou rezistenci, aniž by tyto příznaky byly způsobeny přijímanou potravou. Příjem vysokosacharóзовé diety však může tyto příznaky prohloubit a zhoršit jejich účinek. Mají však normální hladiny plazmatického CCH. Na rozdíl od lidí, u kterých došlo k těmto symptomům, nevykazují tito potkani sklony k obezitě (Klimeš *et al.*, 1995).

Dále byly u těchto potkanů zjištěny vyšší hodnoty systolického, diastolického a středního tlaku, které korelují s hladinou TG v krevní plazmě a se zvýšeným obsahem sodíku v erythrocytech. Systolický tlak je u HHTg potkanů přibližně 165 mm Hg, zatímco u kontrolních Wistar potkanů 120 mm Hg. Diastolický tlak je u HHTg potkanů

okolo 115 mm Hg, u Wistar potkanů je přibližně 90 mm Hg (Stolba *et al.*, 1992). Krevní tlak bývá vyšší u samců než u samic HHTg potkanů, tudíž je hypertenze studována spíše na samcích (Kuneš *et al.*, 2002). Tento rozdíl je způsoben především odlišným fenotypem pohlaví, kdy vzrůstem větší samci mají více TG v plazmě (Kadlecová *et al.*, 2008).

Endogenní hypertriglyceridémie je u HHTg potkanů přítomna na lačno i postprandiálně. V játrech je zvýšená lipogeneze. Zvýšená sekrece TG z jater a nezměněná postheparinová plazmatická aktivita lipázy poukazují na hyperprodukční typ hypertriglyceridémie u HHTg potkanů (Klimeš *et al.*, 1995).

Test na toleranci glukózy po 60 a 120 min po podání 1 g glukózy na kg váhy prokázal zvýšení glykémie se zvýšenou koncentrací inzulínu v krevní plazmě. Tímto byla prokázána porucha v aktivitě inzulínu (Stolba *et al.*, 1992). Snížení schopnosti inzulínu může být výsledkem redukce schopnosti inzulínu přijímat glukózu do cílových tkání, nebo snížení počtu glukózových transportérů (především GLUT4) (Seböková *et al.*, 1995).

### **3.5 Metody studia exprese mRNA**

#### **3.5.1 Izolace mRNA**

Aktivita genu je charakterizována jeho transkripcí do mRNA, která je prvním krokem vedoucím k syntéze specifického proteinu. Existuje mnoho způsobů izolace mRNA, z nichž jedna je s použitím RNA lyzačního pufru, který obsahuje guanidiumthiokyanát. Tento pufr slouží k získání velmi kvalitních RNA vzorků. Díky jeho chaotropním vlastnostem velmi dobře denaturuje proteiny. Jedním z nejdůležitějších postupů izolace nukleových kyselin byl objev silica filtrů, které obsahují skleněná mikrovlákná. Ta jsou umístěna na dně malé plastové kolony, která je vložena do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Na membránu jsou poté navázány molekuly mRNA a zbytky molekul DNA jsou denaturovány přidáním enzymů deoxyribonukleas (Farrell, 2010). Menší molekuly RNA s méně než 200 nukleotidy jsou eliminovány.

#### **3.5.2 Syntéza cDNA**

Izolovaná mRNA nemůže být použita jako templát pro PCR amplifikaci, a proto musí být přepsána do komplementární jednovláknové molekuly DNA (cDNA). Molekula cDNA je stabilnější než molekula RNA. cDNA je produkt reverzní transkripce, která je



katalyzována enzymem reverzní transkriptasa (Bustin, 2000). Pro tuto reakci obvykle stačí méně než 1 µg RNA. Poté je cDNA amplifikována pomocí real-time PCR.

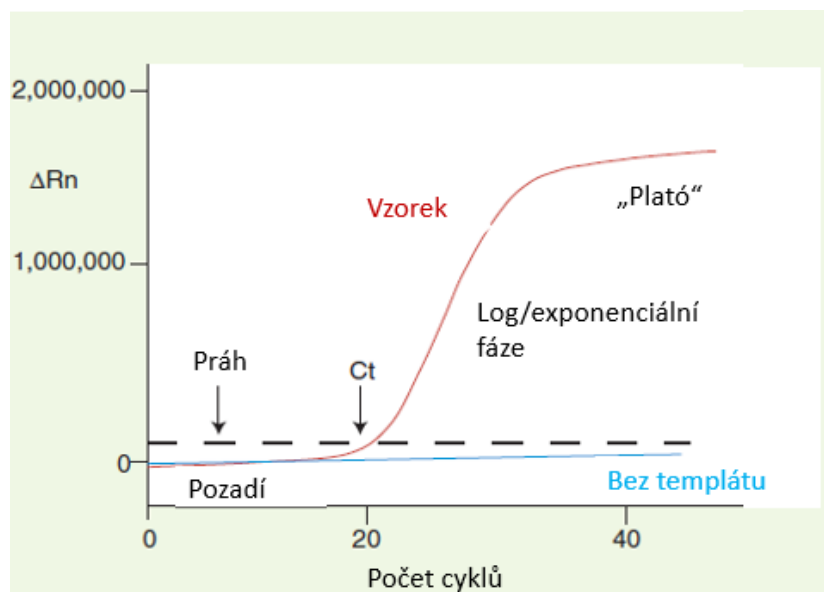
### 3.5.3 Real-time PCR

Klasická polymerázová řetězová reakce neboli PCR slouží k amplifikaci produktu (amplikonu), který je po skončení detekován elektroforeticky. Oproti klasické PCR, kvantitativní real-time PCR zajišťuje spolehlivou detekci a měření generovaných produktů v každém cyklu PCR reakce během exponenciální fáze. Odtud pochází název real-time PCR neboli polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Kvantifikace množství molekul nukleových kyselin je důležitá při detailním studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů.

K detekci amplifikovaných produktů v průběhu PCR se využívají interkalační barviva schopná se vázat na DNA, fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část amplifikovaného produktu, nebo fluorescenčně značené primery (Šmarda *et al.*, 2005). Mezi běžně používaná fluorescenční barviva patří SYBRGreen nebo hydrolyzační sonda Taqman. Taqman sondy mají na 5'-konci fluorofor a na 3'-konci zhášec. Pokud je cílová sekvence přítomna, sonda na ni nasedne a pak je hydrolyzovaná díky 5'-3' exonukleasové aktivitě Taq polymerasy během exponenciální fáze. Odpojení zhášeče od fluoroforu zvyšuje fluorescenci. Tento proces se opakuje v každém cyklu a vede k nárůstu fluorescence, jehož intenzita koreluje s množstvím amplikonů. Nárůst fluorescence během reakce PCR je detekován pomocí modifikovaného přístroje – termocykleru. Software, který je součástí přístroje, pak díky získaným emisím fluorescence během PCR amplifikace vytváří amplifikační křivku, která umožňuje porovnat průběh reakce u analyzovaných vzorků a na základě jejího průběhu stanovit tzv. hodnotu  $C_t$  (Arya *et al.*, 2014).

