

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**Štúdium expresie biotransformačných a
transportných proteínov v obličkách**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúra a zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú riadne citované. Táto práca nebola použitá k dosiahnutiu rovnakého alebo iného titulu.“

.....

Martina Felešová

Pod'akovanie

Týmto by som sa rada poďakovala svojej vedúcej diplomovej práce PharmDr. Lucii Smutnej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť, ochotu, a venovaný čas počas experimentálnej časti aj písania diplomovej práce.

Tiež by som sa rada poďakovala mojej rodine za podporu počas celého štúdia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Martina Felešová

Školiteľ: PharmDr. Lucie Smutná, PhD.

Názov diplomovej práce: Štúdium expresie biotransformačných a transportných proteínov v obličkách

Xenobiotiká predstavujú každodennú súčasť života živých organizmov. Ich zdrojom sú mimo iného strava, prostredie, podávané liečivá, potravinové farbivá a iné. S cieľom ochrániť sa proti ich negatívnemu vplyvu si živé organizmy vyvinuli komplexné metabolické procesy, ktoré tieto látky z tela eliminujú.

V tejto práci sme sa konkrétne zamerali na vplyv agonistu myšieho Car – TCPOBOP na ovplyvnenie expresie biotransformačných a transportných génov. Podstatou bola izolácia mRNA z obličiek myší pomocou klasickej fenol-chloroformovej metódy, následná transkripcia mRNA na cDNA. V poslednom kroku bola vykonaná RT-PCR reakcia.

Výsledkom sú grafy znázorňujúce, ako podávanie TCPOBOP ovplyvnilo expresiu sledovaných génov. Z týchto grafov je jasné, že TCPOBOP má určitý vplyv na expresiu cieľových génov. V prípade *Cyp3a11*, *Cyp2b10*, *Slc22a2* a *Ugt3a2* došlo k niekoľkonásobnému zvýšeniu expresie po podaní tohto agonistu. U génov *Nr1i2*, *Nr1i3*, *Sultc2*, *Abcc2*, *Abcb1a* a *Abcb1b* výsledky až tak významné neboli. Expresia cieľových a kontrolných skupín sa od seba v týchto dvoch prípadoch až tak významne neodlišovali.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Martina Felešová

Supervisor: PharmDr. Lucie Smutná, PhD.

Title of diploma thesis: Study of expression of biotransformation enzymes and transport proteins in kidneys

Xenobiotics are a part of the everyday life of living organisms. Their source is, among other things, diet, environment, administered medicines, food colorings and others. The living organisms have developed complex metabolic processes that eliminate these substances from the body in order to protect themselves against their negative influence.

Within this work, we specifically focused on the effect of the murine Car agonist – TCPOBOP on influencing the expression of biotransformation and transport genes. The essence was the isolation of mRNA from the murine kidneys using the classic phenol-chloroform method, followed by the transcription of mRNA into cDNA. In the last step, the RT-PCR reaction was performed.

The results are graphs showing how the administration of TCPOBOP affected the expression of the monitored genes. It is clear from these graphs that TCPOBOP has some effect on the expression of target genes. In the case of *Cyp3a11*, *Cyp2b10*, *Slc22a2* and *Ugt3a2*, there was a several-fold increase in expression after administration of this agonist. For the *Nr1i2*, *Nr1i3*, *Sultc2*, *Abcc2*, *Abcb1a* and *Abcb1b* genes, the results were not significant. The expression of the target and control groups did not differ significantly from each other in these two cases.

Obsah

1	Zoznam skratiek.....	7
2	Úvod.....	11
3	Teoretická časť.....	13
3.1	Nukleárne receptory.....	13
3.1.1	Klasifikácia nukleárných receptorov	13
3.1.2	Štruktúra nukleárných receptorov.....	15
3.1.3	Mechanizmus účinku jadrových receptorov	16
3.2	Väzba ligand – receptor – DNA.....	17
3.3	Orphan receptors – sirotské receptory.....	18
3.3.1	CAR	19
3.3.1.1	Funkcie CAR	22
3.3.1.2	Metabolizmus glukózy.....	23
3.3.1.3	Metabolizmus lipidov	24
3.4	ABC transportéry	25
3.4.1	Priebeh efluxu	26
3.5	TCPOBOP	27
4	Cieľ práce.....	29
5	Experimentálna časť	30
5.1	Materiál.....	30
5.1.1	Zvieratá	30
5.2	Chemikálie	31
5.3	Prístroje a pomôcky	31
5.4	Metódy.....	32
5.4.1	Izolácia RNA z obličiek	32
5.4.1.1	Princíp.....	32
5.4.1.2	Postup.....	33

5.4.2	Spektrofotometria	34
5.4.3	Reverzná transkripcia	35
5.4.3.1	Postup.....	35
5.4.4	Real-time PCR	36
5.4.4.1	Princíp.....	36
5.4.4.2	Postup.....	36
5.5	Štatistické spracovanie dát	38
6	Výsledky	39
6.1	Nukleárne receptory.....	39
6.2	Biotransformačné gény.....	40
6.3	Transportné gény	40
6.4	Biochemické výsledky.....	41
7	Diskusia	42
8	Záver.....	49
9	Literatúra	50

1 Zoznam skratiek

ABC	ATP-binding cassette
Abcc2	ABC podrodina C člen 2
Actb	Beta-aktín
AF-1 a AF-2	Aktivačná funkcia 1 a 2
AhR	Aryl hydrokarbónový receptor
AMK	Aminokyselina
API	Voda pre injekcie
AR	Androgénový receptor
ATP	Adenozíntrifosfát
BCRP	Breat cancer resistance protein
BSEP	Bile salt export pump
CAR	Konštitutívny androstanový receptor
CCRP	CAR cytoplasmic retention protein
cDNA	Komplementárna DNA
CITCO	6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim
COUP-TF	Transkripčný faktor kuracieho ovalbumínu
CYP450	Cytochróm P450
DAX-1	Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1
DBD	DNA viažuca doména

DM II. typu	Diabetes mellitus II. typu
DNA	Deoxyribonkleová kyselina
ER α a β	Estrogénový receptor α a β
FBP1	Fructose biphosphatase 1
FOXO1	Forkhead box protein O1
FXR	Farnesoid X receptor
G6Pase	Glukóza-6-fosfatáza
Gapdh	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GCNF	Zárodočný bunkový jadrový faktor
GR	Glukokortikoidný receptor
GST	Glutathion-S-trasferáza
HFD	High fat diet
HNF4	Hepatocytický jadrový faktor 4
HR	Hormone receptor
HRE	Hormón-responzívny element
HSP, HSP90	Heat shock protein, heat shock protein 90
IGF-BP	Insuline-like growth factor-binding protein
LBD	Ligand viažuca doména
LRH-1	Pečeňový receptor homológ-1
LXR	Pečeňový X receptor
MDR1	Multidrug resistance gene 1
MK	Mastné kyseliny
MR	Mineralokortikoidný receptor

mRNA	Mediátorová RNA
MRP2 a MRP4	Multidrug resistance-associated protein 2, resp. 4
NBD1 a NBD2	Nukleotid-viažuca doména 1 a 2
NGF1-B	Receptor nervového rastového faktoru 1B
NOR-1	Sirotský neurónový faktor 1
NR	Jadrový receptor
NR4A2	Jadrový receptor podrodina 4 člen A
NTCP	Na ⁺ taurocholate-transporting polypeptide
NTD	N-terminálna doména
NURR1	Nurr faktor 1
OATPs	Organic anion transporting polypeptides
PB	Fenobarbital
PBREM	Phenobarbital responsive enhancer modules
PCX	Pyruvát karboxyláza
PEPCK	Fosfoenolpyruvát karboxykináza
PP2A	Fosfatáza 2A
PPAR γ	Receptor γ aktivovaný peroxizómovým proliferátorom
PR	Progesterónový receptor
PXR	Pregnanový X receptor
RAR	Receptor kyseliny retinovej
REV-ERB	Reverzný Erb receptor
RNA	Ribonukleová kyselina
rt-PCR	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia

RXR	Retinoidový X receptor
SF-1	Steroidogénny faktor 1
SHP	Small heterodimer partner
SULT	Sulfotransferáza
TAG	Triacylglyceroly
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzén
TMD1 a TMD2	Transmembránová doména 1 a 2
TR	Receptor hormónov štítnej žľazy
UDP	Uridíndifosfát
UGT	UDP glukuronosyltransferáza
VDR	Receptor vitamínu D

2 Úvod

Živé organizmy na dennej báze prichádzajú do kontaktu s množstvom cudzorodých látok pochádzajúcich z rôznych zdrojov – vzduch, voda, pôda či potrava. Každý z týchto elementov výrazne ovplyvňuje kvalitu ich života, či už pozitívne ako zdroj energie, prípadne na syntézu iných, životne potrebných makromolekúl. Avšak väčšina látok je pre organizmy nepotrebná, prípadne až škodlivá. (Iovdijová *et al.* 2010)

Látky pochádzajúce z vonkajšieho prostredia (= exogénne) obecné nazývame xenobiotiká. Názov xenobiotikum pochádza z gréckych slov „*xenos*“ znamenajúci cudzí či neznámy a „*bios*“ čiže život. Ide teda o látky prirodzene sa nevyskytujúce v živých organizmoch. Ide napríklad o liečivé prípravky, kontaminanty životného prostredia, potravinové farbivá, kozmetické prípravky, pesticídy a mnohé iné. (Iovdijová *et al.* 2010)

Toxické však môžu byť aj látky telu vlastné (= endogénne), respektíve môže ísť o produkty metabolizmu. Aj tých sa organizmus čo najskôr zbavuje, pretože naň môžu mať nežiaduci vplyv. Príkladom sú cholesterol, bilirubín, žlčové soli alebo steroidné hormóny. (Skálová *et al.* 2011)

Aby neboli živé organizmy zbytočne zaťažované vplyvom xenobiotík a boli schopné udržať si homeostázu, vyvinuli si viaceré ochranné mechanizmy. Primárne ide hlavne o metabolizmus cudzorodých látok v pečeni, ktorý bráni hromadeniu potenciálne toxických lipofilných zlúčenín. Táto stratégia zahŕňa xenosenzory - receptory, ktoré rozoznávajú xenobiotiká a nebezpečné endogénne molekuly, a tiež sa podieľajú na metabolizme a transportných procesoch v tele. Patria sem CAR – konštitutívny androstanový receptor a PXR – pregnanový X receptor z nadrodiny jadrových receptorov a aryl hydrokARBónový receptor AhR, člen rodiny transkripčných faktorov. (di Masi *et al.* 2009)

Proces detoxifikácie, čiže odstránenia xenobiotika, pozostáva z troch hlavných krokov. Molekuly účastniace sa na týchto procesoch podľa toho rozdeľujeme na:

- oxidačné enzýmy – CYP, hlavne podrodina CYP450
- konjugáčn  enzýmy– UGTs, GSTs, SULTs
- transportn  proteíny – OATs, MDRs, MRPs (Moreau *et al.* 2007, Wallance *et al.* 2013)

Aj napriek tomu, že tieto proteíny, či už biotransforma n , ale aj transportn , sú zodpovedn  najmä za metabolizmus, deaktiváciu a transport liečiv a chemikálií, svoju úlohu majú aj pri katabolizme  ilcov ch kyselín, steroidných hormónov a hormónov štítnej  l azy, pri ktorých je riziko, že xenobiotiká narušia ich prirodzen  funkcie. (Moreau *et al.* 2007)

Najv a   význam v procese detoxifikácie majú transportn  a biotransforma n  proteíny nachádzajúce sa v pečeni, obličkách, gastrointestinálnom trakte, p l cach a mozgu. Podieľajú sa na I. a II. fáze procesu biotransformácie látok. (Nov  2013)

V prvom kroku, tiež nazývanom aj konverzia dochádza k odkrytiu alebo vneseniu nových funkčných skupín do štruktúry xenobiotika. Enzýmy zodpovedn  za reakcie typu oxidácia, redukcia, hydrol za, hydratácia a izomerácia zabezpečia, že z pôvodne lipofilnej zl u eniny sa stane viac hydrofiln . (Van Vugt-Lussenburg *et al.* 2022)

Pokiaľ však látka pri vstupe je už dostatočne hydrofiln , prvý krok nie je potrebn  a pristupuje sa hneď k druhému. Jeho podstatou je konjugácia s endogénnou molekulou, najčastejšie ide o kyselinu glukuronidové, glutathion alebo rôzne aminokyseliny. Výsledkom tohto procesu je menej aktívna zl u enina s ešte v   ou hydrofilitou, ktor  môže byť následne vyl u en  z organizmu močom alebo žlčou. Tento proces sa niekedy nazýva tretia fáza, ktor  predstavuje transport xenobiotika alebo jeho metabolitu z hepatocytov do  l e, prípadne do krvi, odkiaľ sa môžu v obličkách prefiltrovať a vyl u iť sa močom. (Skálová *et al.* 2011)

3 Teoretická časť

3.1 Nukleárne receptory

Dôležitú úlohu pri biodegradácii škodlivých látok majú nukleárne receptory. Sú definované ako ligandom aktivované transkripčné faktory, ktoré sú stimulované steroidnými hormónmi (estrogén, progesterón) a inými liposolubilnými molekulami (kyselina retinová, hormóny štítnej žľazy, fosfolipidy). Na rozdiel od väčšiny intracelulárnych poslov, tieto ligandy môžu samostatne prechádzať plazmatickou membránou a bezprostredne interagovať s jadrovými receptormi v bunke, namiesto nutnosti viazať sa na receptor na povrchu bunky. (Sever *et al.* 2013)

Po aktivácii nukleárne receptory priamo regulujú transkripciu génov, ktoré kontrolujú široké spektrum biologických procesov v organizme, ako napríklad bunkové delenie, vývoj, metabolizmus, reprodukciu, zápalové procesy, cirkadiálne rytmy a iné. (Weikum *et al.* 2018)

3.1.1 Klasifikácia nukleárnych receptorov

Jadrové receptory sa obecné rozdeľujú do 7 základných podrodín.

