

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Studium vlivu flavonoidních látek na expresi biotransformačních
enzymů**

Study of effect of flavonoids on biotransformation enzymes expression

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Kamila Koucká

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Moserová, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Michaely Moserové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce RNDr. Michaele Moserové, Ph.D. za poskytnuté odborné rady, ochotu, trpělivost a také čas, který mi věnovala.

Abstrakt

Flavonoidy patří do skupiny fenolických látek řadící se mezi sekundární metabolity rostlin, které jsou zastoupeny převážně v ovoci a zelenině. Tyto látky vykazují antioxidační a anti-kancerogenní účinky. Některé z nich mohou mít vliv na biotransformační enzymy, mezi něž se řadí i cytochromy P450, a mohou tak ovlivňovat metabolismus xenobiotik.

V předkládané bakalářské práci byl studován vliv dihydromyricetinu na genovou expresi cytochromu P450 1A1, 1A2 a cytochromu b₅ v játrech, plicích, ledvinách, tlustém a tenkém střevě laboratorního potkana. Tenké střevo bylo rozděleno na tři části, a to proximální, střední a distální. Nejprve byla provedena izolace celkové RNA za využití komerčně dostupného činidla a dále byla izolovaná RNA převedena na cDNA metodou reverzní transkripce. Nakonec byla využitím polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) stanovena relativní genová exprese sledovaných genů v orgánech potkanů premedikovaných dihydromyricetinem a potkanů kontrolních, nepremedikovaných, vůči referenčnímu genu β -aktinu. Bylo zjištěno, že ve většině orgánů dihydromyricetin neměl signifikantní vliv na expresi sledovaných genů. Ovšem signifikantní snížení genové exprese CYP1A1 a CYP1A2 bylo zaznamenáno v plicích. Naopak nárůst genové exprese byl zjištěn v ledvinách v případě CYP1A2 a cytochromu b₅ v játrech.

Klíčová slova: flavonoidy, exprese, RT-PCR, cytochrom P450

Abstract

Flavonoids belong to the group of phenolic compounds included in the secondary metabolites of plants, which are represented mainly in fruits and vegetables. These compounds have antioxidant and anti-carcinogenic effects. Some of them can affect biotransformation enzymes, which include the cytochrome P450 and can interfere with the metabolism of xenobiotics.

In the present work we studied effect of dihydromyricetine on the gene expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and cytochrome b₅ in livers, lungs, kidneys, colon and small intestine of laboratory rats. The small intestine was divided into three parts namely a proximal, middle and distal. At first, isolation of total RNA was made using commercial reagents and isolated RNA was converted to cDNA by reverse transcription. Finally, using polymerase chain reaction in real time (RT-PCR), the relatively gene expression of genes observed in the organs of laboratory rats pretreated dihydromyricetine and control laboratory rats (untreated) to a reference gene β -actin was determined. It was found that dihydromyricetine did not significantly affect the gene expression of studied genes in most organs. However, a significant decrease of gene expression of CYP1A1 and CYP1A2 was observed in the lungs. On the contrary, an increase of gene expression of CYP1A2 was found in the kidneys and of cytochrome b₅ in livers.

„(In Czech)“

Keywords: flavonoids, expression, RT-PCR, cytochrome P450

Obsah

1	ÚVOD	10
1.1	Flavonoidy	10
1.1.1	Skupiny flavonoidů a jejich výskyt	10
1.1.2	Metabolismus flavonoidů	12
1.1.3	Dihydromyricetin	12
1.2	Biotransformace xenobiotik	14
1.2.1	První fáze biotransformace	15
1.2.2	Druhá fáze biotransformace	15
1.3	Cytochromy P450	16
1.3.1	Struktura cytochromů P450	16
1.3.2	Klasifikace cytochromů P450	17
1.3.3	Reakční cyklus cytochromů P450	17
1.3.4	Cytochromy P450 rodiny 1	19
1.4	Receptor pro aromatické uhlovodíky	20
1.4.1	Struktura receptoru	20
1.4.2	Signalizační dráha	21
1.5	Cytochrom b₅	22
2	CÍL PRÁCE	24
3	MATERIÁL A METODY	25
3.1	Použité chemikálie	25
3.2	Použité přístroje	26
3.3	Metody	26
3.3.1	Premedikace potkanů	26
3.3.2	Izolace RNA	27
3.3.3	Horizontální agarosová elektroforéza	28

3.3.4 Stanovení čistoty a koncentrace RNA	29
3.3.5 Přepis RNA do cDNA.....	30
3.3.6 Polymerasová řetězová reakce v reálném čase	31
3.3.7 Statistické vyhodnocení „real-time“ polymerasové řetězové reakce.....	33
4 VÝSLEDKY	34
4.1 Izolace RNA, stanovení čistoty a koncentrace	34
4.2 Reverzní transkripce a „real-time“ polymerasová řetězová reakce	36
5 DISKUZE	43
6 ZÁVĚR	45

Seznam použitých zkratek

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky
Arnt	jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků („aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“)
A _x	absorbance při vlnové délce x nm
bHLH	doména „helix-loop-helix“
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
C _t	„cycle threshold“
CYP	cytochrom P450
dHMR	dihydromyricetin
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
DRE	„dioxin responsive element“
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GABA	kyselina γ -aminomáselná („ γ -aminobutyric acid“)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie („high performance liquid chromatography“)
HSP90	protein teplotního šoku o molekulové hmotnosti 90 kDa („heat shock protein“)
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie („mass spectrophotometry“)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NES	„nuclear export signal“

NLS	„nuclear localization signal“
NMR	nukleární magnetická resonance („nuclear magnetic resonation“)
PAS	„Per-Arnt-Sim“
RT-PCR	polymerasová řetězová reakce v reálném čase („real-time polymerase chain reaction“)
Per	„Drosophila Period“
Sim	„Drosophila Single-minded“
TAD	„transactivation domain“
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
XRE	„xenobiotic response element“

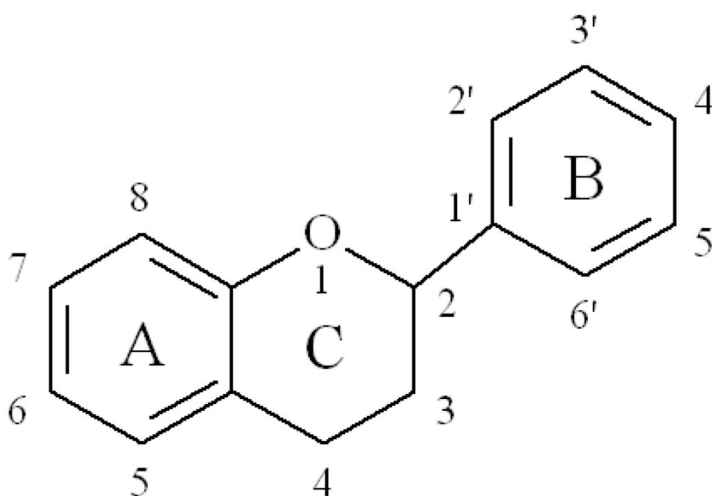
1 Úvod

Flavonoidy se do povědomí populace dostávají stále více. Lidé se o ně zajímají díky jejich příznivým účinkům na organismus, zahrnout mezi ně můžeme kardiovaskulární protektivitu a protinádorové účinky. Studium flavonoidních látek je stále na vzestupu [1,2].

1.1 Flavonoidy

Flavonoidy patří mezi přírodní fenolické látky. V přírodě se vyskytují jako konjugáty v glykosidické nebo esterifikované formě [3]. Zájem o ně v poslední době stále roste díky antioxidačním a protizánětlivým účinkům. Obecně jsou chápány jako zdraví prospěšné [4].

Flavonoidy jsou obsaženy v rostlinách, proto se jim také říká rostlinné fenoly. Základem je flavanové jádro složené z 15 atomů uhlíku, které tvoří 3 navzájem propojené kruhy (C6-C3-C6) viz Obr. 1. Rozdělení do podskupin je závislé na oxidaci a substituci C kruhu. Jednotlivé druhy v rámci jedné podskupiny pak závisí na substituci na dvou benzenových kruzích A, B a prostředního pyranového kruhu C [5].

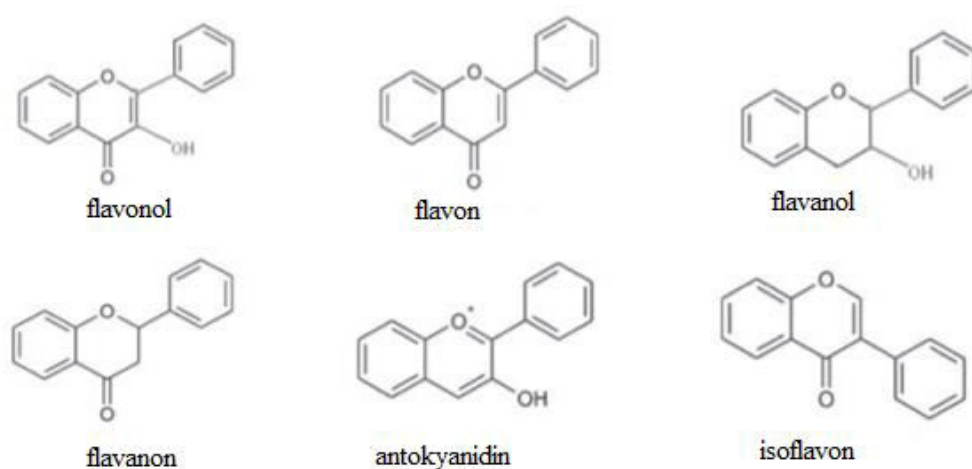


Obr. 1: Struktura flavonoidu. Převzato z [6].

1.1.1 Skupiny flavonoidů a jejich výskyt

V závislosti na substituentech můžeme flavonoidy rozdělit do osmi skupin: flavany, flavonoly, flavanony, isoflavanony, flavony, isoflavony, antokyanidiny, chalkony a flavonoligandy. Struktura těchto sloučenin je odvozena od chromanu [7].

Je-li v pozici C2 nebo C3 na pyranovém kruhu (kruh C) substituovaný fenyl, hovoříme o flavanech. Pokud je v pozici C4 oxo skupina a zároveň substituce fenylem na C2, jedná se o flavanony, v případě substituce na C3 o isoflavanony. Dvojná vazba mezi C2 a C3 na pyranovém kruhu v kombinaci se substitucí na C2 je charakteristická pro flavony a na C3 pro isoflavony. Struktury několika flavonoidů jsou uvedeny na Obr. 2. Přítomnost další dvojně vazby (na C kruhu namísto oxo skupiny) je důvodem barevnosti skupiny flavonoidů, která je nazývána antokyanidiny. Dále mezi flavonoidy řadíme skupinu látek obsahující pouze dva kruhy (A, B) a otevřený C kruh, kterou značíme jako chalkony [7].