Podle fluorescenční aktivity lze amplifikační křivku real-time PCR rozdělit do tří fází (Obr. 5):

1. Fáze pozadí (baseline): Koncentrace amplifikovaného produktu je velmi nízká, tudíž je detekován slabý fluorescenční signál.
2. Exponenciální fáze: Dochází k exponenciálnímu růstu PCR produktů a tím i fluorescence.
3. „Plató“ fáze: Systém je nasycen. Amplifikace se snižuje až nedochází k tvoření dalších amplikonů.



Obr. 5: Modelová amplifikační křivka ilustrující běžně užívanou nomenklaturu během real-time PCR (upraveno a převzato z Arya *et al.*, 2014).

$\Delta R_n$ : fluorescence produktu v daný bod – fluorescence pozadí,  $C_t$ : cyklus, kdy fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce (threshold cycle).

V prvních cyklech PCR je detekován pouze slabý fluorescenční signál. Nejdůležitější je cyklus  $C_t$  (threshold cycle), kdy fluorescence překročí tzv. prahovou hodnotu detekce. Zvýšení fluorescence nad hodnotu  $C_t$  značí počátek detekce hromadícího se produktu (Dudová *et Hájek*, 2008). Čím více templátu se nachází na začátku reakce, tím méně cyklů je potřeba k dosažení bodu, kdy fluorescence dosáhne detekovatelných hodnot. Hodnota  $C_t$  je řazena vždy do prvních cyklů exponenciální fáze amplifikace. Na konci exponenciální fáze je množství reaktantů limitováno, rychlost amplifikace se snižuje, dokud PCR reakce neregeneruje nové PCR produkty. To je hlavním důvodem, proč se pracuje s hodnotou  $C_t$ . Měření počátečního počtu kopií je spolehlivější než měření koncového množství nahromaděného produktu. Během exponenciální fáze není žádná z reakčních složek limitována, a proto jsou  $C_t$  hodnoty dobře reprodukovatelné pro opakované pokusy se stejným počátečním množstvím (Arya *et al.*, 2014).

Existují dva typy kvantifikační strategie – absolutní a relativní. Absolutní kvantifikace slouží ke stanovení přesného počtu kopií templátu ve vzorku, zatímco relativní stanovení slouží ke sledování změn množství templátu mezi vzorky vzhledem k interní kontrole. Jako interní kontrola se využívá tzv. housekeeping gen, který má podobnou

hladinu exprese v jednotlivých testovaných vzorcích. Nejčastěji se používají geny pro albumin,  $\beta$ -aktin,  $\beta$ -globin nebo Hprt (Dudová *et* Hájek, 2008). Pro relativní stanovení genové exprese se nejvíce využívá komparativní  $C_t$  metoda známější jako metoda  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Tato metoda využívá několik předpokladů, včetně toho, že se účinnost PCR blíží hodnotě 1 a že účinnost PCR cílového genu je podobná té interního genu (Schmittgen *et al.*, 2008).

## 4 MATERIÁL a METODY

### 4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál byla použita část tenkého střeva získaná z 23 samců hereditárně hypertriglyceridimického (HHTg) potkana (stáří 3 měsíce, hmotnost 340-350 g). Zvířata byla chována za standardních laboratorních podmínek s volným přístupem ke krmivu a vodě. Laboratorní zvířata byla rozdělena do čtyř skupin, přičemž ve třech skupinách bylo šest jedinců a v poslední pět. Potkani byli krmeni standardní laboratorní dietou (STD; kontrolní skupina) a v případě tří experimentálních skupin byla STD obohacena o mikronizovaný silymarin (1 % v STD), o směs n-3 polynenasycených mastných kyselin EPA a DHA (300 mg·kg<sup>-1</sup>·den<sup>-1</sup>), nebo kombinaci mikronizovaného silymarinu a směsi EPA a DHA. Po čtyřech týdnech byla zvířata dekapitována, exsanguinována a části odebraných orgánů byly ihned vloženy do stabilizačního pufru a poté zamrazeny na -70 °C pro pozdější použití k analýze.

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

### 4.2 Použité soupravy a chemikálie

#### Použité chemikálie

- ABCG5 TaqMan® Gene Expression Assays (Kat. č. Rn01499073\_m1, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA)
- ABCG8 TaqMan® Gene Expression Assays (Kat. č. Rn00590367\_m1, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA)
- HPRT TaqMan® Gene Expression Assays (Kat. č. Rn01527840\_m1, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA)
- n-3 polynenasycené mastné kyseliny: směs 310 mg kyselina dokosaheptaenové (DHA) a 43 mg kyseliny eikosapentaneové (EPA) (Kat. č. 130616, Smart City S.A., Lucemburk, LU)
- Silymarin mikronizovaný (Favea, Kopřivnice, ČR)

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

#### **Použité soupravy**

- Homogenizační zkumavky Precellys Evolution (Bertin Industries, Rockville, Maryland, USA)
- LightCycler® 1536 DNA Probes Master Kit (Kat. č. 05502381001, Roche – Diagnostická divize, Praha, ČR)
- RNeasy® Plus Mini Kit (Kat. č. 74134 a 74136, Qiagen, Hilden, D)
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Kat. č. 05081963001, Roche – Diagnostická divize, Praha, ČR)

### **4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

- Centrifuga Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburk, D)
- Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf, Hamburk, D)
- Centrifuga Multi-spin (Biosan, Riga, LV)
- DNA/RNA UV-cleaner box, UVC/T-AR (Biosan, Riga, LV)
- Homogenizátor tkání Precellys Evolution (Bertin Industries, Rockville, Maryland, USA)
- Kapalinový manipulátor Echo 550 (Labcyte, San José, Kalifornie, USA)
- Laminární box biohazard (Merci, Brno, ČR)
- Mikropipety research 200; 100; 20; 10; 2,5 µl (Eppendorf, Hamburk, D)
- Spektrofotometr NanoPhotometr® N60 (Implen, Mnichov, D)
- Termocykler Epgradient S (Eppendorf, Hamburk, D)
- Termocykler LightCycler 1536 Instrument (Roche Praha, ČR)

### **4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

#### **4.4.1 Izolace mRNA**

Z 23 odebraných tenkých střev HHTg potkanů byla izolována mRNA pomocí RNeasy® Plus Mini Kitu dle postupu RNeasy® Micro handbook 1/2011 (Qiagen, Hilden, D). Rozdělení potkanů v jednotlivých skupinách je popsáno již v kapitole 4.1.

Těsně před izolací byla připravena směs RTL pufru, který je součástí kitu, a 2-merkapt ethanolu, kdy na 1 ml RTL pufru bylo přidáno 10 µl 2-merkapt ethanolu. 600 µl této směsi bylo napipetováno do homogenizačních zkumavek a k nim bylo

přidáno přibližně 20 mg střešní tkáně. Tkáň byla homogenizována v přístroji Precellys s programem 4x 10 s při 7500 ot $\cdot$ min<sup>-1</sup>. Poté byla tkáň ještě jednou zhomogenizována při 6500 ot $\cdot$ min<sup>-1</sup> 3x 20 s. Zkumavky s homogenátem byly stočeny 1 min při 11400 g.