Podrodina 0: Skupina obsahujúca atypické receptory DAX-1 (z angl. dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, Gene 1) a SHP (z angl. small heterodimer partner). Tieto dva proteíny sú unikátne svojou štruktúrou, obsahujúcou len LBD. Táto doména obsahuje motívy bežné pre ko-aktivátory NR, pomocou ktorých môžu interagovať s LBD ostatných receptorov v procese regulácie transkripcie.

Podrodina 1: Početná podrodina tvorená receptormi aktivovanými proliferátorom peroxisomu – PPAR, receptormi kyseliny retinovej – RAR, farnesoid X receptorom – FXR, receptormi hormónov štítnej žľazy – TR, pečenej X receptormi – LXR, reverznými Erb receptormi – REV-ERB, konštitutívnym androstanovým receptorom – CAR, pregnanovým X receptorom

– PXR, a receptormi vitamínu D – VDR. Sú regulované širokým spektrom lipofilných molekúl, ako napríklad žľčové kyseliny, steroly, hormóny štítnej žľazy alebo mastné kyseliny.

Podrodina 2: Tvorená sirotskými receptormi RXR – retinoidný X receptor, COUP-TF – transkripčný faktor kuracieho ovalbumínu a HNF4 – hepatocytický jadrový faktor 4. Všetky viažu mastné kyseliny, avšak nie je isté, či práve ony hrajú rolu v ligandom-riadenej regulácii, typickej pre ostatné skupiny NR.

Podrodina 3: Podrodina tvorená steroidnými receptormi, ktoré sú kľúčovými regulátormi reprodukčných, metabolických a vývojových procesov. Patrí sem progesterónový receptor – PR, mineralokortikoidný receptor – MR, androgénový receptor – AR, estrogénové receptory – ER α a ER β , glukokortikoidný receptor – GR. Ich ligandy predstavujú hormóny odvodené od cholesterolu, ako kortizol a estrogén.

Podrodina 4: Skupina tvorená sirotskými receptormi NGF1-B – receptor nervového rastového faktoru 1B, NURR1 – Nurr faktor 1, NOR-1 – sirotsky neurónový faktor 1. Sú to proteíny nevyhnutné na rozvoj neurónov a ich zachovanie.

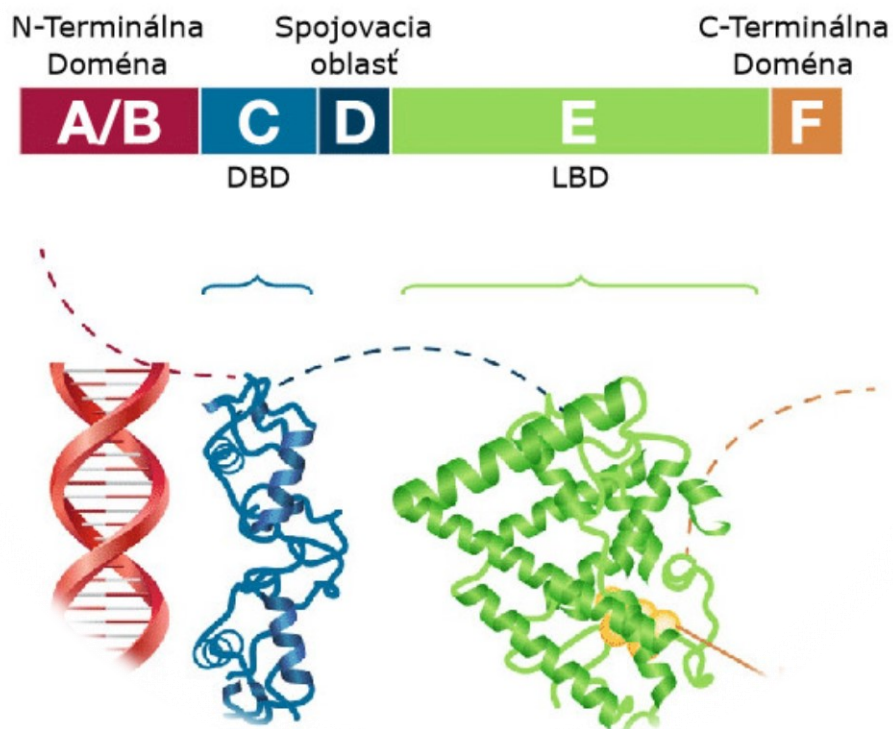
Podrodina 5: Skupina zahrňujúca steroidogénny faktor 1 (SF-1) a pečeneňový receptor homológ-1 (LRH-1). Síce sú tieto receptory obecné klasifikované ako sirotské, dôkazy naznačujú, že ide o proteíny regulované fosfolipidmi. Ich hlavnou funkciou je podieľanie sa na metabolizme a vývoji.

Podrodina 6: Posledná podrodina obsahuje len jeden receptor – zárodočný bunkový jadrový faktor (GCNF), ktorý sa významne podieľa na ontogenetickom vývoji. Dôvodom, prečo tvorí samostatnú skupinu je zásadný rozdiel v jeho LBD a absencia aktivačnej funkcie HR (AF-H). (Weikum *et al.* 2018)

3.1.2 Štruktúra nukleárných receptorov

Napriek rozdielom vo veľkosti, tvare a náboji ligandov zdieľajú jadrové receptory rovnakú základnú štruktúru, pozostávajúcu zo šiestich domén A až F zobrazených na Obr. 1, pričom každá z nich má špecifickú úlohu.

- A/B doména - N-terminálna doména (NTD) obsahujúca jednu z dvoch transaktivačných domén – aktivačnú funkciu 1 (AF-1). Táto doména je cieľom viacerých posttranslačných modifikácií, ako fosforylácia, acetylácia a SUMOylácia
- C doména - DNA viažuca doména (DBD) tvorená dvoma poddoménami, pričom každá obsahuje štyri cysteínové zvyšky, ktoré koordinujú zinočnatý ión a vytvárajú *Zn finger* viažuci molekulu DNA v tvare slučky
- D doména – spojovacia oblasť (angl. *hinge region*), ktorá slúži na prepojenie DBD a LBD, obsahuje sekvenciu nukleárnej lokalizácie
- E doména - ligand viažuca doména (LBD), ktorá je schopná okrem ligandu viazať aj ko-regulačné proteíny. Priestorové usporiadanie pripomína vrečko, v ktorom ligandy nekovalentne interagujú so skupinami AMK na základe ich chemickej štruktúry
- F doména – C-terminálna doména, je najvariabilnejšia v sekvencii aj dĺžke. U viacerých jadrových receptorov nie je jasne definovaná. Dôvodom je, že zvyšky AMK nasledujúce za LBD, ktoré tvoria túto doménu, sú kvôli ich krátkej sekvencii často považované za súčasť LBD. (Weikum *et al.* 2018, Sever *et al.* 2013, Wiech *et al.* 2021)



Obr. 1 Obecná štruktúra nukleárných receptorov. Modifikované z: Fruchart *et al.* (2019)

3.1.3 Mechanizmus účinku jadrových receptorov

Väčšina nukleárných receptorov sa bez prítomnosti ligandu nachádza v cytoplazme v neaktívnom stave v proteínovom komplexe s chaperónovými proteínmi – HSP (z angl. heat shock protein). Po naviazaní ligandu dochádza k uvoľneniu z tejto väzby a translokácii receptoru do jadra bunky. V jadre sa receptor viaže na špecifickú sekvenciu DNA (hormón-responzívne elementy) buď vo forme homo- alebo heterodiméru. Migrácia do jadra a interakcie s ostatnými regulátormi génovej transkripcie, vrátane RNA polymerázy, acetyltransferáz

a deacetyláz, umožňuje reguláciu génovej transkripcie – či už zvýšenú alebo zníženú expresiu. (S.P.H Alexander *et al.* 2019)

Podľa mechanizmu účinku rozdeľujeme jadrové receptory do 4 základných kategórií:

- 1. typ – NR sa bez prítomnosti ligandu nachádzajú v cytoplazme v komplexe s chaperónovými proteínmi. Po naviazaní ligandu sa receptor uvoľní z tohto komplexu a je translokovaný do jadra, kde sa bežne viaže na palindromatický hormón-responzívny element ako homodimér a dochádza k regulácii transkripcie.
- 2. typ – receptory sú lokalizované v jadre a interagujú s ko-represormi. Po naviazaní ligandu sú tieto proteíny nahradené ko-aktivátormi. Táto skupina NR bežne tvorí heterodiméry s RXR.
- 3. typ – podobne ako predchádzajúca skupina receptorov, aj tieto NR sa vyskytujú v jadre a vytvárajú väzby s ko-represormi a ko-aktivátormi. Rozdielom je, že sa na HRE (hormón-responzívny element) viažu ako homodiméry.
- 4. typ – takmer identické 2. typu NR, s tým rozdielom, že sa viažu na HRE ako monoméry. (Weikum *et al.* 2018)

3.2 Väzba ligand – receptor – DNA

Jadrové receptory tvoria väzbu s rôznymi malými lipofilnými ligandmi, ako steroidy, hormóny štítnej žľazy, retinoidy a lipidy, ktoré buď samostatne prechádzajú cytoplazmatickou membránou, alebo sú cez membránu transportované. Bez prítomnosti ligandu majú NR tendenciu byť nestabilné a následné naviazanie ligandu stabilitu významne zvyšuje. Ligandy sa na receptory viažu cez LBD, ktorá zo zhruba 75% pozostáva z hydrofóbných zvyškov, ale taktiež obsahuje aj polárne zvyšky, ktoré zabezpečujú tvorbu vodíkových väzieb – tie pomáhajú so správnou orientáciou ligandu. (Weikum *et al.* 2018)

DBD nukleárneho receptora sa viaže na responzívne elementy DNA. Následne NR naberú rozličné proteíny súhrnne zvané koregulátory. Dnes je známych približne 200 koregulačných proteínov deliacich sa do dvoch kategórií – ko-aktivátory a ko-represory. Tieto interagujú s aktivačnými funkciami AF1 a AF2 receptora. (Weikum *et al.* 2018)

3.3 Orphan receptors – sirotské receptory

Podstatou fungovania jadrových receptorov je teda naviazanie ligandu, zmena konformácie receptora a translokácia komplexu ligand-receptor do jadra bunky. Väčšina jadrových receptorov má známe fyziologické ligandy, vysoko špecifické molekuly, ktoré túto kaskádu po naviazaní aktivujú. Avšak existujú aj nukleárne receptory bez prirodzeného ligandu. Podľa toho sa nazývajú sirotské receptory. Ich aktivácia neprebíha na úrovni naviazania ligandu, ale ide o alternáciu na úrovni expresie receptora, fosforyláciu a interakcie s ko-aktivátormi a represormi. Mimo toho môžu byť sirotské receptory aktivované aj väzbou mimo ligand-väzbového miesta, ako napríklad 6-merkaptopurín, ktorý aktivuje NR4A2 cez AF-1 doménu. (Kelly *et al.* 2018)

„Adoptované siroty“ sa nazývajú receptory, o ktorých sa pôvodne uvažovalo ako o sirotských receptoroch, avšak neskôr boli objavené ich prirodzené ligandy. Patrí sem napríklad PPAR γ , RXR a LXR. (Kelly *et al.* 2018)

3.3.1 CAR



Obr. 2 Kryštalická štruktúra CAR. Prevzaté z: Protein data bank (2005)

Jadrový receptor, na ktorý som sa zamerala v tejto práci je konštitutívny androstanový receptor (CAR), je členom nadrodiny jadrových receptorov 1I, spolu s PXR a VDR. Jeho kryštalická štruktúra je zobrazená na Obr. 2.