Obr. 2: Třídy flavonoidů. Převzato z [7].

Mezi flavonoly, jenž se převážně vyskytují především v cibuli, rajčatech, brokolici i jablkách, se řadí např. quercetin, myricetin a kaempferol.

Mezi flavanony se řadí hesperidin a naringin, které se nacházejí se především v citrusech.

Luteolin a apigenin jsou flavonoidy spadající do skupiny flavonů. Jsou součástí obilovin a některých bylin např. rozmarýnu nebo tymiánu [5].

Isoflavony se vyskytují v luštěninách, především v sójových bobech, černých fazolích a cizrně.

Anthokyanidiny jsou bohatě zastoupeny v lesním ovoci a červeném vínu. Patří sem malvidin a kyanidin [1].

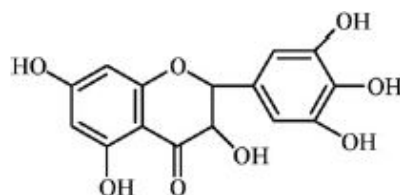
1.1.2 Metabolismus flavonoidů

Metabolismus flavonoidů je složitý a zatím nebyl zcela objasněn. Po požití ovoce nebo zeleniny, ve kterých se flavonoidy vyskytují v glykosidické nebo konjugované formě, se předpokládá, že se nejprve metabolizují mikroflórou ve střevě, kde jsou štěpeny na flavonoidy (aglykony) a glykosidy [7]. Druhým důležitým místem metabolismu flavonoidů jsou játra, tkáň bohatá na enzymy I. a II. fáze biotransformace. Flavonoidy jsou postupně hydroxylovány a/nebo O-demetylovány cytochromy P450 a potom podrobeny konjugačním reakcím ve II. fázi biotransformace [7].

1.1.3 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (dHMR), nebo též ampelopsin viz Obr. 3, je látkou vyskytující se v rostlinách *Hovenia dulcis* (Dužistopka sladká) a *Ampelopsis grossedentata*. Výzkumy prokázaly, že spolu s myricetinem jsou dvěma hlavními flavonoidy obsaženými v ratanovém čaji, který se vyrábí ze stonků a lístků *Ampelopsis grossedentata* a je hojně využíván v čínské medicíně [8]. Dihydromyricetin náleží do velké skupiny flavonoidů (flavanolů), o které je stále větší zájem díky jejich širokému spektru biologických účinků, jakými jsou např. protizánětlivé, imunostimulační a antibakteriální působení [8]. Navíc mají silné antioxidační účinky, proto jsou navrhovány jako agens působící v různých stadiích karcinogeneze. Dále jsou této látce přisuzovány i hepatoprotektivní účinky, které byly pozorovány u hlodavců [2].

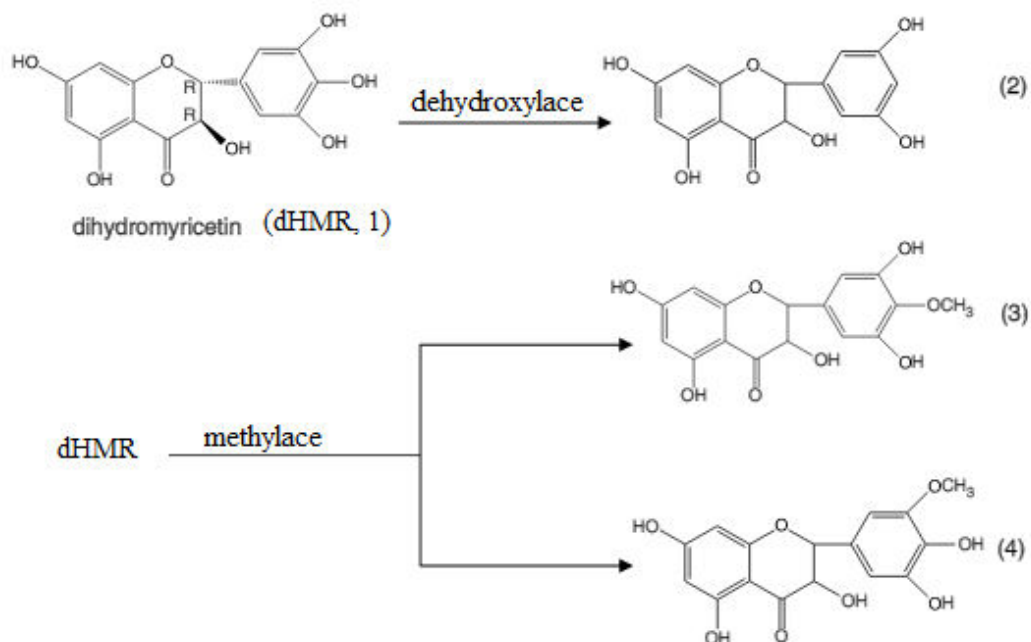
Dihydromyricetin bývá navrhován jako „lék“ na zmírnění příznaků kocoviny a také při akutní intoxikaci ethanolem. Dihydromyricetin zvyšuje aktivitu alkoholdehydrogenasy a acetaldehyddehydrogenasy, nicméně aktivní složky odpovědné za zvýšení aktivity nebyly zatím prozkoumány, stejně jako jeho metabolismus. Dále může působit v mozku, a to na receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA), na které se váže, a brání tak vazbě alkoholu na tyto receptory. Receptory GABA_A jsou obzvláště citlivé na ethanol [9].

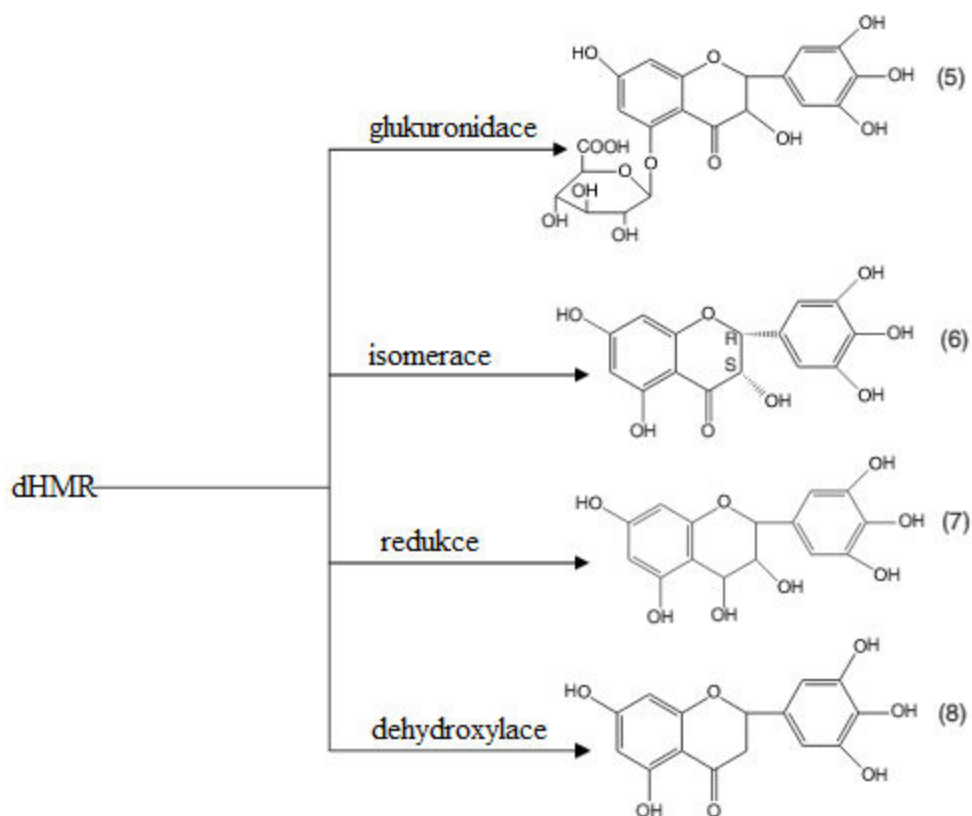


Obr. 3: Struktura dihydromyricetinu. Převzato z [8].

Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.1.2 (strana 12), metabolismus dihydromyricetinu nebyl zatím zcela prozkoumán. Studie ovšem prokázaly přítomnost některých metabolitů u potkanů, kterým byl perorálně podán dHMR. Metodou HPLC bylo identifikováno 7 metabolitů dHMR viz Obr. 4 (strana 14). Metabolity 2-5 byly detekovány v moči potkanů a 6-8 byly získány ze vzorků stolice. Nalezené metabolity byly charakterizovány metodami NMR, MS a následně pojmenovány:

- (2) 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanol,
- (3) 5,7,3',5'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavanol,
- (4) 5,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavanol,
- (5) dHMR-O-5- β -glukuronid,
- (6) (2R,3S)-5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanol,
- (7) 3,4,5,7,3',4',5'-heptyhydroxyflavan,
- (8) 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanon [10].





Obr. 4: Metabolity, které vykazovali potkani po perorálním podání dihydromyricetinu. Převzato a upraveno z [10].

1.2 Biotransformace xenobiotik

Všechny organismy jsou vystaveny působení chemických látek z okolí. Do těla se tyto látky dostávají gastrointestinálním traktem, dýchacím ústrojím a pokožkou. Může se jednat o látky prospěšné, které mohou být dále využity jako zdroj energie, nebo o látky tělu nevlastní, cizorodé, které jsou označovány jako xenobiotika. Zdrojem cizorodých látek mohou být produkty chemického průmyslu nebo zemědělství. Takové látky bývají toxické, někdy i karcinogenní, proto je důležité je z těla vylučovat [11].

Odstranění xenobiotik závisí na jejich metabolismu neboli biotransformaci. Pod pojmem biotransformace se skrývají procesy, které by měly vést ke snadnému vyloučení xenobiotika z organismu [11]. Osud xenobiotika v organismu je závislý na dávce, době působení a jeho fyzikálně-chemických vlastnostech, ke kterým se řadí například rozpustnost ve vodě a tucích, těkavost a reaktivita [12].

Biotransformace se dělí na dvě hlavní fáze. I. fáze biotransformace je označována jako derivatizační, II. fáze jako konjugační. V první fázi dochází ke zvýšení polaritý molekul, které mohou být dále v druhé fázi konjugovány s endogenními látkami (kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, cystein a další) a následně vyloučeny ven z organismu [13].

1.2.1 První fáze biotransformace

Důležitým enzymovým systémem katalyzující reakce I. fáze biotransformace je systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) [14], obsahující cytochrom P450 (více v kapitole 1.3). MFO má tři základní složky, flavoproteinový enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasu (dělič elektronového páru), hemthiolátový enzym cytochrom P450 a fakultativně může tento systém obsahovat cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasu [13].

