

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**



**Studium vlivu dihydromyricetinu na expresi cytochromu  
P450 1A1 v orgánech laboratorního potkana**

*Study of effect of dihydromyricetine on cytochrome P450 1A1 expression in  
organs of the rat*

**Bakalářská práce**

**Barbara Feriančíková**

**vedoucí práce: RNDr. Michaela Moserová, Ph.D.**

**Praha 2014**

## 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 její cenné rady, trpělivost, kterou se mnou měla a v neposlední řadě za všechnen čas, který mi věnovala.

## **Abstrakt**

Polyfenoly jsou jednou z nejpočetnějších skupin látek v rostlinné říši, jsou bohatě zastoupeny v ovoci, zelenině a v mnoha nápojích. Jsou součástí až 80% vyšších rostlin a proto je stále větší zájem znát i metabolismus těchto látek. Polyfenoly jsou obecně považovány za látky pozitivně působící. Nicméně je třeba se na ně dívat jako na látky cizorodé. Interagují s klíčovými enzymy I. fáze biotransformace jako jsou cytochromy P450.

V předkládané bakalářské práci byl studován vliv dihydromyricetinu na indukci CYP1A1 v organismu laboratorního potkana, zejména v orgánech účastnících se metabolismu xenobiotik a to játry a tenkým střevem. Tenké střevo bylo rozděleno na tři části - proximální, střední a distální. Vyhodnocování bylo prováděno metodou polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR). Bylo zjištěno, že dihydromyricetin významně neovlivňuje genovou expresi CYP1A1 v játrech. Na druhou stranu, v proximální části tenkého střeva byl zaznamenán nárůst a ve střední části naopak mírný pokles exprese CYP1A1 na úrovni mRNA.

(In Czech)

**Klíčová slova:** dihydromyricetin, cytochrom P450 1A1, mRNA, RT-PCR

## **Abstract**

Polyphenols are one of the largest groups of substances in the plant kingdom. They are widely represented in fruits, vegetables and many beverages. They are included up to 80% of higher plants. Moreover, there is an increasing interest to know of their metabolism. Polyphenols are considered as substances with generally positive effects. However, it is necessary to look at them as xenobiotics. However, it is necessary to regard these compounds as xenobiotics. Polyphenols are able to interact with key phase I biotransformation enzymes such as cytochrome P450.

In the present work we studied the influence of dihydromyricetine on induction of CYP1A1 in the body of the rat, particularly in the organs involved in the metabolism of xenobiotics, such as liver and small intestine. The small intestine was divided into three sections - a proximal, middle and distal. The evaluation was performed by real-time polymerase chain reaction. It was found dihydromyricetine did not significantly affect gene expression of CYP1A1 in liver. On the other hand, the change of gene expression on mRNA level was observed in small intestine; the significant increase was found in the proximal part, and small decrease in the middle part.

**Key words:** dihydromyricetine, cytochrome P450 1A1, mRNA, RT-PCR

## Obsah

1	Úvod.....	8
1.1	Cytochromy P450 .....	9
1.1.1	Nomenklatura cytochromů P450.....	9
1.1.2	Struktura cytochromů P450.....	9
1.1.3	Reakční cyklus cytochromů P450 .....	10
1.2	Cytochrom P450 1A1.....	11
1.3	Receptor pro aromatické uhlovodíky .....	12
1.3.1	Ligandy receptorů pro aromatické uhlovodíky .....	12
1.3.2	Struktura receptorů pro aromatické uhlovodíky.....	12
1.3.3	Signalizační dráha receptorů pro aromatické uhlovodíky .....	13
1.4	Polyfenoly .....	14
1.4.1	Metabolismus polyfenolických sloučenin.....	14
1.4.2	Flavonoidy .....	15
1.4.2.1	Flavonoidy a cytochromy P450 .....	16
1.4.2.2	Dihydromyricetin .....	16
2	Cíl práce .....	19
3	Materiál a metody .....	20
3.1	Použité chemikálie .....	20
3.2	Použité přístroje .....	20
3.3	Použité metody.....	21
3.3.1	Premedikace potkanů .....	21
3.3.2	Izolace RNA.....	21
3.3.3	Agarosová elektroforéza .....	23
3.3.4	Stanovení koncentrace a čistoty RNA.....	24
3.3.5	Syntéza cDNA - reverzní transkripce.....	24