Tiež známy aj ako NR1I3, tento nukleárny receptor bol identifikovaný v roku 1994 ako receptor interagujúci s responzívnymi elementmi kyseliny retinovej. Pôvodne bol definovaný ako konštitutívne aktívovaný receptor, keďže tvorí heterodimér s RXR a viaže sa na responzívny element kyseliny retinovej v neprítomnosti ligandu. Neskôr bolo preukázané, že aktivácia CAR je niekoľkokrokový proces. Iničiálny krok je translokácia do jadra a interakcia s RXR α , proces ktorý môže byť nezávislý na väzbe ligandu. Je známe, že CAR sa zúčastňuje na regulácii transkripcie génov liekových transportérov ako je *Oatp2* a skupina MRP transportérov, hlavne MRP2. (Mottino *et al.* 2008)

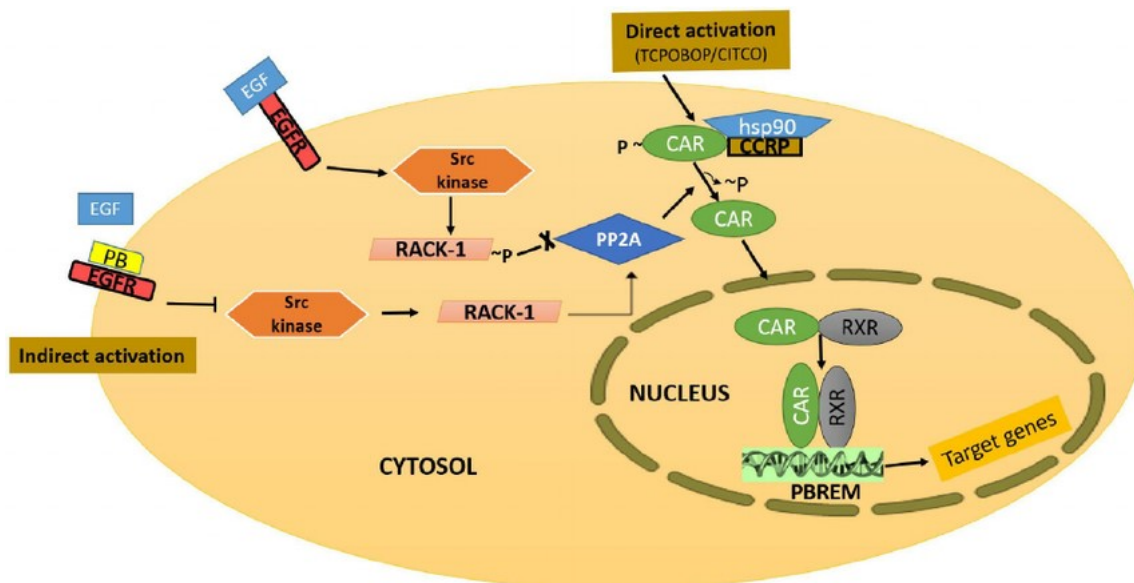
CAR sa vyskytuje prevažne v pečeni, ale takisto ho môžeme nájsť aj v mimohepatálnych tkanivách, ako tenké črevo či obličky. Patofyziologické stavy ako je úraz, sepsia, zápal alebo podávanie liečiv môžu modifikovať expresiu CAR. *In vivo* sa CAR nachádza v cytoplazme tvoriac komplex s proteínmi ako heat shock protein 90 (HSP90) a CCRP (CAR cytoplasmic retention protein). Navyše, fosfatáza 2A (PP2A) sa tiež zúčastňuje na tvorbe komplexu HSP90-CCRP-CAR. Translokácia CAR do jadra, s najväčšou pravdepodobnosťou závislá na aktivite PP2A, je nasledovaná asociáciou s RXR a väzbou na PBREM (Phenobarbital responsive enhancer modules). Tým pádom aktivácia CAR môže zahŕňať priamu väzbu agonistu, naviazanie ko-aktivátoru, disociáciu ko-represoru a následnú jadrovú translokáciu a heterodimerizáciu s RXR α , pred tým než sa naviaže na DNA a indukuje génovú expresiu. (Mottino *et al.* 2008)

Niektoré ligandy CAR, ako napríklad androstenol, vykazujú aktivitu inverzných agonistov, ovplyvňujúc tento receptor v zmysle zvýšenej aktivácie ko-represorov, namiesto ko-aktivátorov, čoho výsledkom je znížená transkripčná aktivita CAR. Deriváty estrogénu vykazujú pôsobenie agonistov aj antagonistov. Nakoniec, niektoré aktivátory CAR nie sú ligandmi *in vitro*. Mimo iného ide o fenobarbital a bilirubín, ktoré môžu modifikovať aktivitu CAR nepriamou aktiváciou, zvýšením jadrovej translokácie receptora bez väzby na doménu ligandu. (Mottino *et al.* 2008)

CAR je aktivovaný rôznymi chemickými zlúčeninami – liečivá, pesticídy, polyfenoly a iné. EC₅₀ potrebná na naviazanie ligandu kolíše medzi nanomolárnou až mikromolárnou koncentráciou, z čoho vyplýva, že aj ligandy viažuce sa s nízkou afinitou môžu vyvolať výrazné signály. Aktuálne poznáme len 2 zlúčeniny schopné priamej interakcie s väzbovým miestom CAR - TCPOBOP (modelový agonista myšieho Car) a CITCO (modelový agonista ľudského CAR). Ich afinita ku CAR sa výrazne líši medzi jednotlivými organizmami. TCPOBOP aktivuje Car u myší, ale nie u ľudí, zatiaľ čo CITCO sa chová presne naopak – aktivuje CAR u ľudí, ale nie u myší. Okrem toho môže byť CAR aktivovaný aj nepriamo transdukciou signálov. Ako príklad slúži fenobarbital, ktorý aktivuje signálne dráhy v hepatocytoch, čo vedie k aktivácii CAR. (Pustyl'nyak *et al.* 2020)

Konštitutívny androstanový receptor bol pôvodne charakterizovaný ako xenosezor indukujúci expresiu génu CYP2B. Neskôr bolo demonštrované, že CAR reguluje mnohé gény kódujúce kľúčové enzýmy metabolizmu liečiv a iných xenobiotík, vrátane enzýmov I. a II. fázy metabolizmu. Enzýmy I. fázy predstavujú mimo iného CYP3A, CYP2C19, CYP2B6 a jeho myšší orthológ Cyp2b10. Medzi enzýmy II. fázy regulované CAR patria SULT (sulfotransferáza), UGT (UDP-glukuronyltransferáza), GST (glutathion-S-transferáza). Transportné proteíny zahŕňajú P-glykoproteín, MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2), MRP4 (multidrug resistance-associated protein 4), BCRP (breast cancer resistance protein), OATP1B3 (organic anion-transporting polypeptide 1B3), OATP1A2 (organic anion-transporting polypeptide 1A2), BSEP (bile salt export pump) a NTCP (Na⁺ taurocholate-transporting polypeptide). (Urquhart *et al.* 2007)

Po aktivácii receptora ligandom dochádza k uvoľneniu *heat shock protein* a CCRP (CAR cytoplasmic retention protein) do cytoplazmy a translokácii CAR do jadra bunky. Pri tomto procese zároveň dochádza k defosforylácii receptora pomocou proteínovej fosfatázy 2A (PP2A). (Küblbeck *et al.* 2020)



Obr. 3 Proces translokácie CAR do jadra priamou a nepriamou cestou a následné ovplyvnenie génovej expsie. Prevzaté z: Dash et al. (2014)

3.3.1.1 Funkcie CAR

Vďaka novým poznatkom vieme, že xenosenzory neslúžia len na rozoznávanie potenciálne škodlivých látok v organizme, ale predstavujú prienik viacerých signálnych dráh a tým môžu ovplyvňovať rôzne biologické funkcie, či už pozitívne alebo negatívne. Mimo iného ide o vplyv na metabolizmus lipidov, homeostázu glukózy a zápalové procesy. (Küblbeck *et al.* 2020)

Účinok CAR na metabolickú homeostázu je sprostredkovaný mimo iného vplyvom na syntézu MK, β -oxidáciu, syntézu žlčových kyselín a glukoneogénu. Výsledkom aktivácie sú znížené hladiny glykémie, zlepšená glukózová tolerancia a citlivosť na inzulín a takisto zlepšené hladiny TAG v krvi. (Küblbeck *et al.* 2020)

3.3.1.2 Metabolizmus glukózy

Pečeňová glukoneogenéza je tesne kontrolovaná inzulínom a glukagónom a hrá dôležitú úlohu pri prežití počas postenia sa a hladovania. Účinok Car na metabolizmus glukózy sa prejavuje potlačením glukoneogenézy a zníženými sérovými hladinami glukózy u myší. (Moreau *et al.* 2007)

Po prijatí potravy sledujeme zvýšenie glykémie v krvi, na čo organizmus reaguje uvoľnením inzulínu, ktorý potlačuje tvorbu glukózy v pečeni potlačením transkripcie fosfoenolpyruvát karboxykinázy (PEPCK) a glukóza-6-fosfatázy (G6Pase). Zároveň zvyšuje vstup glukózy do buniek, čoho výsledkom sú znížené hladiny glukózy. (Moreau *et al.* 2007, Küblbeck *et al.* 2020)

Naopak, počas postenia sa sú gény PEPCK a G6Pase reaktivované transkripciou FOXO1 (Forkhead box protein O1), s cieľom zahájiť glukoneogenézu v neprítomnosti inzulínu a zvýšiť sérové hladiny glykémie. Avšak aktivovaný CAR sa vie naviazať na FOXO1 a potlačiť jeho funkciu, čím zabráni interakcii FOXO1 s inzulín-responzívnymi elementmi v IGF-BP (insulin-like growth factor-binding protein), PCX (pyruvate carboxylase), FBP1 (fructose biphosphatase 1), PEPCK a G6Pase a vo výsledku potlačiť expresiu týchto génov. (Moreau *et al.* 2007, Küblbeck *et al.* 2020)

V skorších štúdiách boli u pacientov užívajúcich fenobarbital – známeho agonistu CAR, pozorované nižšie hladiny plazmatickej glykémie a inzulínu počas postenia, zlepšená glukózová tolerancia a odpoveď inzulínu na záťaž glukózou bez ovplyvnenia telesnej hmotnosti u diabetických pacientov. Podobné účinky boli pozorované u myší, kde TCPOBOP-aktivovaný Car predchádzal, respektíve zlepšoval obezitu a symptómy DM II. typu spôsobené HFD (high-fat diet). (Moreau *et al.* 2007, Küblbeck *et al.* 2020)

Aktivácia CAR takisto zvyšuje mitochondriálny metabolizmus, zvyšuje produkciu žlčových kyselín, elimináciu laktátu a produkciu glukózy, čoho výsledkom je zlepšená glukózová tolerancia a citlivosť na inzulín. (Moreau *et al.* 2007, Küblbeck *et al.* 2020)

3.3.1.3 Metabolizmus lipidov

Homeostáza lipidov je v organizme dosahovaná pomocou komplexných mechanizmov. Narušenie tvorby a katabolizmu lipidov je spájané s viacerými metabolickými ochoreniami, ako obezita a diabetes mellitus. Rovnováha lipidového spektra je tesne udržiavaná procesmi lipogenézy, β -oxidácie, príjmu lipidov a ich následnej sekrécie. Nedávne štúdie ukázali, že viaceré liečivá, o ktorých už dnes vieme, že slúžia ako aktivátory CAR, ovplyvňujú metabolizmus lipidov. Príkladom je fenobarbital, antiepileptikum, ktoré vykazuje podstatné zmeny v hladine lipidov v pečeni a plazme pacientov. (Küblbeck *et al.* 2020)

Vplyv CAR na metabolizmus lipidov sú viac kontroverzné než jeho vplyv na hladiny glukózy. Vo všeobecnosti, viaceré štúdie ukázali, že ovplyvnenie CAR môže viesť k zmenám hladín pečenej TAG a teda tvoriť dôležitý mechanizmus vedúci k nepriaznivým výsledkom metabolických efektov xenobiotík. (Moreau *et al.* 2007, Küblbeck *et al.* 2020)

U hlodavcov viaceré štúdie ukázali, že Car je kľúčový mediátor v procese ochrany proti steatóze prostredníctvom potlačenia lipogenézy a glukoneogenézy a následne aktivácia Car chráni pred stukovatením pečene. Dôvodom, prečo dochádza k zlepšeniu steatózy a stukovatenia pečene je inhibícia lipogenézy a podporením β -oxidácie u HFD myší, ktorým bol zároveň podávaný TCPOBOP. Výsledkom je znížený pečenej podiel cholesterolu spôsobený zvýšením jeho metabolizmu žlčovými kyselinami. Takisto sú znížené sérové hladiny žlčových kyselín indukciou expresie génov ako niektoré CYP, UGT a SULT, ktoré sú zapojené v metabolizme a exkrécii žlčových kyselín. (Küblbeck *et al.* 2020)