Jak již bylo řečeno výše, v první fázi dochází ke zvýšení polaritý molekul xenobiotik, což se děje různými chemickými pochody: oxidací postranního řetězce, hydroxylací aromátů, deaminací, tvorbou epoxidů, sulfooxidací, *N*-hydroxylací, redukcí nebo hydrolytickými reakcemi. Tyto reakce modifikují molekulu xenobiotika tak, aby byla schopna konjugace, tedy II. fáze biotransformace [12].

1.2.2 Druhá fáze biotransformace

V této fázi biotransformace jsou na funkční skupiny vytvořené v první fázi vázány malé hydrofilní molekuly. Dojde ke zvýšení polaritý a tím se usnadní vyloučení metabolitů z organismu. Vyloučení xenobiotika z organismu nejčastěji probíhá močí a žlučí [13], případně potem nebo vydechovaným vzduchem [12]. Metabolity vzniklé těmito reakcemi jsou přítomné v krvi a séru, to je důvod, proč byla nejprve objasněna druhá fáze biotransformace [12].

Sloučenina, která vstupuje do této fáze, musí mít ve své molekule skupinu, která bude vhodná pro reakci s konjugačním činidlem. Tato skupina je již v molekule xenobiotika obsažena nebo se vytvoří v první fázi biotransformace [12]. Mezi reakce druhé fáze biotransformace řadíme reakce s kyselinou glukuronovou, methylace, acetylace nebo reakce s glutathionem [15].

Enzymy katalyzující tyto reakce jsou sulfotransferasy, acetyltransferasy, UDP-glukuronosyltransferasy [15].

1.3 Cytochromy P450

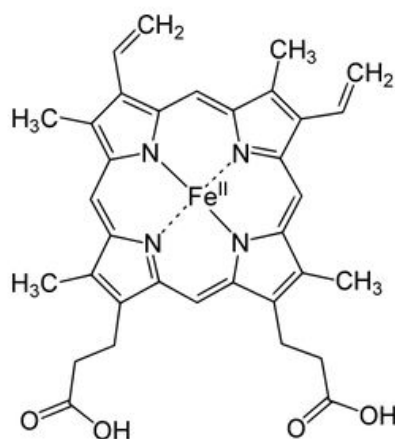
Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, které byly nalezeny v rostlinách, tkáních savců, bakteriích a plísních [12]. Z evolučního hlediska je považován za hemoprotein, který se objevil dříve než například hemoglobin. V organismu, vedle již zmíněné biotransformace, plní i další funkce. Uplatňují se v biosyntéze barviv květů, mastných kyselin, kyseliny skořicové, steroidních hormonů i vitamínu D [13].

V lidském těle se vyskytují především v játrech, dále v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách. V buňkách jsou lokalizovány hlavně v membránách endoplazmatického retikula a taktéž v membránách mitochondrií [13].

Název těchto hemoproteinů je odvozen od skutečnosti, že redukovaná forma cytochromu v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje absorpční maximum při 450 nm a „P“ je označení pro pigment. Tato forma byla poprvé objevena v jaterních mikrozomech potkanů. [15].

1.3.1 Struktura cytochromů P450

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, jejichž strukturní základ je tvořen hemem b viz Obr. 5. Hem b je tvořen protoporphyrinem IX, ke kterému je vázán přes 4 atomy dusíku atom železa [16].



Obr. 5: Struktura hemu b. Převzato z [17].

Protoporfyrin IX je částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, která je přítomna v aktivním centru jako pátý ligand železa [18]. Toto uspořádání je důsledkem výjimečného chování cytochromů P450, kterým jsou odlišné spektrální a katalytické vlastnosti. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody [13,19].

1.3.2 Klasifikace cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých isoenzýmech a isoformách [18], jsou uspořádány do rodin a podrodin na základě procentuálního podílu aminokyselinové sekvence [20]. Pro zjednodušení bylo navrženo systematické názvosloví, ve kterém se cytochromy P450 označují jako CYP.

Enzymy, které se shodují ve 40 % aminokyselinové sekvence a více, spadají do stejné rodiny a jsou označeny arabskou číslicí. Jestliže se enzymy shodují minimálně v 55 % aminokyselinové sekvence, náleží do stejné podrodiny, která je označena písmenem [20]. Jednotlivé isoenzymy jsou označeny číslem za písmenem podrodiny. Například cytochrom P450 1A2 je členem podrodiny A náležející do enzymové rodiny 1 a jeho zkratka je CYP1A2 [18].

V současnosti bylo již popsáno na 500 isoenzymů P450, které spadají do 74 rodin a 14 z nich jsou rodiny savčích cytochromů P450 [18].

1.3.3 Reakční cyklus cytochromů P450

Cytochrom P450 je součástí monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) [11], působí spolu s dalším enzymem umístěným v membráně endoplazmatického retikula NADPH:cytochrom P450 reduktasou (je rovněž součástí MFO), nebo s dalšími enzymy mitochondrií [19].

Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit následující rovnicí [11]:



Reakční cyklus probíhá jasným mechanismem a skládá se z alespoň osmi kroků, jak znázorňuje Obr. 6 (strana 19) a níže jsou popsány jednotlivé části.

V klidovém stavu je ion hemového železa ve ferri formě (s oxidačním číslem III) a je hexakoordinován, tedy v nízkospinovém stavu. Šestáým ligandem je kyslík molekuly vody nebo interní aminokyselinový ligand. Po vazbě substrátu do aktivního centra dochází k vytlačení šestého ligandu železa, které zůstane v pentakoordinované formě, ve vysokospinovém stavu. Zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu, což se projeví změnou spektrálních vlastností.

Předchozí reakce umožní jedoelektronovou redukci cytochromu P450, a to interakcí s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, čímž se železo dostává do ferro formy (s oxidačním číslem II) a dále zůstává ve vysokospinovém stavu. Molekulární kyslík a jiné ligandy jsou vázány touto formou enzymu.

Navázáním molekulárního kyslíku se tvoří ternární ferrisuperoxidový komplex, který je v nízkospinové formě. Ion železa je hexakoordinován.

Tento komplex je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b_5 reduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion.

Pokud je druhý elektron doručen pomalu, dojde k rozpadu komplexu. Uvolněný superoxidový anionradikál je enzymem superoxidodismutasou přeměněn na molekulu peroxidu vodíku. Komplex CYP s biatomickou molekulou kyslíku je zcela aktivovanou formou CYP, ve které dochází ke štěpení vazby O-O, kde jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a uvolňuje se voda. Druhý atom kyslíku zůstává navázán na hemové železo a vzniká tak ferrioxenový komplex, který je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík.

Tento reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu, který je vázán na železo hemu [11,18,19].

na epoxidové intermediáty, které jsou dále převedeny na reaktivnější formy [23]. Polycyklické aromatické uhlovodíky slouží jako ligandy receptoru pro aromatické uhlovodíky (AhR) a pomocí tohoto receptoru je regulována transkripce cytochromů P450 rodiny 1.

1.4 Receptor pro aromatické uhlovodíky

Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR) je členem „helix-loop-helix“/PAS „Per-Arnt-Sim“ rodiny proteinů a řídí expresi různorodých souborů genů [24,25]. Tento receptor byl poprvé identifikován v myších játrech v komplexu s TCDD (2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin), což je vysoce toxická látka a vzniká při spalování organického materiálu včetně komunálního odpadu [24].

Xenobiotika, jako je například TCDD a benzo[a]pyren, jsou typickým ligandy vázající se na AhR. Ve spojení s těmito ligandy AhR reguluje transkripční proces CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1, které se podílejí na aktivaci prokarcinogenů [21].

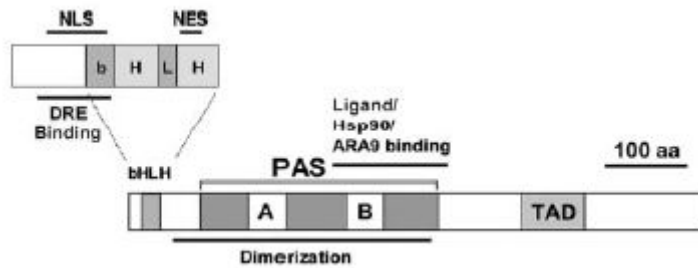
1.4.1 Struktura receptoru

AhR se vyskytuje v cytoplasmě v komplexu s molekulovými chaperony. Samotná struktura AhR je tvořena ze dvou molekul HSP90 (protein tepelného šoku o molekulové hmotnosti 90 kDa) a zřejmě ještě jednoho proteinu o molekulové hmotnosti 43 kDa. HSP90 je část, která váže ligandy. Struktura AhR je zobrazena na Obr. 7 (strana 21) [26].

AhR a Arnt jsou si ve 20 % aminokyselinové sekvence podobné, na N-konci mají bHLH doménu [26]. bHLH doména je zodpovědná za vazbu k DNA. Její součástí je sekvence NLS („nuclear localization signal“) a NES („nuclear export signal“), podílejí se na vstupu AhR do jádra [27].

PAS doména je část, která obsahuje zhruba 300 aminokyselin. Dělí se na dva úseky, označované jako PAS A a PAS B, přičemž každý obsahuje přibližně 50 aminokyselin [26]. Pojmenování PAS vzniklo od rodiny proteinů (Per-Arnt-Sim) [25], kde Per značí „Drosophila Period“ protein a Sim „Drosophila Single-minded“ protein. Tato doména zodpovídá za dimerizaci.

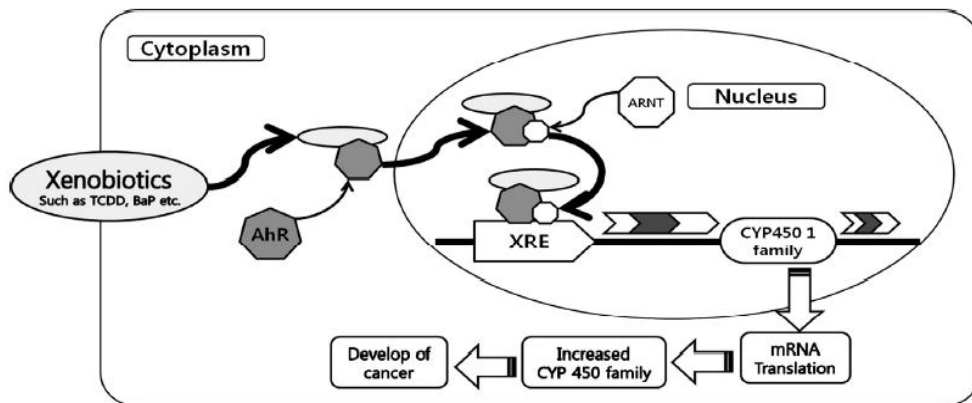
Poslední částí je úsek zvaný TAD („transactivation domain“), který je zodpovědný za transkripci [28].