Lyzát byl přelit na QIAshredder spin kolonku umístěnou ve 2ml mikrozukumavce. Mikrozukumavka byla centrifugována 75 s při 11400 g. Supernatant byl přemístěn do čisté mikrozukumavky s novou kolonkou. Zkumavka byla centrifugována 30 s při 7000 g. Kolonka byla vyhozena a k supernatantu bylo přidáno 600  $\mu$ l 70% ethanolu. Po promísení byl roztok napipetován na RNeasy MinElute spin kolonku umístěnou ve 2ml zkumavce. Mikrozukumavka s kolonkou byla centrifugována při 7000 g 15 s, poté byla odstraněna kapalina, která prošla kolonkou. Na kolonu byl přidán zbytek z mikrozukumavky s 70% ethanolem a proces byl zopakován, aby došlo k navázání RNA na membránu. Na kolonku s izolovanou RNA bylo napipetováno 700  $\mu$ l RW1 pufru, který je opět součástí kitu, poté byla mikrozukumavka s kolonkou centrifugována při 7000 g 15 s. Prošlá kapalina byla odstraněna a na kolonu bylo přidáno 500  $\mu$ l promývacího pufru (80% ethanol). Opět byla mikrozukumavka s kolonkou centrifugována při 7000 g 15 s. Prošlá kapalina byla odstraněna a na kolonku bylo napipetováno 700  $\mu$ l RPE pufru, který je také součástí kitu. Mikrozukumavka s kolonkou byla centrifugována při 7000 g 15 s. Prošlá kapalina byla odstraněna a na kolonu bylo přidáno 500  $\mu$ l promývacího pufru (80% ethanol). Mikrozukumavka s kolonkou byla centrifugována při 7000 g 180 s. Kolonka byla přemístěna do čisté 2ml mikrozukumavky. Mikrozukumavka s kolonkou byla centrifugována při 14000 g 60 s, aby došlo k odstranění zbytkového ethanolu na membráně. Na střed kolony bylo napipetováno 25  $\mu$ l vody zbavené RNáz (součástí kitu) a mikrozukumavka byla centrifugována při 8000 g 60 s. Míra čistoty a koncentrace izolované mRNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí NanoPhotometru<sup>®</sup> N60. Měřil se poměr vlnových délek 260/280 nm a 260/230 nm. Tento postup byl opakován u všech vzorků.

Vzorky byly uchovávány při -70 °C.

#### **4.4.2 Syntéza cDNA**

Syntéza cDNA z izolované mRNA byla provedena pomocí Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kitu dle postupu protokolu z příručky vytvořené 11/2008 (Roche – Diagnostická divize, Praha, ČR).

Izolovaná mRNA byla přepsána do cDNA pomocí RT a dále byla takto vytvořená cDNA amplifikována pomocí PCR. Nejprve byla připravena směs templátu a primeru dle Tab. 1. pro jednu reakci o celkovém objemu 20  $\mu\text{l}$ . Připravená směs byla rozpipetována do 0,2ml PCR mikrozkušavek po 11,4  $\mu\text{l}$ .

Tab. 1: Složení směsi templát-primer.

| <b>Chemikálie</b>              | <b>Koncentrace pracovního roztoku</b>                 | <b>Konečná koncentrace/množství</b>     | <b>Pipetovaný objem na 1 test</b> |
|--------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| RNA                            | různá   | 1 $\mu\text{g}$                         | různý                             |
| Oligo(dT) <sub>18</sub> primer | 50 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$                 | 0,75 $\mu\text{lmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,3 $\mu\text{l}$                 |
| Random hexamer primer          | 600 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$                | 51 $\mu\text{lmol}\cdot\text{l}^{-1}$   | 1,7 $\mu\text{l}$                 |
| PCR voda                       | doplnit tak, aby byl celkový objem 11,4 $\mu\text{l}$ |   |                                   |
| Celkem                         |   | 11,4 $\mu\text{l}$                      |                                   |
| Celkový objem                  |   | 20 $\mu\text{l}$                        |                                   |

Směs templát-primer v mikrozkušavkách byla denaturována zahřátím na 65 °C po dobu 10 min v Termocykler Eppendorf S a poté byly mikrozkušavky ochlazeny na ledu. Do mikrozkušavky se směsí templát-primer byla přidána PCR směs obsahující reverzní transkriptázu viz Tab. 2.

Tab. 2: Složení PCR směsi s reverzní transkriptasou.

| <b>Chemikálie</b>   | <b>Koncentrace<br/>pracovního roztoku</b> | <b>Konečná<br/>koncentrace</b> | <b>Pipetovaný<br/>objem na 1 test</b> |
|---|---|--------------------------------|---------------------------------------|
| Transcriptor High<br>Fidelity reverzní<br>transkriptasa reakční<br>pufr | 5x  | 1x                             | 4,0 µl                                |
| Protektor – inhibitor<br>Rnas   | 40 U·µl <sup>-1</sup>                     | 20 U                           | 0,5 µl                                |
| Deoxynukleotidová<br>směs   | 10 mmol.l <sup>-1</sup>                   | 1 mmol.l <sup>-1</sup>         | 2,0 µl                                |
| DTT   | 100 mmol.l <sup>-1</sup>                  | 5 mmol.l <sup>-1</sup>         | 1,0 µl                                |
| Transcriptor High<br>Fidelity reverzní<br>transkriptasa                 | 9 U·µl <sup>-1</sup>                      | 10 U                           | 1,1 µl                                |
| PCR voda  |   |                                | 0,6 µl                                |
| Celkem  |   | 8,6 µl                         |                                       |
| Celkový objem   |   | 20 µl                          |                                       |

Smíchané směsi byly inkubovány v termocykleru Eppgradient S 10 min při 45 °C. Poté byla reverzní transkriptasa inaktivována zahřátím na 85 °C po dobu 5 min. Následně byly mikrozkuřavky s chemikáliemi dány na led, aby se reakce zastavila. Takto vytvořená cDNA byla použita pro další amplifikaci.

#### **4.4.3 Real-time PCR**

Real-time PCR s vytvořenými cDNA vzorky byla provedena pomocí LightCycler® 1536 DNA Probes Master Kitu dle protokolu verze č. 4 01/2013 (Roche).

Do dvou 384jamkových mikrotitračních destiček byla napipetována cDNA dle Obr. 6 a PCR směs dle Obr. 7.



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

Obr. 6: Schéma pipetování cDNA na 384jamkovou mikrotitrační destičku.

N: negativní kontrola, 1–23: vzorek 1–23.

|   |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---|---|----|----|---|---|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|   | 1 | 2  | 3  | 4 | 5 | 6  | 7  | 8 | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| A |   | g5 | g8 |   |   | Ac | Hp |   | g5 | g8 |    |    | Ac | Hp |    | g5 | g8 |    |    | Ac | Hp |    |    |    |
| B |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| C |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| D |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| E |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| F |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| G |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| H |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| I |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| J |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| K |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| L |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| M |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| N |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| O |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| P |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Obr. 7: Schéma pipetování PCR směsi s příslušnými chemikáliemi ze souprav TaqMan gene expression assay na 384jamkovou mikrotitrační destičku.

g5: Abcg5, g8: Abcg8, Ac: Actb, Hp: Hprt geny.

Tyto 384jamkové destičky sloužily jako zdrojové destičky. Z rozložení 1536jamkové mikrotitrační destičky (Obr. 8) byl vypočítán objem pipetovaný do 384jamkových destiček dle Tab. 3 a 4.