3.3.6	„Real-time“ Polymerázová řetězová reakce.....	26
3.3.7	Vyhodnocování výsledků „Real-time“ polymerázové řetězové reakce .....	28
4	Výsledky .....	29
4.1	Izolace celkové RNA .....	29
4.1	Kvantifikace získané RNA pomocí reverzní transkripce a real-time PCR .....	30
5	Diskuze.....	32
6	Závěr .....	33
	Seznam použité literatury.....	34

## Seznam použitých zkratek

AhR	receptor aromatických uhlovodíků
ARNT	jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků
$A_x$	absorbance při vlnové délce x nm
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
dHMR	dihydromyricetin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
DRE	sekvence “dioxin response element“
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GABA R	kyselina gama-aminomáselná, Receptor pro kyselinu gama-aminomáselnou
Hsp90	protein teplotního šoku o molekulové hmotnosti 90kDa
PAS	doména „ <i>Per-Arnt-Sim</i> “
PCR	polymerasová řetězová reakce
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NES	„nuclear export signal“
NLS	„nuclear localization signal“
TCDD	2,3,7,8 – tetrachlordibenzo-p-dioxin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
w/v	hmotnost/objem



# 1 Úvod

V současnosti roste zájem o studium rostlinných polyfenolických sloučenin, protože jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se sníženým výskytem závažných chorob. Epidemiologická data upozorňují na korelaci mezi množstvím flavonoidů v potravě a snížením rizika kardiovaskulárních chorob<sup>[1]</sup>. Není zcela potvrzené, že snížení výskytu nádorových onemocnění u lidí konzumujících větší množství potravin bohatých na polyfenoly, je způsobeno právě jejich stravou. Přesto některé studie naznačují, že příjem potravin obsahující určité polyfenoly, jako je např. resveratrol, který je známý svou přítomností ve vínu, může chránit organismus před vznikem některých forem rakoviny a to hlavně před rakovinou plic<sup>[2]</sup>, u žen rakoviny prsu a u mužů rakoviny prostaty<sup>[3]</sup>. Mechanismy, kterými polyfenoly v potravě mohou zabránit vzniku rakoviny, zahrnují především účinky na úrovni přenosu signálu při kontrole buněčného cyklu, apoptózy a angiogeneze<sup>[4]</sup>.

Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny produkovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly též chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, ta se považuje za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy, působí také proti vzniku krevních sraženin, a tím snižují riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice<sup>[5, 6]</sup>.

Dosud není přesně známo, v jaké míře jsou rostlinné polyfenoly resorbovány z trávicího traktu člověka, a též ani jakým způsobem jsou metabolizovány a vylučovány z organismu. Rostlinné polyfenoly a to zejména flavonoidy, představují významnou část antioxidantů obsažených v naší potravě. Dosud není možné učinit jednoznačné závěry ohledně biologických účinků rostlinných polyfenolů v množství přijímaných potravin.

Je rovněž důležité zdůraznit, že některé polyfenoly ve vysokých koncentracích vykazují mnoho nepříznivých účinků jako je např. prooxidační, mutagenní, genotoxické a strumigenní aktivita. Dlouhodobý efekt a bezpečnost příjmu jednotlivých izolovaných rostlinných polyfenolů v dávkách, které převyšují jejich obsah v potravinách, dodnes není znám<sup>[7, 4]</sup>. Bylo prokázáno, že mnoho z přirozeně se vyskytujících flavonoidů může být metabolizováno cytochromy P450<sup>[8]</sup>.

## 1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.; CYP) zahrnují rozsáhlou skupinu hemových proteinů, které se vyskytují u bakterií, živočichů, rostlin, hub a člověka<sup>[9]</sup>. Jejich vývoj trvá již 1,5 miliardy let a jsou dokonce evolučně starší než hemoglobin. Jsou lokalizovány v membráně endoplazmatického retikula nebo také v membráně mitochondrií. V lidském těle se nacházejí zejména v játrech, ale také v plicích, tenkém střevě, ledvinách a mozku<sup>[10]</sup>.