Obr. 7: Struktura AhR. Převzato z [28].

1.4.2 Signalizační dráha

Signalizační dráha zprostředkovaná AhR je vícestupňovým přenosem, jak znázorňuje Obr. 8. Ligand, vázaný k AhR, se přemístí z cytoplazmy do jádra a vytváří dimerový komplex aktivovaný skrze Arnt (jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků). Tento heterodimer se váže na XRE („xenobiotic response element“, někdy také označován jako DRE („dioxin responsive element“), konkrétní místo DNA, a tak ovlivňuje genovou expresi [21].



Obr. 8: Schéma signalizační dráhy AhR. Převzato z [28].

Existují dva isoenzymy cytochromu b_5 , první z nich je částečně rozpustná forma a druhý isoenzym pochází z vnější membrány mitochondrií [29].

Cytochrom b_5 funguje jako elektronový přenašeč v oxidačně-redukčních reakcích. Cytochrom b_5 může přijmout elektron z NADH-cytochrom b_5 reduktasy nebo NADPH-cytochrom P450 reduktasy, který následně přenáší na řadu akceptorů např. cytochrom c, cytochrom P450, metmyoglobin, methemoglobin [29,32].

Cytochrom b_5 je fakultativně součástí systému MFO [13]. Jeho funkce v rámci toho systému není doposud zcela objasněna, existuje ovšem několik návrhů, které se mechanismus v rámci MFO systému snaží vysvětlit [29].

První návrh říká, že elektron je přenesen přímo z cytochromu b_5 od NADH na cytochrom P450. Limitujícím faktorem se zdá být pomalejší tok druhého potřebného elektronu z cytochromu b_5 v systému MFO.

Druhý návrh předpokládá, že se cytochrom b_5 podílí na rozpojení komplexu cytochromu P450 a superoxidového radikálu. Reakce MFO vede ke vzniku peroxidu vodíku a produktu. Při zapojení cytochromu b_5 byla prokázána zvýšená tvorba produktu na úkor peroxidu vodíku. Předpokládá se, že role cytochromu b_5 je poskytnout druhý elektron rychleji než se uvolní superoxidový radikál a umožňuje tak tvořit více produktu.

Třetí možnost navrhuje tvorbu komplexu mezi cytochromem P450 a cytochromem b_5 , tato reakce reaguje na velikost iontové síly. Dle této hypotézy stimulace cytochromem b_5 je výsledkem schopnosti komplexu přijmout dva elektrony v jedné reakci. Chybějící cytochrom b_5 vede k disociaci reduktázy, interakci s kyslíkem a vazbě druhého elektronu.

V posledních několika letech bylo navrženo, že cytochrom b_5 funguje jako efektor v monooxygenasové reakci bez oxidačně-redukční schopnosti [29].

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je určit vliv dihydromyricetinu na genovou expresi CYP1A1, CYP1A2 a cytochromu b₅ v játrech, ledvinách, plicích, tenkém a tlustém střevě laboratorních potkanů.

K dosažení cíle je třeba splnit následující:

1. Izolovat celkovou RNA z orgánů potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných dihydromyricetinem
2. Převést izolovanou RNA na cDNA metodou reverzní transkripce
3. Kvantifikovat původní obsah mRNA genů CYP1A1, CYP1A2 a cytochromu b₅ v játrech, ledvinách, plicích, tenkém a tlustém střevě potkanů premedikovaných dihydromyricetinem relativně vůči referenčnímu genu β -aktinu metodou „real-time“ PCR
4. Porovnat získané výsledky se stanovením relativního množství mRNA pro CYP1A1, CYP1A2 a cytochrom b₅ v uvedených orgánech potkanů kontrolních - nepremedikovaných dihydromyricetinem

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

<i>Ambion</i>	Nuclease free H ₂ O
<i>Applied Biosystems</i>	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit TaqMan Gene Expression Master Mix TaqMan Gene Expression Assay <ul style="list-style-type: none">• β-aktin (Rn00667869_ml)• CYP1A1 (Rn00487218_ml)• CYP1A2 (Rn00561082_ml)• cytochrom b₅ (Rn01399719_ml)
<i>Bio Basic Inc.</i>	TRIS, kyselina boritá, EDTA
<i>Fermentas</i>	Lambda DNA/EcoRI + HindIII (SM0191)
<i>Geneaid</i>	GENEzol TM Reagent
<i>Invitrogen</i>	Agarosa, SyberGreen II
<i>Lach-Ner</i>	Isopropanol, ethanol
<i>Linde</i>	Suchý led, tekutý dusík
<i>New England BioLabs</i>	Gel Loading Dye, Blue (6x)
<i>Penta</i>	Chloroform

3.2 Použité přístroje

<i>Labox</i>	Flow-box
<i>Eppendorf</i>	Centrifuga (Centrifuge 5415R)
<i>Labnet</i>	Mikrocentrifuga
<i>VELP</i>	Vortex (Scientifica Rx ³)
<i>Helios α</i>	Spektrofotometr
<i>Techne</i>	Cykler (Techgene)
<i>Corbett Research</i>	Real-time cykler (RotorGene 2000)
<i>Biosan</i>	Třepačka (Mini Rocker MR-1)
<i>Dark Reader</i>	Transluminátor
<i>Canon</i>	Fotoaparát (PowerShot G16)
<i>Bio-Rad</i>	Zdroj napětí (Electrophoresis Power Supply-EPS 301)

3.3 Metody

3.3.1 Premedikace potkanů

Laboratorní potkani (samci, kmen Wistar) o hmotnosti 150 - 200 g byli drženi při teplotě 22 ± 2 °C a granulovaná strava a voda jim byla podávána *ad libitum*. Po týdenní aklimatizaci byla zahájena premedikace. Potkanům byl jednorázově perorálně gaváží do žaludku podán dihydromyricetin v dávce 60 mg/kg potkana. Kontrolním potkanům byl podán pouze nosič - slunečnicový olej. Den před usmrcením byla potkanům odebrána strava. Po usmrcení byly potkanům odebrány plíce, ledviny a tlusté střevo.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat (č. 419/2012 Sb.) v prostoru Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK (U nemocnice 478/5, Praha 2).

3.3.2 Izolace RNA

Pro izolaci RNA bylo využito komerčně dostupné činidlo „GENEzol™ Reagent“. Hlavními složkami činidla jsou fenol, chloroform a guanidin isothiokyanát. Toto činidlo je určeno pro extrakci RNA, DNA a proteinů z různých vzorků, např. krve, plasmy, séra, kultivovaných buněk a tkáně [33].

Izolace probíhá v několika krocích. Nejprve je provedena homogenizace tkáně a inkubace v „GENEzol™ Reagent“, následuje separace fází pomocí chloroformu a centrifugace. Vznikají 3 fáze – spodní, organická fáze, obsahující DNA a proteiny, uprostřed se nachází mezifáze a vrchní, vodná fáze obsahující RNA [33]. Pro další postup je odebrána vrchní, vodná fáze. RNA je následně vysrážena isopropanolem a sediment oddělen centrifugací. V dalším kroku je RNA promyta 70% ethanolem (v/v) a resuspendována v „RNase free“ resp. „nuclease free“ H₂O (jedná se o komerčně dodávanou sterilní vodu bez obsahu nukleas, dále je tato voda označena jako „RNase free“ voda).

Veškeré pomůcky byly před použitím ošetřeny 10% H₂O₂ (v/v) a následně sterilizovány při teplotě 180° C po dobu 6 hodin. Po celou dobu izolace bylo pracováno ve flow-boxu (Labox), který byl před použitím spolu s pomůckami vysvícen po dobu 20 minut UV zářením. Vždy bylo pracováno v laboratorním plášti a v rukavicích bez pudru. Automatické pipety (Eppendorf) byly vyhrazeny pouze pro práci s RNA.

Nejprve bylo připraveno patřičné množství mikrozkušavek, do kterých bylo pipetováno vždy 1 ml „GENEzol™ Reagentu“. Orgány byly homogenizovány ve skupinách (vždy ze tří zvířat) pro každý orgán (plíce, ledviny, tlusté střevo) ve třecí misce s tloučkem, kam byl dle potřeby přidáván tekutý dusík (Linde). Poté byl homogenát směsi orgánů přenesen a rozdělen do připravených mikrozkušavek pomocí špachtle. Do každé mikrozkušavky bylo přeneseno množství v rozmezí – 50-100 mg tkáně (na 1ml GENEzol™ Reagentu přísluší právě takové množství) [33]. Vzorky byly promíchány na vortexu (VELP) a následně postaveny dnem vzhůru a ponechány inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po inkubaci bylo do každé mikrozkušavky přidáno 200 µl chloroformu (Penta). Všechny vzorky byly promíchány po dobu 15 sekund a poté inkubovány při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Následovala centrifugace vzorků (12 000 x g) při 4° C a po dobu 15 minut (centrifuga Eppendorf). Do nových

mikrozkumavek byla odebrána vodná fáze po 80 μ l. Ke každému vzorku vodné fáze byl přidán isopropanol tak, aby se objem přidaného isopropanolu rovnal objemu vodné fáze. Vzorky byly promíchány opatrným překlápěním. Následně byly ponechány inkubovat při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Po inkubaci byly centrifugovány (12 000 x g) při 4° C po dobu 15 minut. Vzniklý supernatant byl ze vzorků slit a ke každé peletě bylo přidáno 750 μ l 75% ethanolu (v/v v „RNase free“ vodě). Po dobu 10 sekund byly vzorky míchány na vortexu a následně centrifugovány při 12 000 x g při 4° C po dobu 5 minut. Po této době byl ze vzorků opatrně slit supernatant a zbylý ethanol byl odpařen za pokojové teploty ve flow-boxu. Vzorky byly ředěny 40 μ l „RNase free“ H₂O, následně promíchány na vortexu a inkubovány při 60° C po dobu 15 minut. Po inkubaci byly vzorky pipetovány na aliquoty a uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -80° C.

3.3.3 Horizontální agarosová elektroforéza

Agarosová elektroforéza je metoda, která je využívána především v biochemii a molekulární biologii k separaci biomolekul, v této bakalářské práci se jednalo o RNA. Agarosa během tuhnutí vytváří struktury s kanály a póry, kterými jsou biomolekuly schopny procházet. Struktura je propojena vodíkovými můstky, při zahřátí gel snadno taje kvůli nízké teplotě tání. Fosfátové zbytky na nukleotidech udělají molekule RNA záporný náboj, a její fragmenty se tudíž v elektrickém poli pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě – anodě. Migrace může být ovlivněna několika faktory např. velikostí pórů, koncentrací gelu, velikostí použitého napětí či iontovou silou použitého pufru. K vyhodnocení a vizualizaci elektroforézy se používají barvy, které jsou viditelné pod UV zářením [34]. V této bakalářské práci bylo použito barvivo SyberGreen II, které vyžaduje použití modrého světla transluminátoru.