Iné štúdie však ukázali, že aktivácia CAR vedie k zvýšenej lipogenéze, zvýšeným hladinám cirkulujúcich mastných kyselín a ketónov, a potlačuje β -oxidáciu. Navyše, v primárnych hepatocytoch neovplyvnila aktivácia CAR expresiu lipogenických génov. (Moreau *et al.* 2007)

Tento nesúlad môže byť z časti spôsobený rozdielmi v metabolických podmienkach a regulácii početných ciest v rôznych experimentálnych podmienkach. V tomto prípade treba zobrať do úvahy, že HFD ovplyvňuje

expresiu, respektíve aktiváciu jadrových receptorov a ich cieľových génov. (Küblbeck *et al.* 2020)

3.4 ABC transportéry

ABC transportéry (ATP-binding cassette) predstavujú jednu z najväčších a najstarších nadrodín proteínov, ktoré sa nachádzajú vo všetkých živých organizmoch. Ich hlavnou úlohou je udržiavanie homeostázy v bunkách pomocou efluxu xenobiotík a endogénnych toxických metabolitov, a tiež sekrécia látok do systémovej cirkulácie. (Weismanová *et al.* 2012)

Väčšina ABC transportérov sú membránové proteíny transportujúce širokú škálu molekúl cez bunkové membrány, vrátane aminokyselín, lipidov, cholesterolu, iónov, vitamínov, peptidov, proteínov, polysacharidov a liečiv. (Lewinson *et al.* 2020)

Štruktúra týchto proteínov pozostáva zo štyroch funkčných domén – dve transmembránové domény (TMD1 a TMD2) a dve cytoplazmatické nukleotid-viažuce domény (NBD1 a NBD2). Kým sekvencia NBD je vysoko konzervovaná, TMD sú vysoko variabilné medzi jednotlivými transportérmi v závislosti na translokovanej molekule – obsahujú úseky pre substrátovú špecifitu. (Lewinson *et al.* 2020)

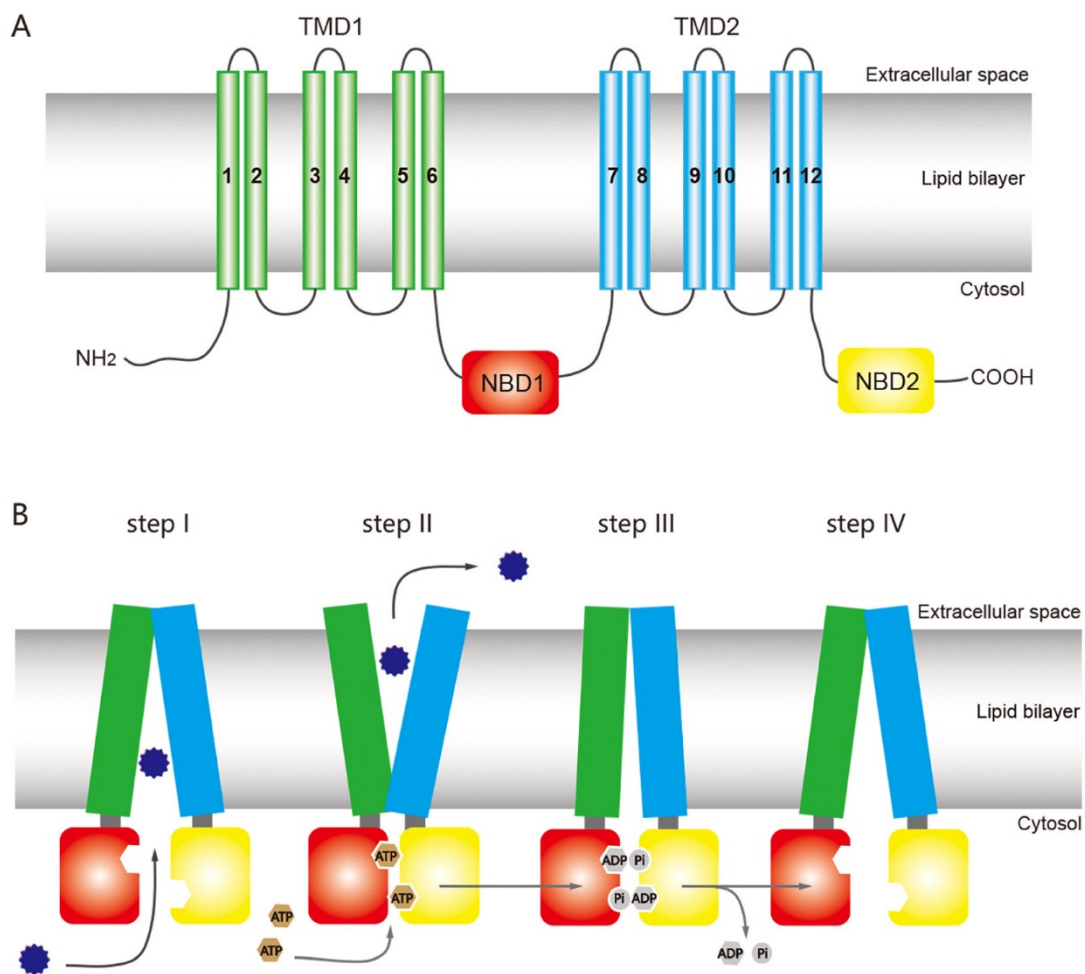
NBD je tvorená z viacerých častí, pričom každá plní určitú úlohu pri väzbe, stabilizácii a hydrolýze molekuly ATP, hlavného zdroja energie pri rotácii transportéra v cytoplazme pri efluxe látok. Medzi tieto časti patrí Walker A, C motív a Walker B. (Weismanová *et al.* 2012)

Na druhej strane, TMD hrá významnú úlohu pri výbere, uzavretí a transporte substrátu z bunky do extracelulárneho prostredia. Ide o doménu schopnú meniť svoju priestorovú konformáciu a rotovať v cytoplazmatickej membráne, čo umožňuje samotný eflux substrátu. (Weismanová *et al.* 2012)

3.4.1 Priebeh efluxu

Odstránenie xenobiotík a endogénnych toxínov z bunky prebieha vo viacerých krokoch zahrňujúcich rôzne konformačné zmeny a rotáciu ABC transportérov v cytoplazmatickej membráne.

1. Asociácia transportéru so substrátom – bez prítomnosti substrátu je transportér v tzv. otvorenej forme bez naviazanej molekuly ATP s vysokou afinitou k substrátu. Po rozoznaní a naviazaní špecifického substrátu v cytoplazme bunky alebo cytoplazmatickej membráne dochádza ku konformačným zmenám a naviazaniu molekuly ATP.
2. Väzba ATP – súčasť NBD1 nazývaná Walker A tvorí väzbu s ATP molekulou z jednej strany, a zároveň motív C z NBD2 viaže túto molekulu ATP z druhej strany, čo vytvára „sendvičovú“ väzbu (Walker A – ATP – C motív). Táto väzba zároveň uľahčuje naviazanie druhej molekuly ATP na Walker A oblasť NBD2 a motív C z NBD1, čoho výsledkom sú dve „sendvičové“ väzby dvoch molekúl ATP. Výsledkom je priblíženie TMD1 a TMD2 a prechod transportéra do uzavretej polohy, ktorá tvorí dutinu uzatvárajúcu substrát.
3. Hydrolýza prvej molekuly ATP – týmto krokom získava transportér dostatok energie na rotáciu v cytoplazmatickej membráne, kedy sa odvracia od vnútrobunkového prostredia do extracelulárneho prostredia. Výsledkom je znížená afinita TMD k substrátu, ktorý sa následne z väzby uvoľní.
4. Návrat transportéru do pôvodnej konformácie – po efluxe substrátu dochádza k hydrolýze druhej molekuly ATP. Získaná energia je využitá na návrat transportéru do pôvodnej polohy – otočený smerom do vnútra bunky v otvorenej forme. Takto pripravený transportér môže následne viazať ďalšiu molekulu substrátu. (Weismanová *et al.* 2012)



Obr. 4 Jednotlivé kroky efluxu xenobiotika pomocou ABC transportéru. Prevzaté z: Wu et al. (2019)

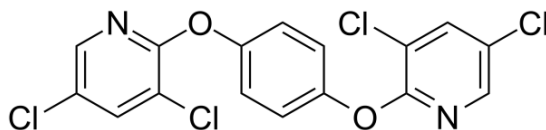
3.5 TCPOBOP

1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen (TCPOBOP), látka pôvodne izolovaná ako kontaminant pesticídov, sa neskôr ukázala byť veľmi silným fenobarbitalu podobným induktorom myšieho pečenevého cytochrómu P450. Jediná dávka dokáže zvýšiť aktivitu enzýmu monooxygenázy na viac než 20 týždňov. (Poland *et al.* 1980)

Zaujímavosťou je, že TCPOBOP je druhovo špecifický vo svojich účinkoch. Ako príklad slúži, že u potkanov a morčiat nedochádza k indukcii cytochrómu P450 ani pri výrazne vyšších dávkach. Naopak, k indukcii dochádza u Sírskych zlatých škrečkov. Predpokladá sa, že je to spôsobené prítomnosťou,

respektíve neprítomnosťou TCPOBOP responzívnych receptorov u jednotlivých druhov. (Romano *et al.* 1986)

Mimo aktivácie monooxygenázy sa vplyv TCPOBOP na pečeň myší prejavuje podobe ako fenobarbital – promótor nádorového bujenia. Dochádza k výraznému a prudkému zväčšeniu veľkosti pečene, čoho následkom je rozvoj hepatokarcinogenézy. (Smith *et al.* 1993)



Obr. 5 Chemická štruktúra TCPOBOP. Prevzaté z: MedChemExpress

4 Cieľ práce

Stanovenie expresie vybraných biotransformačných enzýmov, transportných proteínov a nukleárných receptorov v obličkách myší pomocou qRT-PCR metódy.

5 Experimentálna časť

5.1 Materiál

5.1.1 Zvieratá

V experimente boli použité nehumanizované myši albínskeho typu, ktoré boli pripravené v spolupráci so spoločnosťou Biocev. Myši boli po dobu 3 dní treatované TCPOBOP alebo len vehikulom (kontrolné vzorky), následne boli usmrtené a boli im odobraté všetky orgány. Pri našich pokusoch boli používané iba obličky, vždy cca 20 mg. Konkrétne hodnoty hmotností sú uvedené v Tab. 1.

Vzorka	*	Hmotnosť myši [g]	Hmotnosť obličiek [g]	Hmotnosť odobratého materiálu [mg]
4	T	24,7	0,30 (0,15+0,15)	21,74
5	T	29,1	0,34 (0,17+0,17)	20,34
6	C	23,3	0,30 (0,14+0,16)	20,51
8	C	25,8	0,30 (0,15+0,15)	19,52
9	C	25,2	0,30 (0,16+0,14)	20,90

Tab. 1 Hmotnosť jednotlivých myší použitých v pokuse, ich obličiek a vzoriek obličiek použitých v ďalších krokoch

* T = vzorka treatovaná TCPOBOP, C = kontrolná vzorka

5.2 Chemikálie

- TRI Reagent (Sigma Aldrich, USA)
- Chloroform (Penta, Česká republika)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, USA)
- 70 % ethanol (Penta, Česká republika)
- RevertAid RT (200 U/μl) (LifeTechnologies, USA)
- Voda pre injekcie (B. Braun, Nemecko)
- TaqMan Fast Advanced Master Mix (LifeTechnologies, USA)
- Primer/ Probe mix – Taq man sondy (LifeTechnologies, USA)

5.3 Prístroje a pomôcky

- Analytické váhy (Boeco, Nemecko)
- Automatické pipety Eppendorf Research Plus (Eppendorf, USA)
- Chladiaci stojan na mikroskúmavky (Eppendorf, USA)
- Chladená centrifúga 3K3OH (Sigma Laboratory Centrifuges, USA)
- Mikroskúmavky (Eppendorf, USA)
- Mikroskúmavky pre účely PCR (RNase free, Eppendorf, USA)
- Laminárny box TopSafe 1.8 (Bioair Instruments, Taliansko)
- Spektrofotometer NanoDrop 1 000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Špičky s filtrom na pipety s rôznym objemom (Eppendorf, USA)
- Tepelný cycler QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA)
- Vakuová odsávačka
- Skúmavky so šróbovacím viečkom (TPP, Švajčiarsko)
- Pinzeta
- Skalpel
- Petriho misky (TPP, Švajčiarsko)
- Vortex Lab Dancer (IKA, Nemecko)
- Guličky oxidu zirkoničitého (Benchmark Scientific, USA)
- Homogenizátor Fastprep-24 5G (MP Biomedicals, USA)