Tab. 3: Výpočet objemu pipetovaného do zdrojové destičky pro cDNA.

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| Objem cDNA [ $\mu$ l]        | 0,5       |
| Počet řádků                  | 4         |
| Počet sloupců                | 14        |
| Počet jamek celkem           | 56        |
| Objem cDNA celkem [ $\mu$ l] | 28        |
| Mrtvý objem [ $\mu$ l]       | 15        |
| Rezerva [ $\mu$ l]           | 5         |
| Objem na 1 jamku [ $\mu$ l]  | <b>48</b> |
| cDNA [ $\mu$ l]              | 4,8       |
| PCR Voda [ $\mu$ l]          | 38,4      |
| Setup control 20x [ $\mu$ l] | 4,8       |

Do jamky označené písmenem N byla místo cDNA napipetována PCR voda, tudíž byl obsah této jamky 43,2  $\mu$ l vody a 4,8  $\mu$ l setup control, která slouží pro kontrolu pipetování dalších složek v kombinaci s PCR směsí.

Tab. 4: Výpočet objemu pipetovaného do zdrojové destičky pro PCR směs.

|  |           |
|--|-----------|
| Objem PCR směsi [ $\mu\text{l}$ ]                            | 0,5       |
| Počet řádků  | 32        |
| Počet sloupců  | 6         |
| Počet jamek celkem   | 192       |
| Objem PCR směsi celkem [ $\mu\text{l}$ ]                     | 96        |
| Mrtvý objem [ $\mu\text{l}$ ]                                | 15        |
| Rezerva [ $\mu\text{l}$ ]                                    | 5         |
| Objem na 3 jamky [ $\mu\text{l}$ ]                           | 116       |
| Objem na 1 jamku [ $\mu\text{l}$ ]                           | <b>52</b> |
| PCR směs [ $\mu\text{l}$ ]                                   | 20,8      |
| Příslušné Taqman Gene expression assay 20x [ $\mu\text{l}$ ] | 5,2       |
| PCR voda [ $\mu\text{l}$ ]                                   | 26        |

Určený objem cDNA a chemikálií bylo do jedné navržené LightCycler® 1536jamkové mikrotitrační destičky rozpipetováno automatickým kapalinovým manipulátorem Echo 550 dle nastaveného programu (Obr. 8 a 9). Celkový objem v jedné jamce je zobrazen v Tab. 5.

|    | 1   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 |  |  |  |  |  |  |  |
|----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|--|--|--|--|--|--|
| A  | NTC |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 8  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 16 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| B  | NTC |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 8  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 16 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| C  | NTC |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 8  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 16 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| D  | NTC |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 8  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 16 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| E  | 1   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 9  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 17 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| F  | 1   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 9  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 17 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| G  | 1   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 9  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 17 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| H  | 1   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 9  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 17 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| I  | 2   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 10 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 18 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| J  | 2   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 10 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 18 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| K  | 2   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 10 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 18 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| L  | 2   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 10 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 18 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| M  | 3   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 11 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 19 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| N  | 3   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 11 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 19 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| O  | 3   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 11 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 19 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| P  | 3   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 11 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 19 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| Q  | 4   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 12 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 20 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| R  | 4   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 12 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 20 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| S  | 4   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 12 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 20 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| T  | 4   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 12 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 20 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| U  | 5   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 13 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 21 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| V  | 5   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 13 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 21 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| W  | 5   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 13 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 21 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| X  | 5   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 13 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 21 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| Y  | 6   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 14 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 22 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| AA | 6   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 14 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 22 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| AB | 6   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 14 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 22 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| AC | 6   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 14 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 22 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| AD | 7   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 15 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 23 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| AE | 7   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 15 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 23 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| AF | 7   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 15 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 23 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |
| AG | 7   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 15 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 23 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |

Obr. 8: Schéma pipetování cDNA na 1536jamkovou mikrotitrační destičku.

Barevná čísla 1–23: vzorky 1–23, NTC: negativní kontrola.

|    | 1 | 2 | 3     | 4 | 5     | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11   | 12   | 13 | 14 | 15 | 16 | 17    | 18 | 19    | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25   | 26   | 27 | 28 | 29 | 30 | 31    | 32 | 33    | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39   | 40   | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 |  |  |  |  |  |  |
|----|---|---|-------|---|-------|---|---|---|---|----|------|------|----|----|----|----|-------|----|-------|----|----|----|----|----|------|------|----|----|----|----|-------|----|-------|----|----|----|----|----|------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|--|--|--|--|--|--|
| A  |   |   | Abcg5 |   | Abcg8 |   |   |   |   |    | Actb | Hprt |    |    |    |    | Abcg5 |    | Abcg8 |    |    |    |    |    | Actb | Hprt |    |    |    |    | Abcg5 |    | Abcg8 |    |    |    |    |    | Actb | Hprt |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| B  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| C  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| D  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| E  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| F  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| G  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| H  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| I  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| J  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| K  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| L  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| M  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| N  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| O  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| P  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| Q  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| R  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| S  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| T  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| U  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| V  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| W  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| X  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| Y  |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| AA |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| AB |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| AC |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| AD |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| AE |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| AF |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| AG |   |   |       |   |       |   |   |   |   |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |       |    |       |    |    |    |    |    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |

Obr. 9: Schéma pipetování PCR směsi s příslušnými chemikáliemi ze souprav Taqman Gene expression assay na 1536jamkovou mikrotitrační destičku.

Tab. 5: Objem jedné jamky na 1536jamkové destičce.

| Chemikálie                                 | Objem v jedné jamce [ $\mu$ l] |
|--|--------------------------------|
| PCR směs 5x                                | 0,20                           |
| Příslušné Taqman Gene expression assay 20x | 0,05                           |
| cDNA                                       | 0,05                           |
| PCR voda                                   | 0,65                           |
| Setup Control 20x                          | 0,05                           |

Poté, co byla deska napipetována kapalinovým manipulátorem, byla destička přelepena fólií. Deska byla centrifugována 2 min při 1500 g. Po centrifugaci byla deska vložena do LightCycleru 1536 Instrument, na kterém byl zapnut příslušný program viz Tab. 6.

Tab. 6: Podmínky real-time PCR amplifikace

| Proces         | Teplota [ $^{\circ}$ C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|----------------|-------------------------|---------|-------------|
| Pre-denaturace | 95                      | 60      | 1           |
| Denaturace     | 95                      | 5       |             |
| Hybridizace    | 60                      | 30      | 45          |
| Elongace       | 60                      |         |             |
| Ochlazení      | 40                      | 10      | 1           |

#### 4.4.4 Analýza exprese mRNA pomocí $\Delta\Delta C_t$ metody

Pro relativní stanovení genové exprese byla použita komparativní  $\Delta\Delta C_t$  metoda. Tato metoda byla počítána podle způsobu, který zavedli Livak *et* Schmittgen (2001). Metoda slouží k normalizaci dat, které jsou získány z různého množství mRNA. V této metodě se porovnává exprese cílového genu a exprese referenčního neboli housekeeping genu,

kde:  $\Delta\Delta C_t = (C_{t, \text{cílový gen}} - C_{t, \text{referenční gen}})_{\text{čas x}} - (C_{t, \text{cílový gen}} - C_{t, \text{referenční gen}})_{\text{čas 0}}$ .