Skleněné pomůcky byly před použitím sterilizovány při 180° C po dobu 6 hodin. Při práci byly použity rukavice bez pudru. Pro přípravu gelu byl využit 5× TBE, který byl zředěn 10×.

Složení 5× TBE (pH 8-8,3):

- 445mM TRIS
- 445mM kyselina boritá
- 10mM EDTA

Využita byla 1% agarosa (w/v), pro objem 40 ml bylo na předvážkách naváženo 0,40 g agarosy. Navážka byla kvantitativně přenesena do předem kalibrované Erlenmayerovy baňky, poté byla baňka doplněna po rysku 0,5× TBE pufrům. Baňka se směsí byla zahřívána v mikrovlnné troubě tak dlouho, dokud nedošlo k rozpuštění agarosy. Následně byla baňka zchlazena pod proudem tekoucí vody a její obsah byl vlit do aparatury na gel, kam byly umístěny 2 hřebeny. Tuhnutí probíhalo 30 minut.

Každý vzorek na elektroforézu obsahoval 4 µl RNA, 1 µl „RNase free“ vody a 1 µl vzorkového pufru „6× Loading dye“. Dále byl použit marker o složení: 1 µl λ EcoRI + HinDIII, 4 µl H₂O a 1 µl „6× Loading dye“, který byl připraven zahřátím na 65° C a poté chlazením 3 minuty na ledu.

Z gelu byly po ztuhnutí vyjmuty hřebeny, gel byl vložen do aparatury na elektroforézu a převrstven elektrodovým pufrům (0,5× TBE). Po nanesení markerů a vzorků byla aparatura zakryta víkem a připojena ke zdroji napětí (Electrophoresis Power Supply-EPS 301). Elektroforéza probíhala zhruba po dobu 50 minut při 110 V.

Vizualizace gelu byla provedena barvou SyberGreen II v ředění 10 000x v 1× TBE pufru (50 ml). Gel byl inkubován v plastové misce s připravenou barvou. Miska byla zakryta alobalem a vložena na třepačku (Biosan) do chladicího boxu po dobu 50 minut. Vyvolání gelu bylo provedeno v temné místnosti za použití transluminátoru (Dark Reader), následně byl gel vyfotografován.

3.3.4 Stanovení čistoty a koncentrace RNA

Ke stanovení čistoty a koncentrace RNA bylo proměřeno absorpční spektrum v rozmezí 230-330 nm, odečteny byly pouze hodnoty A₂₆₀, A₂₈₀, A₃₂₀. Při 260 nm absorbují nukleové kyseliny, při 280 nm proteiny a při 320 nm pozadí. Dle následujících vzorců byla určena čistota a koncentrace RNA.

Vzorec pro stanovení čistoty:

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}} \quad (2)$$

Vzorec pro stanovení koncentrace:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \times 40 \times \text{ředění} / [\mu\text{g}/\mu\text{l}] \quad (3)$$

Čistota RNA se pohybuje v rozmezí 1,8 -2,0, minimálně však 1,7. Nižší hodnoty mohou být příčinou kontaminace vzorku proteiny z organické fáze [35].

Pro stanovení čistoty a koncentrace byla RNA 80x naředěna, bylo použito 5 μl RNA + 395 μl sterilní deionizované vody. K měření spektra v uvedeném rozsahu byl použit spektrofotometr *Helios α* s křemennou kvetou.

3.3.5 Přepis RNA do cDNA

Syntéza DNA z RNA probíhá pomocí reverzní transkripce, produktem je komplementární DNA (cDNA). Krátký primer, směs náhodných hexanukleotidů, nasedá na RNA a reverzní transkriptasa syntetizuje nové vlákno cDNA. Toto vlákno slouží jako šablona pro polymerasovou řetězovou reakci [36].

Celá práce byla prováděna ve flow-boxu za použití rukavic bez pudru. Všechny pomůcky byly ošetřeny 10% H_2O_2 (v/v) a byly vysvíceny UV zářením ve flow-boxu po dobu 15 minut. Veškeré vzorky byly naředěny do celkového objemu 10 μl tak, aby v každém vzorku byl obsažen 1 μg RNA. K ředění byla použita „RNase free“ voda. Po naředění byly vzorky promíchány lehkým poklepem, centrifugovány na mikrocentrifuze a ponechány na ledu. Dále byl připraven roztok „MIXu“, který pro každý vzorek obsahoval:

- 2 μl 10 \times RT pufr
- 0,8 μl 25 \times dNTP Mix (100mM)
- 2 μl 10 \times „RT Random Primers“
- 1 μl „RNase“ Inhibitor
- 3,2 μl „RNase free“ H_2O

„MIX“ byl přidán ke každému vzorku, poté byly vzorky opět lehce promíchány poklepem, centrifugovány a umístěny na led. Ze všech vzorků byly odebrány 2 μl jako

negativní kontrola. Do vzorků, kromě negativních kontrol, byl přidán 1 μ l reversní transkriptasy. Vzorky byly poklepem promíchány, centrifugovány na mikrocentrifuze, umístěny na led a následně přeneseny do cykleru s následujícím teplotním programem:

- 10 minut při 25° C
- 120 minut při 37° C
- minut při 85° C

a následné zchlazení na 4° C.

Po dokončení byly vzorky uchovány v mrazicím boxu při teplotě -80° C.

3.3.6 Polymerasová řetězová reakce v reálném čase

Polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) se stala velmi využívanou metodou v mnoha oblastech biologického výzkumu, které analyzují genovou expresi. Díky velkému rozsahu, obrovské citlivosti a specifičnosti je poměrně spolehlivou metodou [37]. Kromě toho je RT-PCR metodou rychlou, snadnou a vysoce reprodukovatelnou, jelikož vyžaduje minimální množství RNA [38].

RT-PCR je metoda, která sleduje detekci a kvantifikaci (amplifikaci) nukleových kyselin zároveň [39].

RT-PCR využívá 5'-3' exonukleasovou aktivitu DNA polymerasy a fluorescenční sondu TaqMan. Každá sonda je navržena tak, aby specificky hybridizovala k nukleovým kyselinám ve vzorku a je označena fluorescenčním barvivem na 5' konci a zhášecím barvivem na 3' konci [40]. V průběhu amplifikace je sonda rozštěpena na základě 5'-3' exonukleasové aktivity DNA polymerasy. Díky tomu dojde k oddělení barviva, což vede ke zvýšení fluorescence [41]. Fragmenty sondy jsou pak posunuty od cíle a polymerace řetězce pokračuje. Tento proces probíhá v každém cyklu. Zvýšení fluorescenčního signálu je detekováno pouze v případě, že cílová sekvence je komplementární k sondě [40].

Reakce se vyznačují bodem v čase, kde je nejprve zjištěna cílová amplifikace. Daná hodnota je označována jako práh cyklu (cycle threshold, C_t), v době, kdy intenzita fluorescence převyšuje intenzitu fluorescence pozadí. Čím větší množství cDNA

ve výchozím materiálu, tím rychleji se objeví zvýšení fluorescenčního signálu, čímž se získá nižší hodnota C_t [42].

Vyhodnocení výsledků získaných metodou RT-PCR může probíhat dvěma způsoby, metodou relativní nebo absolutní kvantifikace. Relativní kvantifikace porovnává sledovaný cíl vůči standardu a může probíhat buď metodou „standardní křivky“, nebo srovnáváním C_t . Absolutní kvantifikace odečítá hodnoty C_t z kalibrační křivky [40].

Pro zjištění míry genové exprese byla v této bakalářské práci použita metoda relativní kvantifikace a jako srovnávací gen byl využit β -aktin.

Celá práce byla prováděna za použití rukavic bez pudru. Pro každé měření RT-PCR byl vzorek cDNA ředěn buď $10\times$ nebo $5\times$. Po naředění byly vzorky jemným poklepem promíchány, centrifugovány na mikrocentrifuze a umístěny na led. Nejprve byl do připravených mikrozkušavek pipetován roztok „MIXU“, do každé mikrozkušavky $15\mu\text{l}$.

„MIX“ pro každý vzorek obsahoval:

- $10\mu\text{l}$ TaqMan® Gene Expression Master Mix
- μl „RNase free“ H_2O
- $1\mu\text{l}$ TaqMan® Gene Expression Assay

K $15\mu\text{l}$ roztoku „MIXu“ bylo přidáno $5\mu\text{l}$ ředěné cDNA. Každý vzorek byl stanovován v dubletu. Vzorky byly vloženy do karouselu a případná prázdná místa byla vyplněna prázdnými mikrozkušavkami. Metoda byla provedena za pomoci programu Rotor Gene 5 určující hodnoty C_t . Podmínky RT-PCR byly nastaveny následovně:

- 2 minuty při 50°C
- 10 minut při 95°C

a dále:

- 15 sekund při 95°C
- 60 sekund při 60°C

v 50 cyklech.

3.3.7 Statistické vyhodnocení „real-time“ polymerasové řetězové reakce

Každý vzorek byl stanovován v dubletu. Nejprve byl proto vypočten průměr C_t všech vzorků pro všechny geny – CYP1A1, CYP1A2 a cytochrom b_5 dvou paralelních měření.

Dále byla určena hodnota ΔC_t , která vyjadřuje expresi daného genu v porovnání s referenčním genem, v tomto případě s β -aktinem. Tato hodnota byla stanovena odečtením průměrné hodnoty C_t referenčního genu od průměrné hodnoty C_t sledovaného genu, jak vystihuje následující vzorec:

$$\Delta C_t = C_t(\text{sledovaný gen}) - C_t(\text{referenční gen}) \quad (4)$$

Výsledné vyjádření míry indukce exprese genů CYP1A1, CYP1A2, cytochromu b_5 ve vzorcích tkání potkanů premedikovaných dHMR oproti potkanům kontrolním, nepremedikovaným, proběhlo dle uvedeného vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\overline{\Delta C_t}(\text{dHMR}) - \overline{\Delta C_t}(\text{kontrola}))} \quad (5)$$

V tabulkách je míra indukce uvedena jako relativní exprese.

Výsledky získané RT-PCR byly vyhodnoceny metodou relativní kvantifikace za použití softwaru pro statistické vyhodnocení relativní genové exprese REST[®]2009.