5.4 Metódy

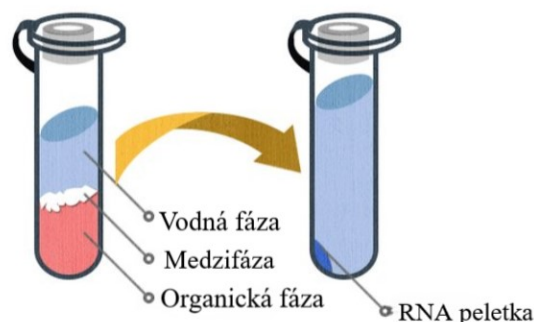
5.4.1 Izolácia RNA z obličiek

Ribonukleová kyselina (RNA) predstavuje dôležitý cieľ širokého spektra laboratórnych analýz. Často je nutné izolovať RNA z heterogénnych materiálov, ako je čerstvé alebo zmrazené tkanivo, bunkové línie alebo vzorky dlhodobo chemicky konzervované. Preto je schopnosť získať čistú a neporušenú RNA predpokladom spoľahlivých a relevantných výsledkov. (Vomelová *et al.* 2009)

5.4.1.1 Princíp

TRI Reagent predstavuje jednofázový roztok guanidín isothiokyanátu a fenolu, ktorý zachováva integritu RNA, zatiaľ čo narušuje bunky a rozpúšťa ich zložky. Po pridaní chloroformu sa táto zmes poriadne premieša, pri následnej centrifugácii dochádza k oddeleniu fáz na vodnú a organickú. RNA sa nachádza výlučne vo vodnej zložke. V organickej sú nečistoty ako extracelulárne membrány, polysacharidy a iné. Po oddelení vodnej zložky je RNA vyzrážaná isopropanolom za tvorby peletiek mRNA, ktoré sú následne prečistené pomocou ethanolu a rozpustené v DNase/RNase free vode. (Likhite *et al.* 2011)

Fázová separácia Precipitácia isopropanolom



Obr. 6 Separácia vodnej a organickej fázy a následná precipitácia gélovitej RNA peletky. Prevzaté a upravené z: <https://theory.labster.com/phenol-chloroform-method-nucleic-acid-isolation/>

5.4.1.2 Postup

Z obličiek, ktoré nám boli poslané som si najprv pripravila jednotlivé vzorky o hmotnosti cca 20 mg. Krájanie prebiehalo na ľade, aby vzorky čo najmenej podliehali denaturácii. Získané vzorky boli následne umiestnené do skúmaviek so šróbovacím viečkom a gumičkou, v ktorých už bolo 6 homogenizačných guľčiek. Ďalší krok prebiehal v laminárnom boxe – do skúmaviek bol pridaný 1ml TRI Reagentu. Takto pripravené vzorky sa následne homogenizovali pri rýchlosti 7 m/s po dobu 50s. Táto homogenizácia nebola dostatočná, tak sa pridalo ešte jedno kolo pri rýchlosti 6 m/s po dobu ďalších 40s.

K vzorkám bol následne pridaný chloroform – 200 μ l a boli pretrepávané 15s. Po odstáť 5 min pri laboratórnej teplote sa vzorky stočili v predchladenej centrifúge (15min, 12 500G, 4°C). Týmto procesom sa od seba oddelili vodná a organická fáza. Vodnú fázu (cca 500 μ l) obsahujúcu RNA som odobrala do novej skúmavky, pridala isopropanol (500 μ l) a nechala inkubovať 10 min pri laboratórnej teplote. Vyzrážaná RNA bola opäť stočená (15min, 12 500G, 4°C). Po centrifugácii bol odsatý isopropanol a na dne skúmavky bolo možné pozorovať precipitát RNA ako bielu gélovitú peletku. K tej bol následne pridaný

1ml 70% ethanolu. Ďalším krokom bol vortex skúmavky, aby sa peletka uvoľnila z dna skúmavky a dôkladne premyla. Potom boli vzorky inkubované 1 hod na ľade v chladničke. Po uplynutí tejto doby boli vzorky znovu centrifugované (15min, 12 500G, 4°C) a celé premývanie sa zopakovalo ešte raz – odsatie 70% ethanolu, pridanie 1ml nového 70% ethanolu, inkubovanie v chladničke, tentokrát cez noc. Na druhý deň boli vzorky posledný krát stočené (15min, 12 500G, 4°C), bol odsatý ethanol a peletky sa nechali schnúť 10 minút pri laboratórnej teplote. Potom boli rozpustené v 30 µl RNase free vody. Z tohto objemu sa odobrali 2 µl na zmeranie čistoty a koncentrácie RNA.

5.4.2 Spektrofotometria

Do skúmaviek boli odobraté 2 µl z každej vzorky a bolo zrealizované spektrofotometrické meranie koncentrácie RNA pomocou prístroja Nanodrop. Ako kontrolný roztok bola použitá RNase free voda. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 230, 260 a 280 nm. Zistili sa tým hodnoty koncentrácie, čistoty I (kontaminácia proteínmi) a čistoty II (kontaminácia fenolom), znázornené v Tab. 2. Hodnota čistoty I vychádza z pomeru A260/A280 a ideálne sa pohybuje nad hodnotou 1,8. Čistota II predstavuje pomer A260/A230 a v ďalších krokoch by mali byť použité vzorky, u ktorých sa blíži ku 2. Zistené hodnoty koncentrácií boli použité na nariadenie všetkých vzoriek na rovnakú koncentráciu 250 ng/µl.

Vzorka	A230	A260	A280	Čistota I	Čistota II	Nameraná koncentrácia (ng/µl)
4	22,525	51,300	25,961	1,98	2,28	2051,99
5	22,389	50,512	25,587	1,97	2,26	2020,47
6	19,965	44,405	22,608	1,96	2,23	1776,18
8	26,109	57,024	29,289	1,95	2,18	2280,98
9	26,802	57,481	29,974	1,92	2,14	2299,25

Tab. 2 Výsledky spektrofotometrie ukazujúce, že všetky vzorky sú vhodné k ďalšiemu spracovaniu

5.4.3 Reverzná transkripcia

Reverzná transkripcia zahŕňa syntézu cDNA z izolovaného mRNA pomocou RNA-dependentnej DNA polymerázy. Získame cDNA (komplementárna DNA), ktorá bude následne použitá v ďalších krokoch.

5.4.3.1 Postup

Do jednej väčšej skúmavky si napipetujeme zmes náhodných hexamérov, vodu, pufer, RNase inhibítor, zmes nukleotidov a reverznú transkriptázu. Následne si vezmeme mikroskúmavky a napipetujeme do nich pripravenú zmes a 1 µg mRNA templátu. Celý tento proces prebieha na ľadovej doštičke, aby bola zaručená čo najvyššia stabilita RNA. Získame tak 20 µl vzorky, ktoré vložíme do tepelného cycleru. Proces prepisu mRNA na cDNA sa uskutočňuje nasledovne (viz Tab. 3):

- 5 minút pri teplote 25°C
- 60 minút pri teplote 42°C
- 5 minút pri teplote 70°C

	Objem [µl]
mRNA templát (1 µg)	4
Náhodné hexaméry	1
DNase/RNase free voda	7
Pufer	4
RiboLock RNase inhibítor	1
dNTP mix	2
RevertAid RT	1

Tab. 3 Množstvo jednotlivých zložiek pre 1 reakciu. Po prebehnutí reakcie bola získaná cDNA nariedená pomocou DNase/RNase free vody

5.4.4 Real-time PCR

5.4.4.1 Princíp

Polymerázová reťazová reakcia (z angl. polymerase chain reaction) je metóda založená na *in vitro* amplifikácii špecifického fragmentu DNA z templátu cDNA. Termocycler zároveň detekuje produkt reakcie po každom cykle pomocou fluorescencie. Ide o metódu bežne využívaná v biologických a biomedicínskych odvetviach. (Zhu *et al.* 2020)

5.4.4.2 Postup

Najprv si pripravíme mastermix pozostávajúci z primerov, TaqMan Fast Advanced a vody pre injekcie (API), ktorý pipetujeme do 96 jamkovej doštičky na PCR. Následne pridáme templáty cDNA jednotlivých génov. Ako negatívna kontrola slúži API namiesto cDNA templátu. Doštičku potom vložíme do tepelného cycleru a spustíme PCR za podmienok uvedených v nasledujúcej tabuľke (viz Tab. 4 a 5).

Zložky	Objem [μ l]
Voda	4,0
TaqMan Fast Advanced	10,0
Primer	1,0
cDNA templát	5,0
Celkový objem	20,0

Tab. 4 Množstvo jednotlivých zložiek pre 1 reakciu

	Počet cyklov	Teplota [°C]	Čas [min]
Holding Stage	1	50	2:00
		95	0:20
Cycling Stage	40	95	0:01
		60	0:20

Tab. 5 Podmienky priebehu PCR

5.5 Štatistické spracovanie dát

Dáta získané z tepelného cycleru boli najprv spracované pomocou MS Excel, kedy sme z technických triplikátov jednotlivých vzoriek spočítali hodnoty priemeru jednotlivých vzoriek a ich smerodajné odchýlky. Následne sme spočítali aj priemery oboch skupín vzoriek (kontrolné a TCPOBOP treatované myši) vrátane ich smerodajných odchýliek.

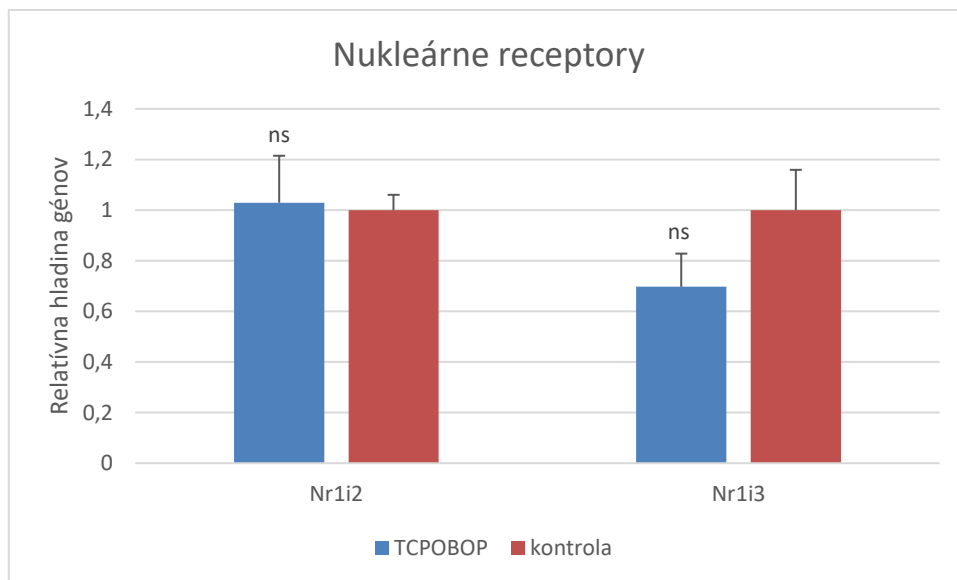
K štatistickému spracovaniu dát bol použitý software GraphPad Prism 9. Za účelom zhodnotenia štatistickej významnosti rozdielov hodnôt medzi oboma skupinami bol použitý Studentov T-test. Hodnota $P < 0,05$ je považovaná za štatisticky významnú.

6 Výsledky

V rámci experimentu sme sledovali, ako pôsobenie TCPOBOP ovplyvní expresiu génov *Nr1i3*, *Nr1i2*, *Cyp2b10*, *Cyp3a11*, *Sult1c2*, *Ugt3a2*, *Abcc2*, *Slc22a2*, *Abcb1a* a *Abcb1b* v obličkách myší. Výsledky sú vzťahnuté na dva housekeeping gény – *Gapdh* a *Actb*.

6.1 Nukleárne receptory

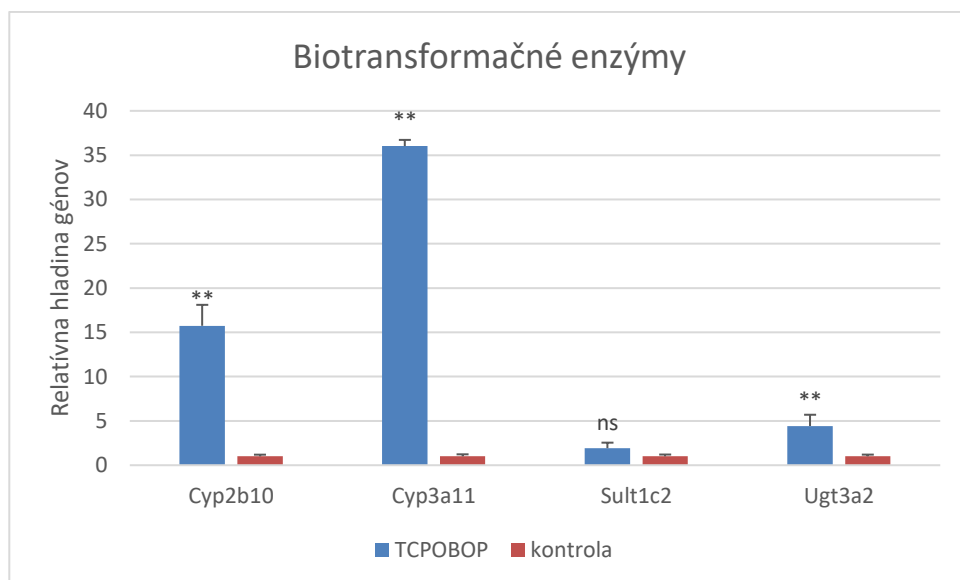
V prvej časti sme sa zamerali na gény kódujúce jadrové receptory. Na nasledujúci grafu (Obr. 7) môžeme vidieť vplyv TCPOBOP na expresiu génov *Nr1i2* a *Nr1i3*, ktorý ani v jednom prípade nebol významne ovplyvnený aktiváciou Car.