Čas  $x$  probíhá během testovacích podmínek, zatímco čas 0 značí normální podmínky. Pro referenční gen je  $\Delta\Delta C_t$  rovna nule a  $2^0$  je jedna, proto jsou změny v relativní expresi genů k referenčním genům počítány jako  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak *et* Schmittgen, 2001).

#### **4.4.5 Statistické hodnocení výsledků**

U všech dat získaných komparativní metodou  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  bylo provedeno statistické hodnocení s využitím programu Statistica 12 (StatSoft, Praha ČR). Pro statistické hodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test, který porovnává všechny skupiny mezi sebou, a Mann-Whitneyho  $U$  test, který porovnává jen 2 vybrané skupiny. Testování významnosti bylo provedeno na hladině významnosti 0,05.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Izolace mRNA

Byla izolována mRNA z 23 tkání tenkého střeva HHTg potkanů, kterým byla po dobu čtyř týdnů podávána obohacená strava s nebo bez vybraných přírodních látek. Potkani byly rozděleni do tří experimentálních skupin a jedné kontrolní skupiny. mRNA byla izolována pomocí RNeasy® Plus Mini Kitu. Koncentrace byla poté změřena pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60 (viz Tab 7).

Poměr absorbancí 260/280 nm udává míru čistoty nukleových kyselin. U RNA je optimální 2,0. Poměr absorbancí 260/230 nm udává míru čistoty, která by měla být v rozmezí 2,0–2,2. Nižší hodnoty značí přítomnost sacharidů, zbytkového fenolu, nebo jiných rozpouštědel.



Tab. 7: Koncentrace a míra čistoty izolované mRNA stanovené pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60.

| Skupina             | Číslo vzorku | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ | Koncentrace<br>[ng $\mu\text{l}^{-1}$ ] |
|---------------------|--------------|---------------|---------------|---|
| Kontrola            | 1            | 2,18          | 2,02          | 298,30                                  |
|                     | 2            | 2,20          | 2,17          | 2825,00                                 |
|                     | 3            | 2,17          | 2,20          | 2088,70                                 |
| Silymarin           | 4            | 2,02          | 2,16          | 1693,90                                 |
|                     | 5            | 2,16          | 2,08          | 2142,80                                 |
|                     | 6            | 2,15          | 2,24          | 2064,20                                 |
| PUFA                | 7            | 2,19          | 1,95          | 1720,60                                 |
|                     | 8            | 2,18          | 2,33          | 4654,50                                 |
|                     | 9            | 2,12          | 2,23          | 3020,30                                 |
| PUFA +<br>silymarin | 10           | 2,15          | 2,31          | 3570,30                                 |
|                     | 11           | 2,15          | 2,34          | 4482,50                                 |
|                     | 12           | 2,07          | 2,32          | 1784,20                                 |
| Kontrola            | 13           | 2,21          | 2,21          | 702,10                                  |
|                     | 14           | 2,17          | 2,14          | 488,30                                  |
|                     | 15           | 2,08          | 2,06          | 399,70                                  |
| Silymarin           | 16           | 2,16          | 2,30          | 546,00                                  |
|                     | 17           | 2,05          | 2,34          | 1260,40                                 |
|                     | 18           | 2,15          | 2,26          | 3201,60                                 |
| PUFA                | 19           | 2,17          | 2,25          | 5577,80                                 |
|                     | 20           | 2,06          | 2,46          | 1662,30                                 |
|                     | 21           | 2,07          | 2,45          | 1996,50                                 |
| PUFA +<br>silymarin | 22           | 2,16          | 2,31          | 4437,60                                 |
|                     | 23           | 2,08          | 2,40          | 2810,80                                 |

PUFA: polynenasycené mastné kyseliny.

## 5.2 Syntéza cDNA

Izolovaná mRNA byla přepsána do cDNA pomocí Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kitu za použití reverzní transkriptasy, random hexamer primerů a oligo(dT)<sub>18</sub> primerů. U každého vzorku byl dopočítán objem přidané mRNA tak, aby bylo v konečném roztoku vzorku 1 µg mRNA. Poté byl dopočítán objem vody do celkového objemu reakce 11,4 µl (viz Výpočet 1). Vyizolovaná cDNA byla použita pro další amplifikaci.

Výpočet 1: Výpočet objemu mRNA vzorku 1 tak, aby v konečném roztoku byl 1 µg mRNA. Koncentrace mRNA stanovená pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60 ve vzorku 1 byla 298,30 ng·µl<sup>-1</sup>.

$$298,30 \text{ ng} \dots 1 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\frac{1000 \text{ ng} \dots \dots \dots x \text{ } \mu\text{l}}$$

$$x = 3,35 \text{ } \mu\text{l mRNA vzorku 1}$$

Poté byl dopočítán objem vody tak, aby byl celkový objem reakce 11,4 µl. Celkový objem primerů na reakci byl 2 µl.

$$11,4 - (3,35 + 2) = 6,05 \text{ } \mu\text{l vody}$$

Takto byly dopočítány objemy pro všech 23 vzorků.

## 5.3 Real-time PCR

Real-time PCR byla provedena s vytvořenými cDNA vzorky pomocí LightCycler® 1536 DNA Probes Master Kitu dle protokolu verze č. 4 01/2013 (Roche – Diagnostická divize, Praha, ČR). Jako sondy a primery byly použity Abcg5 a Abcg8 Taqman Gene Expression Assay, které obsahují jak specifické primery, tak sondy. Nejprve byly napipetovány dvě 384jamkové mikrotitrační destičky, které sloužily jako zdrojové destičky pro kapalinový manipulátor Echo 550. Na jednu destičku byla napipetována směs obsahující cDNA pro každý vzorek a jedna jamka obsahovala místo cDNA vodu (negativní kontrola). Do druhé destičky byla napipetována PCR směs s příslušnými Taqman sondami. Následně byla směs rozpipetována ze zdrojových destiček na jednu 1538jamkovou destičku kapalinovým manipulátorem dle schématu uvedeném na Obr. 8 a 9. V termocykleru LightCycler® 1536 Instrument proběhla amplifikace daného

segmentu cDNA a zároveň byl měřen nárůst fluorescence. Naměřené hodnoty  $C_t$  byly zaznamenávány přístrojem LightCycler® 1536 přímo do souboru Excel.

#### 5.4 Analýza exprese mRNA pomocí $\Delta\Delta C_t$ metody

Výsledky byly zpracovány komparativní metodou  $\Delta\Delta C_t$ , počítány metodou  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  dle autorů Livak *et* Schmittgen(2001). Výsledky byly normalizovány a vztaženy k referenčnímu genu Hprt (viz Tab. 8). Všechny výsledky jsou uvedeny v Tab. 9 jako průměr  $\pm$  směrodatné odchylky (SD) a tyto hodnoty vyneseny do grafu (Obr. 10).

Tab. 8: Normalizace vzorků zpracovaných metodou  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ke kontrolní hodnotě 1.