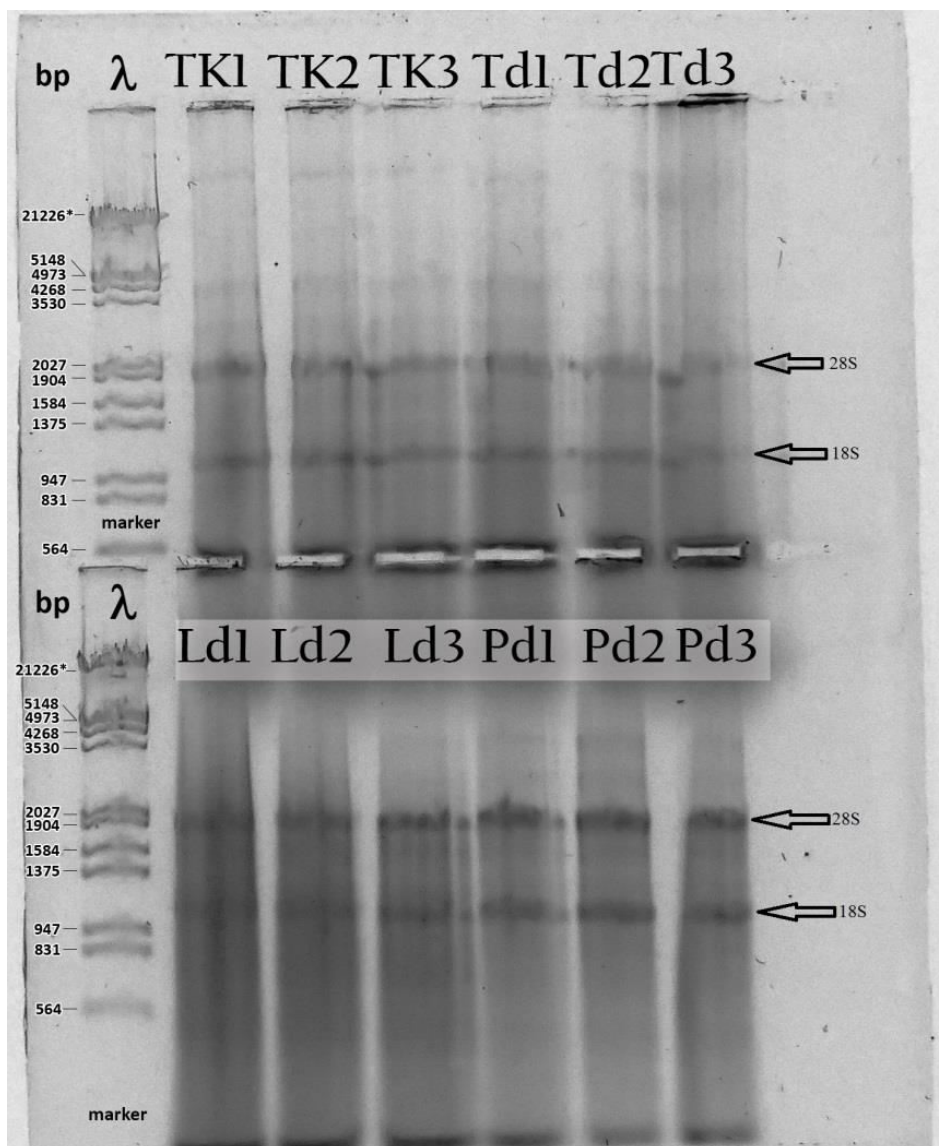
4 Výsledky

Pro stanovení míry genové exprese enzymů CYP 1A1, CYP1A2 a cytochromu b₅ byla v prvním kroku izolována celková RNA z plic, ledvin a tlustého střeva potkanů nepremedikovaných (kontrolních) a potkanů premedikovaných dihydromyricetinem. V dalším kroku byla izolovaná RNA přepsána na cDNA metodou reverzní transkripce za použití náhodných primerů. Kvantifikace a konečná analýza proběhla pomocí metody „real-time“ PCR s komerčními sondami.

4.1 Izolace RNA, stanovení čistoty a koncentrace

Z tkání laboratorních potkanů kontrolních i premedikovaných dihydromyricetinem (ledviny, plíce, tlusté střevo) byla izolována celková RNA. A to v třetí misce pomocí kapalného dusíku a dále pomocí komerčně dostupného činidla GENEzolTM Reagent, viz kapitola 3.3.2 (strana 27).

Pro posouzení integrity izolované RNA byla provedena horizontální agarosová elektroforéza. Na Obr. 10 (strana 35) je uveden výsledek elektroforézy, kde jsou patrné dva charakteristické proužky (28S a 18S), což dokazuje, že nedošlo k nežádoucí degradaci RNA.



Obr. 10: Horizontální agarosová elektroforéza RNA izolované z tkáně tlustého střeva (T), ledvin (L) a plic (P) potkanů premedikovaných dHMR (d) a kontrolních (K).

Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno za účelem zjištění koncentrace a čistoty izolované RNA. Za pomoci vzorců viz kapitola 3.3.4 (strana 29) byla zjištěna jejich hodnota. Výsledné hodnoty koncentrací a míry čistoty jsou spolu s absorbancí při 260, 280 a 320 nm uvedeny v Tab. 1. Čistota RNA by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 -2,0, kde nejnižší hodnota by měla být však 1,7, aby se s preparáty mohlo dále pracovat [35].

Tab. 1: Čistota a koncentrace RNA z jednotlivých tkání potkanů kontrolních i potkanů premedikovaných dihydromyricetinem.

Orgán	Zkratka	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	čistota	c/[μg/μl]
Ledviny	Ld1	1,087	0,570	0,006	1,917	3,459
	Ld2	0,814	0,426	0,002	1,915	2,598
	Ld3	0,592	0,307	0,001	1,931	1,891
Plíce	Pd1	0,309	0,150	0,001	2,067	0,986
	Pd2	0,252	0,116	0,002	2,193	0,800
	Pd3	0,344	0,150	-0,002	2,276	1,107
Tlusté střevo	Tk1	0,476	0,259	0,002	1,844	1,517
	Tk2	0,375	0,205	0,006	1,854	1,181
	Tk3	0,402	0,213	0,008	1,922	1,261
	Td1	0,329	0,174	0,000	1,891	1,053
	Td2	0,544	0,294	0,007	1,871	1,719
	Td3	0,421	0,229	0,006	1,861	1,328

Všechny vzorky byly 80× ředěny.

U zkratk první písmeno značí orgán, druhé označuje RNA potkanů kontrolních (k), nebo potkanů premedikovaných dihydromyricetinem (d).

Ostatní vzorky, se kterými bylo dále pracováno a nejsou uvedené v Tab. 1, byly izolovány Bc. Barbarou Feriančíkovou [43].

4.2 Reverzní transkripce a „real-time“ polymerasová řetězová reakce

Izolovaná RNA byla převedena na cDNA metodou reverzní transkripce za použití „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu“ viz kapitola 3.3.5 (strana 30).

Výchozí množství RNA u všech vzorků bylo 1 μg.

Metodou „real-time“ PCR byla stanovena míra exprese studovaných genů CYP1A1, CYP1A2 a cytochromu b₅ v uvedených orgánech. Stejně bylo postupováno i u β-aktinu, který je exprimován ve stejném množství a byl využit jako srovnávací gen. Výsledná míra exprese byla vyjádřena metodou relativní kvantifikace pomocí programu REST2009 a směrodatné odchylky byly vypočítány v programu Excel. Jednotlivé hodnoty C_t spolu se statistickými údaji jsou uvedeny v následujících tabulkách, a to pro každý gen zvlášť. Všechny vzorky cDNA byly ředěny 10×, u některých vzorků však hodnoty C_t nebyly detekovány a proto bylo přistoupeno k vyšší koncentraci cDNA a ředěny byly pouze 5×.

- Cytochrom P450 1A1

Míra exprese vyjádřená jako ΔC_t pro CYP1A1 je uvedena v Tab. 2 (strana 37) spolu s naměřenými průměrnými hodnotami C_t referenčního genu β -aktinu a CYP1A1. Relativní exprese vyjádřená jako $2^{-\Delta C_t}$ je uvedena v Tab. 3 (strana 38). Bylo zjištěno signifikantní snížení relativní exprese v plicích potkanů 0,26 \times , u ledvin a tlustého střeva nebyla zjištěna signifikantní změna exprese.

Tab. 2: Míra exprese CYP1A1 vyjádřená jako ΔC_t spolu s průměrnými naměřenými hodnotami C_t pro srovnávací gen β -aktin a CYP1A1

Orgán	Zkratka	C_t (β -aktin)	C_t (CYP1A1)	ΔC_t	$\overline{\Delta C_t}$
Plíce	Pk1	17,98	30,02	12,04	11,33
	Pk2	17,60	28,70	11,10	
	Pk3	16,68	27,53	10,85	
	Pd1	14,91	28,25	13,34	13,25
	Pd2	15,63	28,83	13,20	
	Pd3	16,18	29,40	13,22	
Ledviny	Lk1	16,64	23,28	6,64	6,80
	Lk2	16,53	23,69	7,16	
	Lk3	15,67	22,28	6,61	
	Ld1	16,88	23,54	6,66	6,74
	Ld2	16,70	23,38	6,68	
	Ld3	16,73	23,60	6,87	
Tlusté střevo	Tk1	16,63	31,89	15,26	14,89
	Tk2	17,43	32,01	14,58	
	Tk3	17,04	31,86	14,82	
	Td1	16,95	32,96	16,01	15,66
	Td2	17,85	33,16	15,31	
	Td3	17,89	33,54	15,65	

$\Delta C_t \dots C_t$ (CYP1A1) - C_t (β -aktin)

$\overline{\Delta C_t} \dots$ průměrná hodnota ΔC_t vždy pro 3 vzorky

Tab. 3: Vyjádření relativní exprese genu CYP1A1 v uvedených orgánech potkanů premedikovaných dHMR v porovnání s potkany kontrolními spolu se statistickým vyhodnocením

Orgán	$\overline{\Delta C_t}$ (dHMR) ± S.O.	$\overline{\Delta C_t}$ (kontrola) ± S.O.	Relativní exprese	Statistická významnost
Plíce	13,25 ± 0,06	11,33 ± 0,54	0,26	P<0,05 *
Ledviny	6,74 ± 0,45	6,80 ± 0,49	1,05	nesignifikantní
Tlusté střevo	15,66 ± 0,50	14,89 ± 0,32	0,59	nesignifikantní

S.O... směrodatná odchylka

- Cytochrom P450 1A2

Míra exprese vyjádřená jako ΔC_t pro CYP1A2 je uvedena v Tab. 4 spolu s naměřenými průměrnými hodnotami C_t referenčního genu β -aktinu a CYP1A2. Všechny vzorky cDNA byly ředěny 10 \times . U vzorků plic nebyly při ředění 10 \times zaznamenány hodnoty C_t pro CYP1A2, proto byly ředěny 5 \times , a stejně tak i β -aktin. U vzorků jater nebyly započítány první naměřené hodnoty C_t vzorků kontrolních i vzorků potkanů premedikovaných dHMR, jelikož byly příliš odlehlé.