Obr. 7 Graf zobrazujúci vplyv TCPOBOP na expresiu génov kódujúcich jadrové receptory. qRT-PCR reakcie boli vykonané v technických triplikátoch, hodnota kontrolných vzoriek bola stanovená ako 1 a treatované vzorky sú vyjadrené ako ich násobky. K štatistickému vyhodnoteniu získaných dát bol použitý Studentov T-test.

6.2 Biotransformačné enzýmy

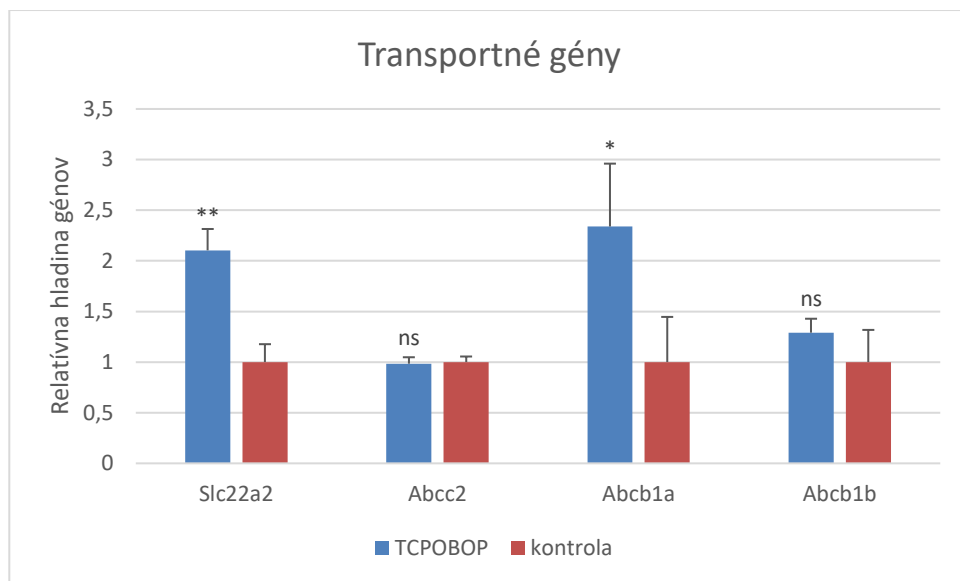
V druhej časti máme graf (Obr. 8) zobrazujúci vplyv TCPOBOP na gény kódujúce biotransformačné enzýmy, konkrétne ide o gény *Cyp2b10*, *Cyp3a11*, *Sult1c2* a *Ugt3a2*. V tomto prípade sme pozorovali významné zvýšenie expresie *Cyp2b10*, *Cyp3a11* a *Ugt3a2* pri vzorkách vystavených pôsobeniu TCPOBOP, expresia posledného vyššie spomenutého konjugačného enzýmu *Sult1c2* nebola štatisticky významne zmenená.



Obr. 8 Graf zobrazujúci vplyv TCPOBOP na expresiu génov kódujúcich biotransformačné enzýmy. qRT-PCR reakcie boli vykonané v technických triplikátoch, hodnota kontrolných vzoriek bola stanovená ako 1 a treatované vzorky sú vyjadrené ako ich násobky. K štatistickému vyhodnoteniu získaných dát bol použitý Studentov T-test $**P < 0,01$.

6.3 Transportné gény

V treťom, poslednom grafe (Obr. 9), máme vyobrazené hladiny génov, ktoré kódujú transportné proteíny – *Slc22a2*, *Abcc2*, *Abcb1a* a *Abcb1b*. V prípade génov kódujúcich transportné proteíny došlo k štatisticky významnému zvýšeniu expresie uptonového transportéru *Slc22a2* a efluxného *Abcb1a* v dôsledku aktivácie Car. Vplyv na zvyšné dva transportéry nebol významný.



Obr. 9 Graf zobrazujúci vplyv TCPOBOP na expresiu génov kódujúcich transportné enzýmy. qRT-PCR reakcie boli vykonané v technických triplikátoch, hodnota kontrolných vzoriek bola stanovená ako 1 a treatované vzorky sú vyjadrené ako ich násobky. K štatistickému vyhodnoteniu získaných dát bol použitý Studentov T-test * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

6.4 Biochemické výsledky

V nasledujúcej tabuľke (Tab. 6) sú zobrazené výsledky vybraných biochemických markerov. Žiadny z nich po podaní TCPOBOP nevykazuje štatisticky významné zmeny v hladinách. Vhodné by bolo porovnať napr. hodnoty glykémie alebo lipidov po podaní TCPOBOP, keďže predpokladáme, že by boli významne ovplyvnené, avšak tieto výsledky k dispozícii nemáme.

Vzorka	Ca ²⁺ (mmol/l)	Fe (μmol/l)	Kys. močová (μmol/l)	Urea (mmol/l)	Mg ²⁺ (mmol/l)	Fosfáty (mmol/l)	Kreatinín (μmol/l)	Na ⁺ (mmol/l)	K ⁺ (mmol/l)	Cl ⁻ (mmol/l)
T	2,51	28,71	43,03	7,6	0,94	1,73	6,9	148	4,75	108,3
T	2,37	25,07	34,1	5,75	0,82	1,78	7,41	150	4,99	111,6
C	2,28	32,02	77,58	7,05	0,79	1,75	7,59	147	5,49	109,3
C	2,28	22,56	53,24	6,13	0,87	1,65	8,79	149	4,92	109,5
C	2,35	26,63	28,48	6,9	0,75	1,49	5,57	148	4,37	108,7

Tab. 6 Výsledky biochemického vyšetrenia vzoriek. K štatistickému vyhodnoteniu získaných dát bol použitý Studentov T-test.

7 Diskusia

Xenobiotikum je termín používaný na popis chemickej zlúčeniny, ktorá je cudzia živým organizmom a zahŕňa príklady ako pesticídy, liečivá, ochucovadlá, potravinové aditíva, priemyselné chemikálie a iné. Odhaduje sa, že ľudia sú vystavení 1-3 miliónom xenobiotík počas svojho života. Väčšina týchto látok sa do tela dostáva potravou, vzduchom, pitnou vodou, podávaním liečiv a vplyvom životného štýlu. (Patterson et al. 2010)

Ako reakciu na neustále pôsobenie xenobiotík si živé organizmy vyvinuli systém na ich detoxifikáciu, s cieľom ochrany pred možnou toxicitou týchto cudzorodých látok. Tento systém pozostáva hlavne z biotransformačných enzýmov a transportérov. Prvej fázy biodegradácie sa zúčastňujú hlavne cytochrómy P450, ktoré patria do nadrodiny monooxygenáz. Tieto enzýmy sú vo vysokej miere exprimované v pečeni a tenkom čreve a ich hlavnou úlohou je katalyzovať prvý krok detoxifikácie. V tomto bode prevládajú hlavne procesy hydroxylácie a oxidácie. Konjugačné reakcie druhej fázy sú katalyzované veľkou skupinou transferáz, ako napríklad sulfotransferáza (SULT), glutathion S-transferáza (GST) a UDP-glukuronosyltransferáza (UGT). Tieto enzýmy konjugujú polárne funkčné skupiny na xenobiotiká, respektíve endobiotiká, za vzniku vo vode rozpustných, neaktívnych metabolitov vylúčených žlčou alebo močom. (Wang et al.)

V tejto práci sme sa zamerali na účinok TCPOBOP, známeho agonistu Car u myší, na expresiu biotransformačných a transportných génov v obličkách myší. Podľa toho sme aj vyberali gény, na ktoré sa zameriame – sú to cieľové gény myšacieho Car v pečeni, ale o regulácii v obličkách nie sú známe takmer žiadne informácie. Išlo konkrétne o gény *Nr1i2*, *Nr1i3*, *Cyp2b10*, *Cyp3a11*, *Sult1c2*, *Ugt3a2*, *Slc22a2*, *Abcc2*, *Abcb1a* a *Abcb1b*. *Cyp2b10* a *Cyp3a11* predstavujú modelové cieľové gény pre Car a Pxr (pričom pri *Cyp3a11* je regulácia dominantne cez Pxr a pri *Cyp2b10* je to hlavne cez Car), ide o myšie orthológy ľudských *CYP2B6* resp. *CYP3A4*. Ako kontrola nám slúžili housekeeping gény *Gapdh* a *Actb*.

Vplyv TCPOBOP na expresiu génov u myší bol už viackrát skúmaný. Väčšina štúdií sa však zamerala na pôsobenie tohto Car agonistu v pečeni. My sme sa naopak zamerali na ovplyvnenie expresie génov v obličkách, kde až tak veľa štúdií vykonaných nebolo.

Bazálna expresia CAR je najvýraznejšia v pečeni. V obličkách je CAR exprimovaný na úrovni 10 – 30% hodnôt v pečeni. Dôležité však je, že expresia CAR v obličkách je síce nižšia než v pečeni, prípadne iných orgánoch, ale stále je dosť vysoká na to, aby dochádzalo k regulácii génovej expresie aj v obličkách. (Nannelli *et al.* 2008)

Výsledky, ktoré sme získali, vo väčšine odpovedali našim predpokladom vychádzajúcim z už existujúcich štúdií. Keďže sme v rámci pokusov používali TCPOBOP, čo je známy agonista myšieho Car, predpokladali sme, že expresia génu *Nr1i3* by mohla byť ovplyvnená. Výsledky cieľovej skupiny sa však nijako významne nelíšili od kontrolnej skupiny. Ako odôvodnenie nám slúži práca Choi a kolektív (2018), kedy bol pozorovaný vplyv TCPOBOP na aktiváciu Car. Na začiatku boli myši s ischemiou obličiek, ktorá spôsobila zníženie hladiny proteínu Car v pečeni. Následné podávanie TCPOBOP spätne zvýšilo proteínovú expresiu Car a zvýšilo jeho nukleárnu translokáciu. Avšak zaujímavým zistením bolo, že expresia mRNA Car zostala na rovnakej úrovni aj po administrácii TCPOBOP. Dôvod, prečo k tomu došlo, však môže byť daný rozdielnymi fyziologickými resp. patofyziologickými parametrami. Rozdielom medzi touto prácou a našimi pokusmi však je, že my sme nepoužívali ischemické obličky.

Gén *Nr1i2* kódujúci pregnanový X receptor po podaní TCPOBOP nevykazoval žiadne ovplyvnenie expresie. Dôvodom je, že TCPOBOP nie je ligandom tohoto receptora a teda jeho podávanie na receptor žiadny významný vplyv nemá, nepredpokladá sa teda ani možnosť autoregulácie. (Torres-Vergara *et al.* 2020, Smutny *et al.* 2020) Navíc ani nebylo potvrzeno, že by PXR spadal medzi cieľové geny receptora CAR.

Cyp2b10 parí spolu s Cyp3a11 medzi hlavné biotransformačné enzýmy I. fázy. Jedná sa o analógy ľudského CYP2B6, resp. CYP3A4, ktoré sa podieľajú na biotransformácii väčšiny klinicky používaných liečiv. Tieto enzýmy sú typickými cieľovými génmi jadrových receptorov CAR (CYP2B6) a PXR

(CYP3A4) v hepatocytoch. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli práve o ich testovanie, pretože o regulácii ich génovej expresie v obličkách nie sú dostupné relevantné štúdie.

V prípade génu *Cyp2b10* sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie expresie po podaní TCPOBOP. Dôvodom je, že *Cyp2b10* je cieľový gén aktivácie Car u myší. Rovnaké výsledky pozorovali aj Baskin-Bey a kolektív (2007) pri štúdiu vplyvu TCPOBOP na myšie hepatocyty.

Výsledky expresie génu *Cyp3a11* sú porovnateľné s génom *Cyp2b10*. Keďže oba tieto gény predstavujú cieľové gény ovplyvnenia Car, po jeho aktivácii u nich, pochopiteľne, dochádza k výrazne zvýšenej expresii. K podobným výsledkom sa dopracovali aj Baskin-Bey a kolektív (2007), táto štúdia však bola vykonaná analýzou pečene myší, nie je teda možné posúdiť presnú analógiu výsledkov.