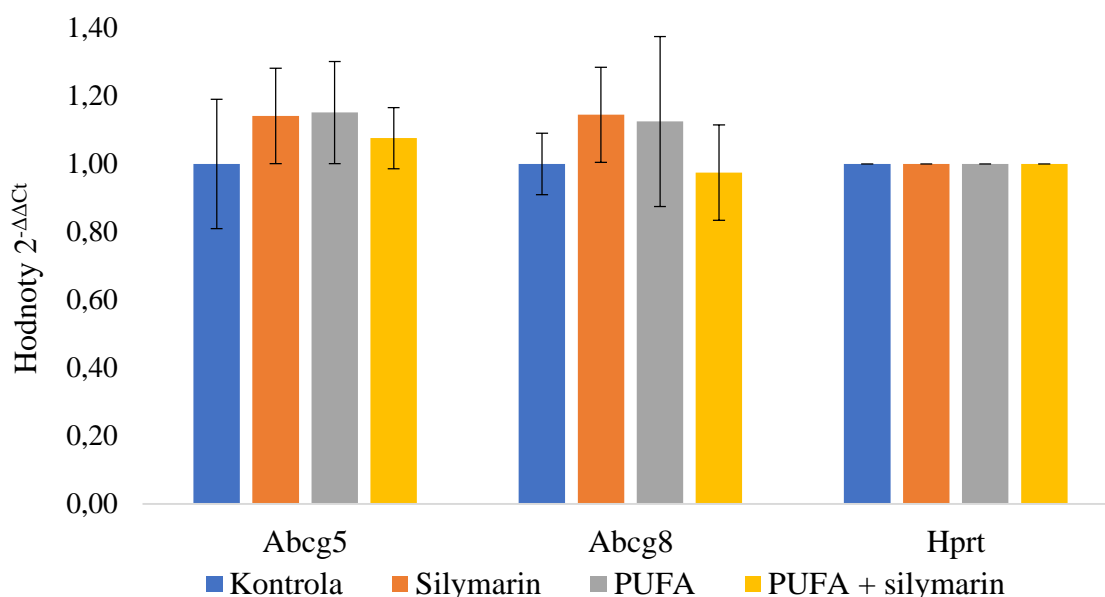
|                     | Vzorek | Abcg5 | Abcg8 | Hprt |
|---------------------|--------|-------|-------|------|
| Kontrola            | 1      | 1,02  | 0,99  | 1,00 |
|                     | 2      | 0,83  | 1,10  | 1,00 |
|                     | 3      | 0,72  | 0,84  | 1,00 |
|                     | 13     | 1,06  | 1,07  | 1,00 |
|                     | 14     | 1,21  | 1,03  | 1,00 |
|                     | 15     | 1,16  | 0,98  | 1,00 |
| Silymarin           | 4      | 1,11  | 1,34  | 1,00 |
|                     | 5      | 0,99  | 1,08  | 1,00 |
|                     | 6      | 1,14  | 1,07  | 1,00 |
|                     | 16     | 1,32  | 1,03  | 1,00 |
|                     | 17     | 1,30  | 1,32  | 1,00 |
|                     | 18     | 0,99  | 1,03  | 1,00 |
| PUFA                | 7      | 1,32  | 1,39  | 1,00 |
|                     | 8      | 1,04  | 0,99  | 1,00 |
|                     | 9      | 0,97  | 0,83  | 1,00 |
|                     | 19     | 1,07  | 0,92  | 1,00 |
|                     | 20     | 1,34  | 1,42  | 1,00 |
|                     | 21     | 1,17  | 1,21  | 1,00 |
| PUFA +<br>silymarin | 10     | 0,99  | 0,86  | 1,00 |
|                     | 11     | 1,00  | 0,88  | 1,00 |
|                     | 12     | 1,20  | 1,18  | 1,00 |
|                     | 22     | 1,08  | 0,91  | 1,00 |
|                     | 23     | 1,12  | 1,04  | 1,00 |

PUFA: polynenasycené mastné kyseliny.

Tab. 9: Průměr a směrodatné odchylky normalizovaných vzorků zpracovaných metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

|                  | Abcg5  |      | Abcg8  |      | Hprt   |      |
|------------------|--------|------|--------|------|--------|------|
|                  | Průměr | SD   | Průměr | SD   | Průměr | SD   |
| Kontrola         | 1,00   | 0,19 | 1,00   | 0,09 | 1,00   | 0,00 |
| Silymarin        | 1,14   | 0,14 | 1,14   | 0,14 | 1,00   | 0,00 |
| PUFA             | 1,15   | 0,15 | 1,12   | 0,25 | 1,00   | 0,00 |
| PUFA + silymarin | 1,08   | 0,09 | 0,97   | 0,14 | 1,00   | 0,00 |

PUFA: polynenasycené mastné kyseliny; SD: směrodatné odchyly.



Obr. 10: Hodnoty  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  sledovaných genů transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 v tenkém střevě HHTg potkanů po čtyřech týdnech podávané diety.

Kontrola: standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin: STD + mikronizovaný silymarin, PUFA: STD + n-3 polynenasycené mastné kyseliny, PUFA + silymarin: STD + silymarin + n-3 polynenasycené mastné kyseliny.

Na Obr. 10 lze vidět, že došlo k mírným změnám v expresi genů Abcg5 a Abcg8 u HHTg potkanů, kteří byli krmeni STD obohacenou o přírodní látky (silymarin, PUFA) v porovnání s kontrolou. Mírné zvýšení v expresi Abcg5 a Abcg8 způsobila

dieta s obsahem silymarinu nebo PUFA. U genu *Abcg5* došlo i k nepatrnému zvýšení exprese u skupiny krmené silymarinem + PUFA v porovnání s kontrolní skupinou. Všechny tyto změny v expresi mRNA *Abcg5* a *Abcg8* jsou však tak malé, že je nelze považovat za významné. Kraskal-Wallisův test i Mann-Whitneyův *U* test prokázali na hladině významnosti 0,05, že rozdíly v expresi genů *Abcg5* a *Abcg8* na úrovni mRNA nejsou mezi skupinami statisticky významné.

## 6 DISKUZE

Metabolický syndrom je souborem mnoha metabolických faktorů, kvůli kterým může docházet ke vzniku diabetu II. typu či kardiovaskulárním onemocněním. Jedním z rizikových faktorů je i vysoký obsah cholesterolu, a to především LDL-cholesterolu, který způsobuje aterosklerózu neboli ucpávání tepen. Mnoho let se užívají hypolipidemika ke snížení LDL cholesterolu, a přesto jsou kardiovaskulární onemocnění jedny z nejběžnějších po celém světě. Studium proteinů regulující transport cholesterolu by mohl směřovat v budoucnu k tvorbě nových léčiv (Brown *et al.*, 2009). Mezi zajímavé proteiny v této oblasti patří heterodimery transportních proteinů ABCG5 a ABCG8, které se podílejí na zpětném transportu cholesterolu a napomáhají jeho eliminaci z těla.