Relativní exprese vyjádřená jako $2^{-\Delta\Delta C_t}$ je uvedena v Tab. 5 (strana 40). Bylo zjištěno signifikantní snížení relativní exprese v plicích potkanů 0,22 \times , v ledvinách naopak signifikantní zvýšení 1,9 \times . U tenkého střeva v proximální části byla zjištěna vysoká míra relativní exprese, a to 17 \times , oproti tomu v části distální byla míra exprese zvýšena 2,4 \times a v části střední (=middle) 1,1 \times , ovšem všechny změny v expresi byly nesignifikantní.

Tab. 4: Míra exprese CYP1A2 vyjádřená jako ΔC_t spolu s průměrnými naměřenými hodnotami C_t pro srovnávací gen β -aktin a CYP1A2

Orgán	Zkratka	C_t (β -aktin)	C_t (CYP1A2)	ΔC_t	$\overline{\Delta C_t}$
Játra	Jk2	18,47	17,73	-0,74	-0,46
	Jk3	18,38	18,20	-0,18	
	Jd2	19,38	19,39	0,01	-0,27
	Jd3	18,69	18,15	-0,55	
Plíce	Pk1	17,46	36,02	18,56	17,96
	Pk2	17,23	34,22	16,99	
	Pk3	15,80	34,13	18,34	
	Pd1	14,87	34,23	19,36	20,18
	Pd2	15,06	35,72	20,66	
	Pd3	15,77	36,28	20,51	

Ledviny	Lk1	16,64	33,14	16,50	16,39
	Lk2	16,53	32,89	16,36	
	Lk3	15,67	31,98	16,31	
	Ld1	16,88	32,11	15,23	15,49
	Ld2	16,70	32,01	15,31	
	Ld3	16,73	32,65	15,92	
Tlusté střevo	Tk1	16,63	34,06	17,43	17,98
	Tk2	17,43	34,66	17,23	
	Tk3	17,04	36,32	19,28	
	Td1	16,95	34,62	17,67	17,33
	Td2	17,85	34,91	17,06	
	Td3	17,89	35,14	17,25	
Tenké střevo proximal	Prk1	15,85	36,78	20,93	19,89
	Prk2	16,57	35,43	18,86	
	Prk3	15,35	35,22	19,88	
	Prd1	21,83	35,07	13,25	15,8
	Prd2	17,08	34,33	17,26	
	Prd3	17,39	34,28	16,89	
Tenké střevo middle	Mik1	14,88	36,63	21,75	20,42
	Mik2	16,46	35,78	19,32	
	Mik3	16,62	36,81	20,19	
	Mid1	16,84	0,00	-	20,30
	Mid2	16,69	37,07	20,38	
	Mid3	14,87	35,08	20,21	
Tenké střevo distal	Dik1	14,78	36,00	21,22	20,24
	Dik2	13,97	0,00	-	
	Dik3	15,97	35,23	19,26	
	Did1	16,76	0,00	-	18,99
	Did2	17,78	36,77	18,99	
	Did3	17,60	0,00	-	

$\Delta C_t \dots C_t$ (CYP1A2) - C_t (β -aktin)

$\overline{\Delta C_t} \dots$ průměrná hodnota ΔC_t

Tab. 5: Vyjádření relativní exprese genu CYP1A2 v uvedených orgánech potkanů premedikovaných dHMR v porovnání s potkany kontrolními spolu se statistickým vyhodnocením

Orgán	$\overline{\Delta C_t}$ (dHMR) ± S.O.	$\overline{\Delta C_t}$ (kontrola) ± S.O.	Relativní exprese	Statistická významnost
Játra	-0,46 ± 0,35	-0,27 ± 0,52	0,88	nesignifikantní
Plíce	20,18 ± 1,34	17,96 ± 0,88	0,22	P<0,05 *
Ledviny	15,49 ± 0,46	16,39 ± 0,64	1,87	P<0,05 *
Tlusté střevo	17,33 ± 0,52	17,98 ± 1,19	1,57	nesignifikantní
Tenké střevo proximal	15,80 ± 1,40	19,89 ± 0,36	17,05	nesignifikantní
Tenké střevo middle	20,30 ± 0,70	20,42 ± 1,21	1,09	nesignifikantní
Tenké střevo distal	18,99	20,24 ± 1,77	2,37	nesignifikantní

S.O... směrodatná odchylka

- Cytochrom b₅

Míra exprese vyjádřená jako ΔC_t pro cytochrom b₅ je uvedena v Tab. 6 spolu s naměřenými průměrnými hodnotami C_t referenčního genu β -aktinu a cytochromu b₅. Všechny vzorky cDNA byly ředěny 10 \times .

Relativní exprese vyjádřená jako $2^{-\Delta\Delta C_t}$ je uvedena v Tab. 7 (strana 43). U vzorků jater byl zjištěn signifikantní nárůst relativní exprese, a to 1,5 \times . U dalších vzorků nedošlo ke změně exprese, pouze ve střední části tenkého střeva došlo k mírnému nesignifikantnímu snížení exprese, a to 0,8 \times oproti kontrole.

Tab. 6: Míra exprese cytochromu b₅ vyjádřená jako ΔC_t spolu s průměrnými naměřenými hodnotami C_t pro srovnávací gen β -aktin a cytochrom b₅

Orgán	Zkratka	$C_t(\beta - \text{aktin})$	$C_t(\text{cytochrom } b_5)$	ΔC_t	$\overline{\Delta C_t}$
Játra	Jk1	18,35	17,89	-0,46	-0,57
	Jk2	18,47	17,71	-0,76	
	Jk3	18,38	17,88	-0,50	
	Jd1	20,38	19,19	-1,19	-1,16
	Jd2	19,38	18,47	-0,91	
	Jd3	18,69	17,32	-1,37	
Plíce	Pk1	17,98	22,68	4,70	5,02
	Pk2	17,60	23,05	5,45	
	Pk3	16,68	21,59	4,91	
	Pd1	14,91	19,97	5,06	4,67
	Pd2	15,63	20,08	4,45	
	Pd3	16,18	20,67	4,49	
Ledviny	Lk1	16,64	18,33	1,69	1,85
	Lk2	16,53	18,18	1,65	
	Lk3	15,67	17,89	2,22	
	Ld1	16,88	18,73	1,85	1,93
	Ld2	16,70	18,62	1,92	
	Ld3	16,73	18,76	2,03	
Tlusté střevo	Tk1	16,63	20,99	4,36	4,06
	Tk2	17,43	21,31	3,88	
	Tk3	17,04	20,99	3,95	
	Td1	16,95	21,12	4,17	3,99
	Td2	17,85	21,81	3,96	
	Td3	17,89	21,73	3,84	
Tenké střevo proximal	Prk1	15,85	21,36	5,51	4,99
	Prk2	16,57	21,28	4,71	
	Prk3	15,35	20,09	4,75	
	Prd1	21,83	25,75	3,93	4,26
	Prd2	17,08	21,49	4,42	
	Prd3	17,39	21,84	4,45	
Tenké střevo middle	Mik1	14,88	19,85	4,98	4,01
	Mik2	16,46	19,82	3,36	
	Mik3	16,62	20,30	3,68	
	Mid1	16,84	21,38	4,54	4,39
	Mid2	16,69	20,79	4,10	
	Mid3	14,87	19,40	4,53	
Tenké střevo distal	Dik1	14,78	18,74	3,96	4,63
	Dik2	13,97	19,73	5,76	
	Dik3	15,97	20,15	4,18	
	Did1	16,76	20,51	3,76	3,99
	Did2	17,78	21,49	3,71	
	Did3	17,60	22,10	4,50	

$\Delta C_t \dots C_t(\text{cytochrom } b_5) - C_t(\beta\text{-aktin})$

$\overline{\Delta C_t} \dots$ průměrná hodnota ΔC_t vždy pro 3 vzorky, příp. pro 2 (plíce)

Tab. 7: Vyjádření relativní exprese genu cytochromu b₅ v uvedených orgánech potkanů premedikovaných dHMR v porovnání s potkany kontrolními spolu se statistickým vyhodnocením

Orgán	$\Delta\Delta C_t$ (dHMR) ± S.O.	$\Delta\Delta C_t$ (kontrola) ± S.O.	Relativní exprese	Statistická významnost
Játra	-1,16 ± 0,28	-0,57 ± 0,17	1,50	P<0,05 *
Plíce	4,67 ± 0,20	5,02 ± 0,36	1,28	nesignifikantní
Ledviny	1,93 ± 0,18	1,85 ± 0,51	0,95	nesignifikantní
Tlusté střevo	3,99 ± 0,29	4,06 ± 0,28	1,05	nesignifikantní
Tenké střevo proximal	4,26 ± 0,32	4,99 ± 2,23	1,65	nesignifikantní
Tenké střevo middle	4,39 ± 0,36	4,01 ± 0,75	0,77	nesignifikantní
Tenké střevo distal	3,99 ± 0,41	4,63 ± 0,92	1,56	nesignifikantní

S.O... směrodatná odchylka

5 Diskuze

Tato bakalářská práce navazuje na dosavadní práce vypracované v laboratořích katedry biochemie, PřF UK, zejména na bakalářskou práci Bc. Barbary Feriančíkové, ve které byl zkoumán vliv dihydromyricetinu na genovou expresi cytochromu P450 1A1 v játrech a tenkém střevě laboratorních potkanů [43]. V již obhájené práci nebyla zjištěna významná změna exprese vlivem dihydromyricetinu v játrech potkanů, stejně tak v distální části tenkého střeva. Ve střední části tenkého střeva byl zjištěn mírný pokles exprese a v distální části naopak nárůst.

Cílem této bakalářské práce je doplnit již získané výsledky genové exprese cytochromu P450 1A1 a rozšířit o nové poznatky exprese genů cytochromu P450 1A2 a cytochromu b₅.

V předkládané bakalářské práci byl studován vliv flavonoidu, dihydromyricetinu (dHMR), na genovou expresi cytochromu P450 1A1, 1A2 a cytochromu b₅ v játrech, ledvinách, plicích, tlustém a tenkém střevě laboratorních potkanů, kde tenké střevo bylo rozděleno na tři části – proximální, střední a distální. Potkanům byl dHMR podán jednorázově perorálně gaváží do žaludku v dávce 60 mg/kg potkana. Byla izolována celková RNA za využití komerčního činidla GENEzolTM Reagent. Metodou reverzní transkripce byly vzorky RNA převedeny na cDNA a vyhodnoceny metodou polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR). Výsledkem bylo, že dHMR výrazně neovlivňuje genovou expresi CYP1A1 v ledvinách a tlustém střevě, naopak u plic bylo zaznamenáno signifikantní snížení relativní genové exprese. U CYP1A2 byl zaznamenán nesignifikantní nárůst exprese v proximální části tenkého střeva dokonce 17×, v tomto případě byly hodnoty získané z RT-PCR velmi vysoké, v této hladině již dochází k vysoké chybě měření, proto je zvýšení považováno za nesignifikantní. Ovšem signifikantní nárůst exprese CYP1A2 byl zaznamenán v ledvinách, naproti tomu v plicích bylo zjištěno signifikantní snížení relativní genové exprese CYP1A2 u potkanů premedikovaných dHMR vůči potkanům kontrolním. V ostatních orgánech nedošlo ke změně exprese sledovaného genu CYP1A2. Signifikantní zvýšení relativní genové exprese cytochromu b₅ bylo zjištěno pouze v plicích premedikovaných potkanů. U ostatních orgánů nedošlo ke změně genové exprese cytochromu b₅.