Jejich název je odvozen od faktu, že redukovaný cytochrom P450 v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje neobvyklé absorpční maximum při 450 nm (písmeno P značí pigment)<sup>[11]</sup>.

Cytochromy P450 patří mezi klíčové enzymy metabolizující xenobiotika. Jsou odpovědné především za I. fázi biotransformace, jsou schopny katalyzovat reakce vedoucí ke zvýšení polárnosti substrátů. Produkty této reakce mohou být vyloučeny z organismu nebo se mohou aktivovat a vázat na endogenní látky. V přírodě mají však i jiný význam, uplatňují se při biosyntéze barviv květů nebo toxinů<sup>[10]</sup>. Hrají také nezastupitelnou roli při tvorbě steroidních hormonů, cholesterolu, žlučových kyselin, vitamínu D a mastných kyselin<sup>[12]</sup>.

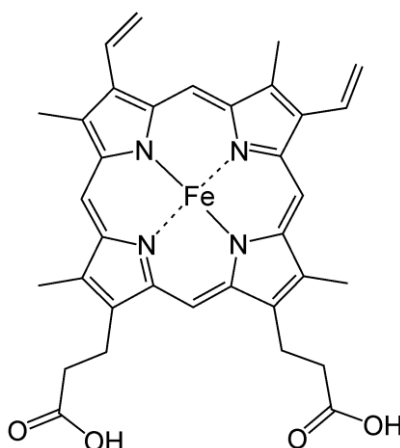
### 1.1.1 Nomenklatura cytochromů P450

V současnosti je názvosloví založené na podobnosti primární struktury a platí od roku 1996<sup>[13]</sup>. Na základě homologie aminokyselinové sekvence se cytochromy P450 rozdělují do genetických rodin a podrodin. Označují se zkratkou CYP, za kterou následuje arabská číslice označující rodinu (např. CYP1). Po ní následuje velké písmeno označující podrodinu (např. CYP1A) a za ním opět arabská číslice (např. CYP1A1), která vyjadřuje konkrétní formu enzymu. Cytochromy shodující se v aminokyselinové sekvence ve více než 40% patří do stejné rodiny. Pokud se shodují ve více než 55%, patří do stejné podrodiny<sup>[9]</sup>.

### 1.1.2 Struktura cytochromů P450

Navzdory rozdílům v substrátové specifitě obsahují všechny CYP konzervované sekvence v blízkosti vazebného místa pro hem. Struktura je tvořena z hemu b, který je tvo-

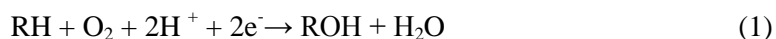
řen protoporfyrinem IX, jehož centrální atom železa je vázán čtyřmi dusíky porfyrinového kruhu (viz. Obr. 1). Porfyrinový skelet je vázán jednak hydrofobní vazbou a zároveň pomocí thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, který je přítomen v aktivním centru enzymu. Šestým ligandem je atom kyslíku, který je poskytován molekulou vody<sup>[10, 14]</sup>. Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od ostatních<sup>[15]</sup>.



Obr. 1 Struktura hemu<sup>[16]</sup>.