V rámci této práce byla stanovena exprese mRNA transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 u čtyř skupin HHTg potkanů, kteří jsou akceptováni jako model metabolického syndromu. Tyto čtyři testované skupiny HHTg potkanů byly krmeny *ad libitum* po dobu čtyř týdnů experimentální dietou. První skupina byla krmena pouze STD, druhá skupina byla krmena STD s 1% silymarinem, třetí skupina byla krmena STD se směsí PUFA (EPA a DHA; 300 mg·kg<sup>-1</sup>·den<sup>-1</sup>) a čtvrtá skupina byla krmena kombinací silymarinu a PUFA v STD. Z tenkého střeva byla izolovaná mRNA, ta byla poté přepsána do cDNA a nakonec byla provedena amplifikace pomocí real-time PCR. Z mých výsledků lze vidět, že exprese mRNA obou genů se mírně zvýšila u skupiny jedinců krměných dietou obohacenou o silymarin a u skupiny krměné dietou s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami. Toto zvýšení však není statisticky významné. Mohu tedy říci, že silymarin, PUFA i kombinovaná dieta nezpůsobily změnu v expresi genů *Abcg5* a *Abcg8* na úrovni mRNA ve střevní tkáni HHTg potkana.

Již dříve byly prokázány pozitivní účinky silymarinu u potkanů kmene Wistar, kteří byli krměni vysokocholesterolovou dietou a silymarinem. U těchto potkanů byla zjištěno, že silymarin znatelně zvýšil mRNA expresi obou jaterních transportérů ABCG5 a ABCG8. Výsledky této studie poukazují, že silymarin pozitivně ovlivňuje hladinu lipoproteinů v krevní plazmě regulací těchto ABC transportérů (Večeřa *et al.*, 2011).

Poruba *et al.* (2015a) popsali pozitivní účinek tří forem silymarinu u HHTg potkanů, u kterých došlo ke zvýšení exprese proteinů ABCG5 a ABCG8 v játrech. Všechny formy silymarinu vykazovaly hypotriglyceridemický a hypocholesterolemický efekt

a zvýšily HDL cholesterol v krevní plazmě (Poruba *et al.*, 2015a). Přesný mechanismus hypolipidemické aktivity silymarinu však není znám. Zvyšující se exprese jaterních ABCG5 a ABCG8 naznačuje, že silymarin může být ligandem pro jaterní X receptor (LXR), který je jedním z hlavních transkripčních faktorů pro tyto transportéry (Ji *et al.*, 2008).

Co se týče kyselin PUFA, nedávno bylo zjištěno (data nepublikována), že PUFA samotné způsobují 5násobné zvýšení v expresi mRNA genu *Abcg5* ( $p < 0.01$ ) a 7násobné zvýšení v expresi mRNA genu *Abcg8* ( $p < 0.01$ ) v jaterní tkáni potkana. Studie navíc ukázala, že kombinace PUFA se silymarinem prohlubuje toto zvýšení v expresi mRNA jaterních genů *Abcg5* a *Abcg8*, 9násobné ( $p < 0.01$ ), resp. 13násobné zvýšení ( $p < 0.01$ ) v porovnání s kontrolní skupinou (skupina potkanů na dietě bez obsahu studovaných přírodních látek). Tento efekt však nebyl prokázán ve střevní tkáni, jak popisují výsledky této práce. Proč tento efekt nebyl prokázán, není zcela jasné, a proto je třeba provést další měření, které by vysvětlilo rozdílné efekty vybraných přírodních látek v různých orgánech HHTg potkana.

Současný výzkum, který se zaměřuje na snižování cholesterolu v organismu, zkoumá, jaké látky zvyšují expresi těchto ABCG5 a ABCG8 transportérů a jaká je možnost jejich využití v terapii. Jedná se o prevenci aterosklerózy nebo ovlivnění metabolických nemocí, např. jaterní steatózu, diabetes druhého typu, či obezitu. Díky studiu těchto transportérů je objasněna značná část enterohepatální cirkulace cholesterolu. Budoucí výzkum může objasnit další spojitosti mezi metabolismem cholesterolu a dalšími metabolickými nemocemi (Brown *et al.*, 2009).

## 7 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla vypracována rešerše zaměřená na metabolický syndrom, ABCG5 a ABCG8 transportéry a přírodní látky, které mohou ovlivnit jejich expresi. Byl zde popsán experimentální zvířecí model metabolického syndromu – HHTg potkani, a také metody sloužící ke stanovení exprese mRNA.

V praktické části byla studována mRNA genů *Abcg5* a *Abcg8* v tkáni tenkého střeva HHTg potkanů, kteří byli po dobu čtyř týdnů krmeni dietou s nebo bez obsahu vybraných přírodních látek (n-3 polynenasycených mastných kyselin a silymarinu).

Z výsledků vyplývá, že nebyl potvrzen pozitivní účinek silymarinu a n-3 polynenasycených mastných kyselin na expresi mRNA transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 v tkáni tenkého střeva HHTg potkanů. Mechanismus působení vybraných přírodních látek na expresi mRNA studovaných transportérů je zřejmě složitější a k vysvětlení tohoto rozdílného efektu je třeba další měření.



## 8 LITERATURA

Alberti, K.G.M.M., Zimmet P., Shaw J. (2005): The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet*: 366, 1059-1062.

Alberti, K.G.M.M., Eckel R. H., Grundy S. M., Zimmet P. Z., Cleeman J. I., Donato K. A., Fruchart J.-C., James W. P. T., Loria C. M., Smith S. C. (2009): Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*: 120, 1640-1645.

Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Hitendra P. (2014): Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*: 5, 209-219.

Barton M., 2013. Cholesterol and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*: 24, 214-220.

Brown J. M., Yu L. (2009): Opposing Gatekeepers of Apical Sterol Transport: Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) and ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8). *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*: 9, 18-29.

Brown J. M., Yu L. (2010): Protein Mediators of Sterol Transport Across Intestinal Brush Border Membrane. In: Harris J. R. (ed.): *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*, pp. 337-380, Springer Netherlands, Dordrecht.

Bustin S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*: 25, 169-93.

Calder P. C. (2004): N –3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clinical Science*: 107, 1-11.

Clarke S. D. (2001): Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: A Molecular Mechanism to Improve the Metabolic Syndrome. *The Journal of Nutrition*: 131, 1129-1132.

de Souza M. O., Souza e Silva L., de Brito Magalhães C. L., de Figueiredo B. B., Costa D. C., Silva M. E., Pedrosa M. L. (2012): The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutrition Research*: 32, 976-984.

Dudová S., Hájek R. (2008): Využití metody real-time pcr (kvantitativní pcr, pcr v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická Onkologie*: 21, 220-222.

Dyerberg J. (1986): Linolenate-derived Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Atherosclerosis. *Nutrition Reviews*: 44, 125-134.

Farrell Jr, R. E. (2010): RNA methodologies laboratory guide for isolation and characterization. 4th ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.

Fukunaga K., Hosomi R., Fukao M., Miyauchi K., Kanda S., Nishiyama T., Yoshida M. (2016): Hypolipidemic Effects of Phospholipids (PL) Containing n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) Are Not Dependent on Esterification of n-3 PUFA to PL. *Lipids*: 51, 279-289.

Goffeau A., De Hertogh B. (2013): ABC Transporters. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*, pp. 7-11, London, Academic Press: Elsevier.