V porovnání jednotlivých genů v plicích došlo k signifikantnímu snížení exprese CYP1A, CYP1A2 a nedošlo ke změně exprese cytochromu b₅.

V této bakalářské práci byla studována relativní genová exprese (míra indukce) u orgánů laboratorního potkana (viz výše). Jak je uvedeno v článku [7], metabolismus flavonoidů probíhá především v tenkém střevu a játrech, proto byly studovány právě tyto orgány. Pro dokreslení situace změn v míře exprese sledovaných genů v organismu potkana byly použity zbývající orgány.

Cytochromy P450 jsou obecně brány jako enzymy, které se podílejí na detoxikaci xenobiotik, často však vznikají meziprodukty, které mohou působit toxicky. Jednou z možných reakcí cytochromů P450 s flavonoidy je indukce biosyntézy některých CYP. Flavonoidy se mohou vazbou na AhR podílet na indukci CYP, především rodiny 1, což může vést k aktivaci prokarcinogenů. Proto byly studovány CYP1A1/1A2.

Mechanismus působení cytochromu b₅ není doposud prozkoumán, získané výsledky jsou tak o to cennější.

Získané výsledky poukazují na to, že dihydromyricetin nijak významně neovlivňuje expresi sledovaných genů v hlavních orgánech, ve kterých dochází k metabolismu flavonoidních látek. Dihydromyricetin je tedy možno považovat za bezpečný prostředek z hlediska jeho možnosti zapojení do indukce biotransformačních enzymů a následného zvýšení aktivity prokarcinogenů. Zjištění vlivu dihydromyricetinu na enzymy druhé fáze biotransformace a odhalování jeho chování v organismu bude předmětem dalších studií.

6 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla zdárně izolována celková RNA z uvedených orgánů laboratorních potkanů premedikovaných dihydromyricetinem, kterým byl jednorázově perorálně gavaží do žaludku podán dihydromyricetin (60mg/kg potkana) a nepremedikovaných (kontrolních), kterým byl podán slunečnicový olej. Metodou reverzní transkripce byla izolovaná RNA převedena na cDNA pomocí náhodných primerů. Metodou polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) bylo kvantifikováno zastoupení mRNA pro cytochrom P450 1A1, 1A2 a cytochrom b₅ v orgánech premedikovaných potkanů vůči referenčnímu genu β -aktinu, který je exprimován ve stejném množství. Nakonec byly hodnoty porovnány s hodnotami nepremedikovaných potkanů. Na základě tohoto porovnání bylo zjištěno, že nedošlo k významným změnám genové exprese. V rámci CYP1A1 došlo k signifikantnímu snížení exprese v plicích (0,26 \times). U CYP1A2 bylo zaznamenáno taktéž signifikantní snížení (0,22 \times), dále došlo k signifikantnímu zvýšení genové exprese v ledvinách (1,87 \times). Pro cytochrom b₅ bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení exprese v játrech (1,50 \times). V ostatních tkání nedošlo ke změně exprese daných genů.

Seznam použité literatury

- [1] K. Volf, F. Andrs (2013): Flavonoidy a jejich biologické působení <http://www.juwital.cz/Upload/Documents/FLAVONOIDY.pdf> (9.3.2015)
- [2] Z. Hong, L. Peihua, F. Yingying, W. Jincheng, D. Jiabin, S. Jinjin, Y. Xiaochun, CH. Linlin, Q. Weng, Y. Bo, H. Qiaojun (2014): Dihydromyricetin prevents cardiotoxicity and enhances anticancer activity induces by Adriamycin, *Oncotarget*, 6, 5
- [3] A. Kale, S. Gawande, S. Kotwal (2008): Cancer Phytotherapeutics: Role for flavonoids at the cellular level, *Phytotherapy Research*, 22, 567-577
- [4] P. Hodek, P. Fousová, E. Brabencová, M. Moserová, P. Pavěk, E. Anzenbacherová, J. Brotánek, J. Hudeček, E. Frei, M. Stiborová (2014): Effect of dihydromyricetin on benzo[a]pyrene activation in rats, *Neuroendocrinology Letters*, 35, 2
- [5] P.-G. Pietta (2000): Flavonoids as antioxidants, *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042
- [6] <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/9/3367/htm> (21.7.2015)
- [7] P. Hodek, P. Trefil, M. Stiborová (2002): Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chemico-Biological Interactions*, 139, 1-21
- [8] Y.-s. Zhang, Q.-y. Zhang, L.-y. Li, B. Wang, Y.-y. Zhao, D.-a. Guo (2007): Simultaneous determination and pharmacokinetic studies of dihydromyricetin of *Ampelopsis grossedentata* decoction, *Journal of Chromatography B*, 860, 4-9
- [9] Y. Shen, A. K. Lindemeyer, C. Gonzalez, X. M. Shao, I. Spigelman, R. W. Olsen, J. Liang (2012): Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication, *The Journal of Neuroscience*, 32, 390
- [10] Y. Zhang, S. Que, X. Yang, B. Wang, L. Qiao, Y. Zhao (2007): Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45, 909-916

- [11] M. Stiborová, J. Hudeček, J. Páca Jr., V. Martínek, J. Páca (2004): Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chemické Listy*, 98, 876-890
- [12] Z. Knejzlík, J. Káš, T. Ruml (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace, *Chemické Listy*, 94, 913-918
- [13] M. Stiborová: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace
<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>
- [14] M. L. P. S. van Iersel, H. Verhagen, P. J. van Bladeren (1999): The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis, *Mutation Research*, 443, 259-270
- [15] C. J. Omiecinski, J. P. Vanden Heuvel, G. H. Perdew, J. M. Peters (2011): Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities, *Toxicological Sciences*, 120, S49-S75
- [16] J. A. Hasler, R. Estabrook, M. Murray, I. Pikuleva, M. Waterman, J. Capdevila, V. Holla, Ch. Helvig, J. R. Falck, G. Farrell, L. S. Kaminsky, S. D. Spivack, E. Boitier, P. Beaune (1999): Human cytochromes P450, *Molecular Aspects of Medicine*, 20, 1-137
- [17] <https://s3.amazonaws.com/ww-article-cache-1/cs/Porfyriny> (25.7.2015)
- [18] M. Stiborová, J. Hudeček, P. Hodek, E. Frei (1999): Význam cytochromu P450 pro lidské zdraví, *Chemické Listy*, 93, 229-237
- [19] L. Chromá, M. Macková, T. Macek, V. Martínek, M. Stiborová (2001): Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí, *Chemické Listy*, 95, 212-222
- [20] D. W. Nebert, D. W. Russell (2002): Clinical importance of the cytochromes P450, *The Lancet*, 360, 1155-1162
- [21] R.-E. Go, K.-A. Hwang, K.-Ch. Choi (2015): Cytochrome P450 1 family and cancers, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 147, 24-30
- [22] K. Takata, J. Saruwatari, N. Nakada, M. Nakagawa, K. Fukuda, F. Tanaka, S. Takenaka, S. Mihara, T. Marubayashi, K. Nakagawa (2006): Phenotype-genotype

analysis of CYP1A2 in Japanese patients receiving oral theophylline therapy, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62, 23-28

[23] T. Shimada, Y. Fujii-Kuriyama (2004): Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1, *Cancer Science*, 95, 1-6

[24] S. Safe (2001): Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis, *Toxicology Letters*, 120, 1-7

[25] I. Teino, S. Kuuse, S. Ingerpuu, T. Maimets, T. Tiido (2012): Aryl hydrocarbon receptor regulates mouse Fshr promoter activity through an E-Box binding site, *Biology of Reproduction*, 86(3):77, 1-12

[26] B. N. Fukunaga, M. R. Probst, S. Reisz-Porszasz, O. Hankinson (1995): Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor, *The Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29270-29278

[27] S. Jones (2004): An overview of the basic helix-loop-helix proteins, *Genome Biology*, 5, 226

[28] B. J. McMillan, Ch. A. Bradfield (2007): The aryl hydrocarbon receptor *sans* xenobiotics: Endogenous function in genetic model systems, *Molecular Pharmacology*, 72, 487-498

[29] J. B. Schenkman, I. Jansson (2003): The many roles of cytochrome b₅, *Pharmacology & Therapeutics*, 97, 139-152

[30] U. H. N. Dürr, L. Waskell, A. Ramamoorthy (2007): The cytochromes P450 and b₅ and their reductases – Promising targets for structural by solid-state NMR spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 3235-3259

[31] K.-H. Storbeck, A. C. Swart, P. Goosen, P. Swart (2013): Novel roles in steroidogenesis, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371, 87-99

[32] G. Vergères, L. Waskell (1995): Cytochrome b₅, its functions, structure, membrane topology, *Biochimie*, 77, 604-620

- [33] GENEzol™ Reagent
<http://www.geneaid.com/sites/default/files/GZR7.pdf> (10.4.2015)
- [34] http://en.wikipedia.org/wiki/Agarose_gel_electrophoresis (2.5.2015)
- [35] <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/11/pdb.ip47.long> (4.5.2015)
- [36] <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis> (2.5.2015)
- [37] H. Wan, Z. Zhao, Ch. Qian, Y. Sui, A. A. Malik, J. Chen (2010): Selection of appropriate reference genes for expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber, *Analytical Biochemistry*, 399, 257-261
- [38] A. Radonic, S. Thulke, I. M. Mackay, O. Landt, W. Siegert, A. Nitsche (2004): Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 856-862
- [39] E. Navarro, G. Serrano-Heras, M. J. Castaño, J. Solera (2015): Real-time PCR detection chemistry, *Clinica Chemica Acta*, 439, 231-250
- [40] TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_039284.pdf (10.3.2015)
- [41] S. A. Weller, J. G. Elphinstone, N. C. Smith, N. Boonham, D. E. Stead (2000): Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) Assay, *Applied and Environmental Microbiology*, 2853-2858
- [42] M. L. Wong, J. F. Medrano (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques*, 39
- [43] B. Feriančíková (2014): Studium vlivu dihydromyricetinu na expresi cytochromu P450 1A1 v orgánech laboratorního potkana, bakalářská práce PřF UK