Gén *Sult1c2* vykazoval po podaní TCPOBOP zvýšenie expresie, ktoré však v dôsledku vysokej interindividuálnej variability nebolo štatisticky významné. Pre potvrdenie trendu by bolo treba otestovať väčšie množstvo tkanív získaných z väčšieho počtu jedincov. Žiadne štúdie sa doposiaľ nezaoberali reguláciou *Sult1c2* v obličkách, avšak dáta získané z pečene myší naznačujú, že by mohla byť táto regulácia významná. Vo viacerých štúdiách bol sledovaný vplyv TCPOBOP aj na tento gén, poväčšine v pečeni. V tomto orgáne vykazoval vždy významne zvýšenú expresiu, svedčia o tom aj práce Cheng a kolektív (2017) a Alnouti a Klaassen (2011). Najpravdepodobnejším dôvodom, prečo tomu tak je, je metabolická aktivita pečene, ako hlavného biotransformačného orgánu, v porovnaní s obličkami. Keďže v pečeni prebieha významná väčšina dôležitých metabolických procesov, je tu samozrejme zvýšená expresia *Sult*, ktoré môžu následne citlivejšie reagovať na podanie Car agonistu TCPOBOP. (Park *et al.* 2016, Cheng *et al.* 2017, Runge Morris *et al.* 2013)

Ugt3a2 je gén podieľajúci sa na detoxifikácii cudzorodých látok z tela počas II. fázy metabolizmu. U myší je tento gén exprimovaný hlavne v pečeni a obličkách. Štúdia Meech a kolektívu (2012) sa podrobnejšie zaoberala génmi *UGT3A*. Popisovala, že u myší je v obličkách omnoho vyššia expresia *Ugt3a2* oproti *Ugt3a1* (v oboch prípadoch sa jedná o orthológy ľudského *UGT3A1* génu,

pričom *Ugt3a2* má bližšie k ľudskému *UGT3A1*). Neskúmala však vplyv žiadneho Car agonistu na expresiu nami sledovaného génu. Na druhej strane, práca Li a kolektívu (2015) sa zamerala na vplyv mimo iného TCPOBOP na expresiu viacerých transkripčných faktorov – medzi inými aj *Ugt2b34*, *Ugt2b35* a *Ugt2b36*. Vo výsledku teda zatiaľ neexistuje žiadna štúdia, ktorá by sa zamerala na myšší gén *Ugt3a2* a ovplyvnenie jeho expresie pomocou TCPOBOP.

Vyššie spomenuté práce (Meech *et al.* 2012, Li *et al.* 2015) nám však pomáhajú pochopiť, prečo sme pri našich pokusoch pozorovali štatisticky významné zvýšenie expresie *Ugt3a2* po podaní TCPOBOP. Vysoká bazálna hladina tohoto génu citlivo reagovala na podanie Car agonistu a výsledkom bolo viac než 4-násobné zvýšenie expresie.

Slc22a2 je gén kódujúci transportný proteín Oct2. Tento gén patrí do početnej rodiny génov *Slc22*, ktoré hrajú kľúčovú rolu v transporte malých endogénnych molekúl, liekov a toxínov medzi tkanivami a telovými tekutinami. *Slc22a2* je primárne exprimovaný v obličkách, ale v menšom množstve ho nájdeme aj ďalších tkanivách. Ako už z názvu vyplýva, zabezpečuje hlavne transport kationov, ale v menšom množstve transportuje aj anióny a zwitterióny. V obličkách je umiestnený na bazolaterálnej membráne proximálneho tubulu a zabezpečuje transport kationických liečiv a endomolekúl z krvi do tubulárnych buniek. (Yue Cui a D.Klaassen, Nigam)

Konkrétne tento gén ešte nebol študovaný, čo sa týka účinku TCPOBOP na jeho expresiu. Avšak v podobnej štúdii od Wang a kolektív (2017) boli sledované rôzne transportné proteíny v obličkách v súvislosti s hladinami bilirubínu. V momente zvýšenej produkcie bilirubínu spôsobenej alkoholickým poškodením pečene došlo k zníženiu expresie sledovaných génov – mimo iného *Oatp1a1* (*Slco1a1*) v obličkách. Po následnom podaní TCPOBOP došlo k navráteniu hladín Car na pôvodnú úroveň, zníženiu hladín bilirubínu a zvýšeniu expresie *Oatp1a1* (Wang *et al.* 2017). Tieto poznatky naznačujú, že Car môže aj napriek svojej dominantne pečenej lokalizácii regulovať génovú expresiu v obličkách. V ďalšej štúdii vykonanej na primárnych ľudských hepatocytoch bolo zistené, že príbuzný transportér s primárne pečenej lokalizáciou – OCT1 (*SLC22A1*), bol down-regulovaný po vystavení buniek pôsobeniu fenobarbitalu,

ktorý je považovaný za agonistu ľudského CARu (Jirogel *et al.* 2006). Avšak nejedná sa o agonistu špecifického pre CAR, ale je schopný aktivovať aj PXR, čo môže vysvetľovať vyššie spomínanú down-reguláciu OCT1, ktorá bola už v minulosti popísaná (Hyrsova *et al.* 2016, Linhao *et al.* 2019). Avšak v práci publikovanej Jirogelom a kolektívom musíme vziať na vedomie väčšie množstvo rozdielnych parametrov, vrátane použitého tkaniva, medzidruhových rozdielov i možné odlišnosti medzi regulačnými špecifikami daných transportérov, ktoré môžu vysvetliť nimi popísanú down-reguláciu oproti nami pozorovanému zvýšeniu expresie *Slc22a2*.

Abcc2 je gén kódujúci Mrp2 efluxný proteín, ktorého expresia je regulovaná pomocou Car a Pxr. Z toho vyplýva, že podávanie agonistov týchto receptorov bude viesť k značnej indukcii *Abcc2* mRNA hodnôt. V štúdií Kast *et al.* (2002) bol použitý fenobarbital, ktorý aktivuje ľudský CAR a PXR, a u myší sa chová len ako agonista Car. Testované boli ľudské, potkanie a myšacie hepatocyty. Podávanie fenobarbitalu viedlo k zvýšenej expresii *Abcc2* mRNA. Naše výsledky však tejto štúdií neodpovedajú. Dôvodom môže byť použitie rozdielnych orgánov či agonistov. Mrp2 je ako efluxný proteín vo vysokej miere exprimovaný v pečeni, avšak v obličkách až také vysoké zastúpenie nemá. Druhým dôvodom môže byť použité rozdielneho agonistu. Kým fenobarbital pôsobí ako nešpecifický agonista a môže zvyšovať expresiu génu *Abcc2* rôznymi mechanizmami, TCPOBOP svojim rozdielnym pôsobením nemusí aktivovať cesty potrebné k zvýšeniu hladín *Abcc2*.

Abcb1a je gén kódujúci proteín Mdr1a. Ide o významný efluxný transportér, ktorý chráni bunky pred toxickým vplyvom látok, vrátane liečiv. Ľudským orthológom je *ABCB1*, teda gén kódujúci MDR1, tiež známy ako P-glykoprotein. V štúdií (Wang *et al.* 2017) bola po podaní TCPOBOP pozorovaná zvýšená expresia *Abcb1a* v kapilárach mozgu u myší a potkanov. Ďalšia práca, ktorá sa venovala vplyvu TCPOBOP na expresiu *Abcb1* bola štúdia od Lemmen a kolektív (2013), kde boli sledované zmeny vyvolané pôsobením rôznych agonistov na Car. Sledované boli gény *Abcb1* a *Abcg2*, pokusnými zvieratami boli v tomto prípade prasatá. Boli im podávaní Car agonisti CITCO a TCPOBOP. Výsledkom bolo, že po podaní CITCO došlo k zvýšenej expresii sledovaných génov, v prípade TCPOBOP bol výsledok opačný. Vyplýva z toho,

že TCPOBOP pôsobí ako selektívny agonista CAR u myší, a u ľudí, resp. u prasiat ako agonista nepôsobí. (Lemmen *et al.* 2013)

V inej štúdii (Cui a Klaassen, 2016) bol pozorovaný vplyv CAR agonistov na rôzne gény ovplyvňujúce metabolizmus v pečeni. Mimo iného bol pozorovaný aj vplyv TCPOBOP na gén *Abcb1a*. Výsledkom bola významná up-regulácia tohoto génu – zhruba 1,5-násobné zvýšenie. Naše výsledky odpovedajú tejto štúdii. Cieľovým orgánom síce boli obličky, ale po podaní TCPOBOP takisto došlo k štatisticky významnému zvýšeniu expresie – zhruba dvojnásobnému.

Abcb1b, gén kódujúci proteín Mdr1b nie je až tak dopodrobna preskúmaný, čo sa vplyvu TCPOBOP na jeho expresiu týka, obecné sa považuje za málo indukovateľný, avšak jeho expresia v obličkách je všeobecne vyššia (Klaassen et Aleksunes, 2010). Štúdia Whyte-Allman *et al.* (2017) sa však bližšie zamerala na Car a Pxr a ich úlohu v regulácii transportných proteínov na úrovni hematotestikulárnej bariéry (BTB, blood-testis barrier) u myší. Zistili, že po podaní TCPOBOP sa zvýšila expresia *Abcb1b* približne 1,5-násobne, čo znamená, že Car zasahuje do regulácie tohoto ABC transportéru. Naše výsledky tiež zaznamenali mierne zvýšenie expresie *Abcb1b* po podaní TCPOBOP, takmer 1,3-násobne, čo však nie je štatisticky významné zvýšenie. Hlavným dôvodom týchto rozdielnych výsledkov môže byť použitie rôznych orgánov, kde v prípade BTB môže byť expresia nami sledovaného génu citlivejšie ovplyvnená daným Car agonstom, než v prípade obličiek. Mierne zvýšenie expresie môže byť tiež spôsobené tým, že P-gp v obličkách reaguje na prítomnosť TCPOBOP ako exogénneho toxínu a zvýšená expresia je odpoveďou organizmu na snahu odstrániť túto látku z organizmu. Nezanedbateľná nie je ani možná interindividuálna variabilita, ktorej sa dá vyhnúť použitím väčšieho súboru testovaných obličiek myší. (Whyte-Allman *et al.* 2017, Huls *et al.* 2007).

Prekážkou ale zároveň i výhodou, s ktorou sme sa počas tejto práce stretávali najviac, je nedostatok štúdií, z ktorých by sa dalo vychádzať, resp. porovnať s nimi naše výsledky. Len málo výskumných skupín sa venuje sledovaniu aktivácie Car v obličkách, prevažná väčšina je zameraná na pečeň, ako hlavný metabolický orgán.

8 Záver

Cieľom tejto práce bolo preskúmať vplyv TCPOBOP, agonistu myšieho Car na expresiu vybraných génov – *Nr1i3*, *Nr1i2*, *Cyp3a11*, *Cyp2b10*, *Sult1c2*, *Ugt3a2*, *Abcc2*, *Slc22a2*, *Abcb1a* a *Abcb1b*. Zistili sme, že táto látka významne zvyšuje expresiu génov *Cyp3a11* a *Cyp2b10*, ktoré predstavujú cieľové gény aktivácie Car u myší. Významné zvýšenie sme pozorovali tiež u génov *Slc22a2* a *Ugt3a2*. U génu *Nr1i3* výsledky naznačujú, že myšací Car pravdepodobne nepodlieha autoregulácii, pretože cieľová aj kontrolná skupina vykazovali zhruba rovnakú expresiu tohto génu. Pre presnejšie vyjadrenie by bolo potrebné použiť väčšie množstvo vzoriek aj z dôvodu možnej vyššej interindividuálnej variability. Gén *Nr1i2* nepredstavuje cieľový ligand pre myšací Car, takže jeho expresia nebola počas pokusu ovplyvnená. Nakoniec, u génov *Sult1c2*, *Abcc2*, *Abcb1a* a *Abcb1b* výsledná expresia nebola významne odlišná medzi jednotlivými testovanými skupinami.

Poznatky získané z týchto pokusov teda môžu byť ďalej použité pri výskume regulácie génovej expresie prostredníctvom jadrových receptorov a následný vplyv na metabolizmus xenobiotík, a to nie len v pečeni – hlavnom metabolickom orgáne, ale aj ďalších extrahepatálnych tkanivách, ako sú nami hodnotené obličky. Význam tejto štúdie teda nespočíva len v odhaľovaní nových faktov, ale môže prispieť i k zvýšeniu bezpečnosti farmakoterapie.