Huseini H. F., Larijani B., Heshmat R., Fakhrzadeh H., Radjabipour B., Toliat T., Raza M. (2006): The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phytotherapy Research*: 20, 1036-1039.

Ji W., Guo L., Lian J., Gong B. (2008): Hypolipidaemic mechanisms of action of CM108 (a flavone derivative) in hyperlipidaemic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*: 60, 1207-1212.

Kadlecová M., Dobešová Z., Zicha J., Kuneš J. (2008): Abnormal *Igf2* gene in Prague hereditary hypertriglyceridemic rats: its relation to blood pressure and plasma lipids. *Molecular and Cellular Biochemistry*: 314, 37-43.

Khovidhunkit W., Moser A. H., Shigenaga J. K., Grunfeld C., Feingold K. R. (2003): Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages. *Journal of Lipid Research*: 44, 1728-1736.

- Kim Eun-Hee, Bae Jin-Sik, Hahm K. B., Cha Ji-Young (2012): Endogenously synthesized n-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Biochemical Pharmacology*: 84, 1359-1365.
- Klimesš I., Vrána A., Kuneš J., Seböková E., Dobešová Z., Štolba P., Zicha J. (1995): Hereditary Hypertriglyceridemic Rat: A New Animal Model of Metabolic Alterations in Hypertension. *Blood Pressure*: 4, 137-142.
- Krysiak R., Źmuda W., Okopieñ B. (2014): The effect of ezetimibe on adipose tissue hormones in patients with isolated hypercholesterolemia. *Pharmacological Reports*: 66, 442-447.
- Kuneš J., Dobešová Z., Zicha J. (2002): Altered balance of main vasopressor and vasodepressor systems in rats with genetic hypertension and hypertriglyceridaemia. *Clinical Science*: 102, 269-277.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*: 25, 402-408.
- Matušková Z., Poruba M., Anzenbacher P. (2014): Cytochromy P450: Role v metabolismu cholesterolu. *Klinická farmakologie a farmacie*: 28, 142-146.
- McGillicuddy F. C., de la Llera Moya M., Hinkle C. C., Joshi M. R., Chiquoine E. H., Billheimer J. T., Rothblat G. H., Reilly M. P. (2009): Inflammation Impairs Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Circulation*: 119, 1135-1145.
- Mesheimish B. A. R., Hussain S. A.-R., Ismail S. H., Sulaiman A. A., Hussein K. I. (2007): Hypolipidemic effect of Silymarin in Dyslipidaemia of Different Etiologies. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*: 49, 449-456.
- Mottillo S., Filion K. B., Genest J., Joseph L., Pilote L., Poirier P., Rinfret S., Schiffrin E. L., Eisenberg M. J. (2010): The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. *Journal of the American College of Cardiology*: 56, 1113-1132.
- Poruba M., Kazdová L., Oliyarnyk O., Malinská H., Matušková Z., Tozzi di Angelo I., Skop V., Večeřa R. (2015a): Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. *Xenobiotica*: 45, 751-756.
- Poruba M., Matušková Z., Kazdová L., Oliyarnyk O., Malinská H., Tozzi di Angelo I., Večeřa R. (2015b): Positive Effects of Different Drug Forms of Silybin in the Treatment of Metabolic Syndrome. *Physiological research*: 46, 507-512.

- Qavami N., Badi N., Labbafi M., Mehrafarin A. (2013): A Review on Pharmacological, Cultivation and Biotechnology Aspects of Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Journal of Medicinal Plants*. 12, 19-37.
- Radjabian T., Huseini H. F. (2010): Anti-Hyperlipidemic and Anti-Atherosclerotic Activities of Silymarins from Cultivated and Wild Plants of *Silybum marianum* L. with Different Content of Flavonolignans. *Iranian journal of pharmacology & therapeutics*: 9, 63-67.
- Salen G., Patel S., Batta A. K. (2002): Sitosterolemia. *Cardiovascular Drug Reviews*: 20, 255-270.
- Saller R., Melzer J., Reichling J., Brignoli R., Meier R. (2007): An Updated Systematic Review of the Pharmacology of Silymarin. *Complementary Medicine Research*: 14, 70-80.
- Seböková E., Klimes I., Mitková A., Wiersma M., Bohov P. (1995): Decreased glucose transporter protein (GLUT4) in skeletal muscle of hypertriglyceridaemic insulin-resistant rat. *Physiological research*: 44, 87-92.
- Schmittgen T. D., Livak K. J. (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*: 3, 1101-1108.
- Sobolová L., Skottová N., Večeřa R., Urbánek K. (2006): Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharmacological Research*: 53, 104-112.
- Stender S., Frikke-Schmidt R., Nordestgaard B. G., Tybjaerg-Hansen A. (2010): The ABCG5/8 Cholesterol Transporter and Myocardial Infarction Versus Gallstone Disease. *Journal of the American College of Cardiology*: 63, 2121-2128.
- Stolba P., Husek P., Opltová H., Vrána A., Kuneš J. (1992) The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes. *Life Sciences*: 51, 733-740.
- Sumi K., Tanaka T., Uchida A., Magoori K., Urashima Y., Ohashi R., Ohguchi H., Okamura M., Kudo H., Daigo K., Maejima T., Kojima N., Sakakibara I., Jiang S., Hasegawa G., Kim I., Osborne T. F., Naito M., Gonzalez F. J., Hamakubo T., Kodama T., Sakai J. (2007): Cooperative Interaction between Hepatocyte Nuclear Factor 4 and GATA Transcription Factors Regulates ATP-Binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8. *Molecular and Cellular Biology*: 27, 4248-4260.

- Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. (2005): *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. Brno. Masarykova Univerzita.
- Takahashi Y. (2011): Soy Protein and Fish Oil Independently Decrease Serum Lipid Concentrations but Interactively Reduce Hepatic Enzymatic Activity and Gene Expression Involved in Fatty Acid Synthesis in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*: 57, 56-64.
- Valenzuela A., Garrido A. (1994): Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological Research*: 27, 105-112.
- Večeřa R., Zachařová A., Orolin J., Skottová N., Anzenbacher P. (2011): The effect of silymarin on expression of selected ABC transporters in the rat. *Veterinární medicína*: 56, 59-62.
- Vrána A., Kazdová L., Dobešová Z., Kuneš J., Křen V., Bílá V., Štolba P., Klimeš I. (1993): Triglyceridemia, Glucoregulation, and Blood Pressure in Various Rat Strains. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 683, 57-68.
- Vrána A., Kazdová L. (1990): The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplantation Proceedings*: 22, 2579-2584.
- Weber C., Noels H. (2011): Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine*: 17, 1410-1422.
- Xu J., Zhou X., Deng Q., Huang Q., Yang J., Huang F. (2011): Rapeseed oil fortified with micronutrients reduces atherosclerosis risk factors in rats fed a high-fat diet. *Lipids in Health and Disease*: 10, 96-102.
- Yu Xiao-Hua, Qian K., Jiang N., Zheng Xi-Long, Cayabyab F. S., Tang Chao-Ke (2014): ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*: 428, 82-88.
- Zicha J., Pechanová O., Cacányiová S., Cebová M., Kristek F., Török J., Simko F., Kuneš J. (2006): Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiological Research*: 55, 49-63.