9 Literatúra

1. di Masi A., De Marinis E., Ascenzi P., Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects, *Molecular Aspects of Medicine*, 2009, 30, s. 297-343
2. Frigo D.E., Bondesson M., Williams C. Nuclear receptors: from molecular mechanism to therapeutics. *Essays in Biochemistry*, 2021, 65, s. 847-856
3. Kelly M.E., Mohan H.M., Baird A.W., Ryan E.J., Winter D.C. Orphan Nuclear Receptors in Colorectal Cancer. *Pathology & Oncology Research*, 2018, 24, s. 815-819
4. Küblbeck J., Niskanen J., Honkakoski P. Metabolism-Disrupting Chemicals and the Constitutive Androstane Receptor CAR. *Cells*, 2020, 9, s. 2306
5. Lewinson O., Orelle C., Seeger M.A. Structures of ABC transporters: handle with care. *FEBS Letters*, 2020, 594, s. 3799 – 3814
6. Moreau A., Vilarem M.J., Maurel P., Pascussi J.M. Xenoreceptors CAR nad PXR Activation and Consequences on Lipid Metabolism, Glucose Homeostasis, and Inflammatory Response, *Molecular Pharmaceutics*, 2007, 5, s. 35-41
7. S.P.H Alexander., Cidlowski J.A., Kelly E., Mathie A., Peters J.A., Veale E.L., Armstrong J.F., Faccenda E., Harding S.D., Pawson A.J., Sharman J.L. Southan Ch., Davies J.A. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: Nuclear hormone receptors, *British Journal of Pharmacology*, 2019, 176, s.229-246
8. Sever R., Glass C.K. Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013,5:a016709
9. Skálová L., Boušová I. et al. Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik, 1. vydání, Praha: Karolinium, 2011, s. 7-11
10. Van Vugt-Lussenburg B.M.A., Capinha L., Reinen J., Rooseboom M., Kranendonk M., Onderwater R.C.A., Jennings P. „Commandeuring“ Xenobiotic Metabolism: Advances in Understanding Xenobiotic Metabolism. *Chem. Res. Toxicol.*, 2022, 35, s. 1184-1201

11. Weikum E.R., Liu X., Ortlund E.A. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science*, 2018, 27, s. 1876-1892
12. Weismanová E., Horváth L., Markus J., Rauová K., Lehotská V., Špánik S., Sopko L., Konečný M., Weismann. ABC transportéry: vývoj liekovej rezistencie a iných patologických stavov. *Onkológia*, 2012, 7, s. 39 – 44
13. Nová A. Interakce léčiv s nukleárními receptory při regulaci biotransformačních enzymů a lékových transportérů. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2013, s.15-16
14. Iovdijová A., Bencko V. Potential risk of exposure to selected xenobiotic residues and their fate in the food chain – Part I: Classification of Xenobiotics. *Ann Agric Environ Med*, 17, s. 183 – 192
15. Vomelová I., Vaníčková Z., Šedo A. Methods of RNA Purification. All Ways (Should) Lead to Rome, *Folia Biologica*, 2009, 55, s. 243-251
16. Likhite N., Warawdekar U.M. A Unique Method for Isolation and Solubilization of Proteins after Extraction of RNA from Tumor Tissue Using Trizol, *Journal of Biomolecular Techniques*, 2011, 22, s. 37-44
17. Smith G., Henderson C.J., Parker M.G., White R., Bars R.G., Wolf C.R. 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, an extremely potent modulator of mouse hepatic cytochrome P-450 gene expression, *Biochem. J.*, 1993, 289, s. 807-813
18. Poland A., Mak I., Glover E., Boatman R.J., Ebentino F.H., Kende A.S. 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity, *Mol. Pharmacol.* 1980, 18, s. 571-580
19. Romano M., Esteve A., Coccia P., Masturzo P., Galliani G., Ghezzi P., Salmona M. Biochemical characterization of the hepatic effects in mice and rats of 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a hepatic neoplasm promoter, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1986, 33, s. 379-385
20. Urquhart B.L., Tirona R.G., Kim R.B. Nuclear Receptors and the Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters: Implications for Interindividual Variability in Response to Drugs, *Journal of Clinical Pharmacology*, 2007, 47, s. 566-578

21. Pustyl'nyak Y.A., Gulyaeva L.F., Pustyl'nyak V.O. Noncanonical Constitutive Androstane Receptor Signaling in Gene Regulation, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21, s. 6735
22. Wallace B.D., Redinbo M.R. Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: a structural perspective, *Drug Metab Rev.*, 2013, 45, s. 79-100
23. Baskin-Bey E.S., Anan A., Isomoto H., Bronk S.F., Gores G.J. Constitutive androstane receptor agonist, TCPOBOP, attenuates steatohepatitis in the methionine choline-deficient diet-fed mouse, *World Journal of Gastroenterology*, 2007, 13, s. 5635-5641
24. Kast H.R., Goodwin B., Tarr P.T., Jones S.A., Anisfeld A.M., Stoltz C.M., Tontonoz P., Kliewer S., Willson T.M., Edwards P.A. Regulation of Multidrug Resistance-associated Protein 2 (ABCC2) by the Nuclear Receptors Pregnane X Receptor, Farnesoid X-activated Receptor, and Constitutive Androstane Receptor, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, s. 2908-2915
25. Van der Schoor L.W.E, Verkade H.J., Kuipers F., Jonker J.W. New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2014, 11, DOI: 10.1517/17425255.2015.981152
26. Choi Y., Zhou D., Barbosa A.C.S., Niu Y., Guan X., Xu M., Ren S., Nolin T.D., Liu Y., Xie W. Activation of Constitutive Androstane Receptor Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion-Induced Kidney and Liver Injury, *Molecular Pharmacology*, 2018, 93, s. 239-250
27. Patterson A.D., Gonzalez F.J., Idle J.R. Xenobiotic Metabolism – A view through the metabolometer, *Chem Res Toxicol.*, 2010, 23(5), 851-860
28. Wiech A., Tarczewska A., Ozyhar A., Orłowski M. Metal Ions Induce Liquid Condensate Formation by the F Domain of *Aedes aegypti* Ecdysteroid Receptor. New Perspectives of Nuclear Receptor Studies, *Cells*, 2021, 10, s. 571
29. Wang Y.M., Ong S.S., Chai S.C., Chen T. Role of CAR and PXR in Xenobiotic Sensing and Metabolism, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8(7), s. 803-817

30. Mottino A.D., Catania V.A. Hepatic drug transporters and nuclear receptors: Regulation by therapeutic agents, *World Journal of Gastroenterology*, 2008, 14(46), s. 7068-7074
31. Idle J.R., Gonzalez F.J. Metabolomics, *Cell Metab.*, 2007, 6(5), s. 348-351
32. Dong B., Saha P.K., Huang W., Chen W., Abu-Elheiga L.A., Wakil S.J., Stevens R.D., Ilkayeva O., Newgard C.B., Chan L., et al. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, s. 18831-18836
33. Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors, *Pharmacol Rev.*, 2006, 58, 685-704
34. Blumberg B., Evans R.M. Orphan nuclear receptors – new ligands and new possibilities, *Genes Dev*, 1998, 12, s. 3149-3155
35. Ring C.L., Pearce R.G., Setzer R.W., Wetmore B.A., Wambaugh J.F. Identifying Populations Sensitive to Environmental Chemicals by Simulating Toxicokinetic Variability, *Environ. Int.*, 2017, 106, s. 105-118
36. Nannelli A., Chirulli V., Longo V., Garvasi G. Expression and induction by rifampicin of CAR- and PXR-regulated CYP2B and CYP3A in liver, kidney and airways of pig, *Toxicology*, 2008, 252, s. 105-112
37. Nigam S.K. The SLC22 Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling and Disease, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 2018, 58, s. 663-678
38. Huls M., Kramers C., Levtchenko EN, Wilmer MJG, Dijkman HBPM, Kluijtmans LAJ, van der Hoorn JWA, Russel FGM, Masereeuw R. P-glycoprotein-deficient mice have proximal tubule dysfunction but are protected against ischemic renal injury, *Kidney International*, 2007, 72, s. 1233-1241
39. Whyte-Allman S.K., Hoque Md T., Jenabian M.A., Routy J.P., Bendayan R. Xenobiotic Nuclear Receptors PRegnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Regulate Antiretroviral Drug Efflux Transporters at the Blood-Testis Barrier, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2017, 363, s. 324-335
40. Wang X., Zheng L., Wu J., Tang B., Zhang M., Zhu D., Lin X. Constitutive androstane receptor activation promotes bilirubin clearance

in a murine model of alcoholic liver disease, *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15, s. 3459-3466

41. Meech R. Rogers A., Zhuang L., Lewis B.C., Miners J.O., Mackenzie P.I. Identification of Residues That Confer Sugar Selectivity to UDP-Glycosyltransferase 3A (UGT3A) Enzymes, *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287, s. 24122-24130
42. Yue Ciu J., Klaassen C.D. RNA-Seq Reveals Common and Unique PXR- and CAR-target Gene Signatures in the Mouse Liver Transcriptome, *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(9), s. 1198-1217
43. Cheng S.L., Bammler T.K., Yue Ciu J. RNA Sequencing Reveals Age and Species Differences of Constitutive Androstane Receptor-Targeted Drug-Processing Genes in the Liver, *Drug Metabolism and Disposition*, 2017, 48, s. 867-882
44. Park S., Cheng S.L., Yue Cui J. Characterizing drug-metabolizing enzymes and transporters that are *bona fide* CAR-target genes in mouse intestine, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2016, 6(5), s. 475-491
45. Li C.Y., Renaud H.J., Klaassen C.D., Yue Ciu J. Age-specific Regulation of Drug-Processing Genes in Mouse Liver by Ligands of Xenobiotics-Sensing Transcription Factors, *Drug Metabolism and Disposition*, 2016, 44, s. 1038-1049
46. Torres-Bergara P., Ho Y.S., Espinoza F., Nualart F., Escudero C., Penny J. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor in the brain, *The British Pharmacological Society*, 2020, 177, s. 2666-2682
47. Runge-Morris M., Kocarek T.A., Falany Ch.N. Regulation of the cytosolic sulfotransferases by nuclear receptors, *Drug Metab Rev.*, 2013, 45(1), doi: 10.3109/03602532.2012.748794
48. Zhu H., Zhang H., Xu Y., Laššáková S., Korabečná M., Neužil P. PCR past, present and future, *Bio Techniques*, 2020, 69, doi: 10.2144/btn-2020-0057
49. Alnouti Y., Klaassen C.D. Mechanisms of gender-specific regulation of mouse sulfotransferases (Sults), *Xenobiotica*, 2011, 41(3), s. 187-197

50. Klaassen C.D., Aleksunes L.M. Xenobiotic, Bile Acid and Cholesterol Transporters: Function and Regulation, *Pharmacological Reviews*, 2010, 62, s. 1-96
51. Hyrsova L., Smutny T., Carazo A., Moravcik S., Mandikova J., Trajtnar F., Gerbal-Chaloin S., Pavek P. The pregnane X receptor down-regulator organic cation transporter 1 (SLC22A1) in human hepatocytes by competing for („squelching“) SRC-1 coactivator, *British Journal of Pharmacology*, 2016, 173, s. 1703-1715
52. Linhao L., Welch M.A., Li Z., Mackowiak B., Heyward S., Swaan P.W., Wang H. Mechanistic Insight of Phenobarbital-mediated activation of Human but not Mouse Pregnane X Receptor, *Molecular Pharmacology Fast Forward*, 2019, doi: 10.1124/mol.119.116616
53. Smutny T., Dusek J., Hyrsova L., Nekvindova J., Horvatova A., Micuda S., Gerbal-Chaloin S., Pavek P. The 3'-untranslated region contributes to the pregnane X receptor (PXR) expression down-regulation by PXR ligands and up-regulation by glucocorticoids, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, 10(1), s. 136-152
54. Jirogel E., Le Vee M., Boursier-Neyret C., Parmentier Y., Fardel O. Differential Regulation of Sinusoidal and Canalicular Hepatic Drug Transporter Expression by Xenobiotics Activating Drug-Sensing Receptors in Primary Human Hepatocytes, *Drug Metabolism and Disposition*, 2006, 34(10), s. 1756-1763
55. Lemmen J., Tozakidis I.E.P., Bele P., Galla H.J. Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1 and Abcg2 at the blood-brain barrier after CITCO activation, *Brain Research*, 2013, 1501, s. 68-80

Internetové zdroje

1. Anonym. Pharmacol Res. TCPOBOP. 2020, 161:105110. Dostupné na URL <https://www.medchemexpress.com/tcpobop.html>
Prístup 10. 12. 2022
2. Fernandez E. Crystal structure of constitutive androstane receptor. 2005. Dostupné na URL <https://www.rcsb.org/structure/1XNX>
Prístup 10.12. 2022
3. Wu Ch., Chakrbarty S., Jin M., Liu K., Xiao Y. Insect ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters: Roles in Xenobiotic Detoxification and Bt Insecticidal Activity. 2019. Dostupné na URL <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/11/2829#> Prístup 23. 1. 2023