### 1.1.3 Reakční cyklus cytochromů P450

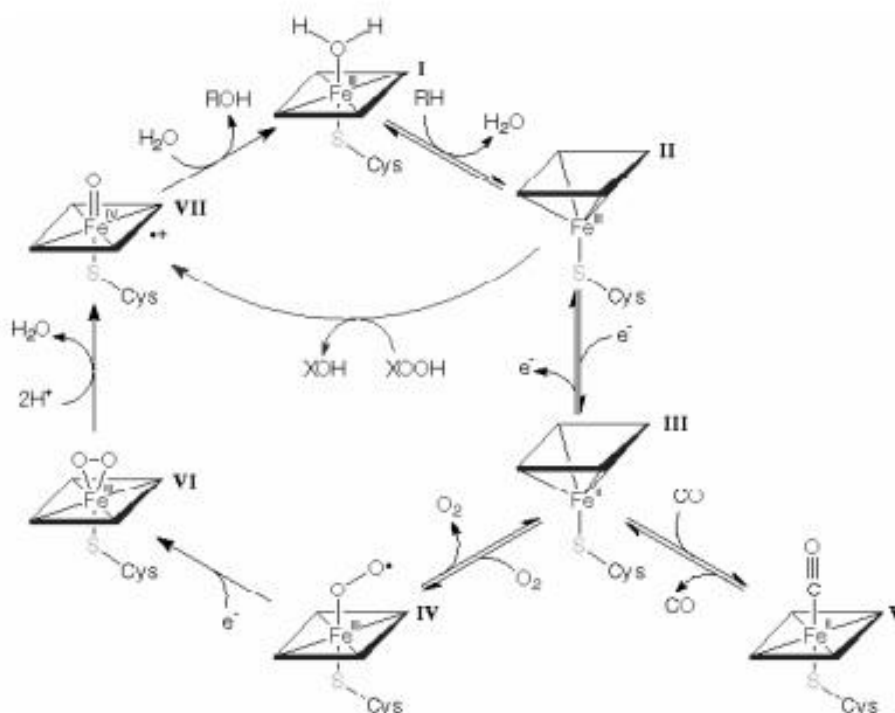
Cytochrom P450 je složkou systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém) a tvoří jeho terminální oxidasu<sup>[9]</sup>. Obecně můžeme reakční průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 vyjádřit sumární rovnicí:



Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá mechanismem popsáním v osmi krocích (viz Obr. 2 na str. 11).

V klidovém stavu je železo v oxidačním čísle III a nízkospinovém stavu. Šesté vazebné místo je obsazeno kyslíkem z molekuly vody případně aminokyselinovým ligandem. Po vniknutí substrátu (RH) do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu železa. Ion  $\text{Fe}^{3+}$  je vysokospinovém stavu a také dochází ke konformační změně enzymu. Vazbou tohoto substrátu je umožněna jednoelektronová redukce cytochromu P450, čímž se železo redukuje na oxidační číslo II, ale zůstává vysokospinové. Tato forma je následně schopna vázat molekulární kyslík případně jiné ligandy. Po navázání kyslíku vznikne ferrisuperoxi-

dový komplex, který je opět v nízkospinové formě. Tento nestabilní komplex prochází druhou redukcí, kterou vznikne velmi stabilní komplex obsahující vazbu OO. Jeden atom kyslíku zůstává na hemu za vzniku ferrioxénového komplexu a druhý reaguje s dvěma protony za vzniku vody. Ferrioxidový komplex je stabilizován posunem elektronů z thiolátové síry na kyslík, čímž vzniká reaktivní kyslíkový radikál. Tento radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na hem. Tak dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu <sup>[15, 17]</sup>.



Obr. 2 Reakční cyklus cytochromů P450 <sup>[15]</sup>.

## 1.2 Cytochrom P450 1A1

CYP1A1 je extrahepatální enzym, který se nachází v plicích, mozku, srdci a gastrointestinálním traktu. Po indukci se jeho koncentrace v játrech může zvýšit <sup>[18]</sup>. Je známý pro svou schopnost biotransformace polycyklických aromatických uhlovodíků, heterocyklických nitrosloúčenin a jejich derivátů a také aromatických aminů <sup>[19]</sup>. Většinu substrátů tvoří planární molekuly, složené z jednoho nebo více aromatických případně heterocyklických kruhů. CYP1A1 (a také ostatní cytochromy CYP1A rodiny) mohou přispívat ke vzniku metabolicky aktivních karcinogenů a mutagenů <sup>[20]</sup>. Indukce exprese

CYP1A1 je řízena přes jaderný receptor, vázající polycyklické aromatické uhlovodíky (AhR). AhR řídí expresi genů rodiny CYP1 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1)<sup>[21]</sup>.

### 1.3 Receptor pro aromatické uhlovodíky

Bylo prokázáno, že AhR kontroluje expresi genů kódujících enzymy jednak první ale i druhé fáze biotransformace na transkripční úrovni. Poprvé byl identifikovaný v roce 1976, kde byla prokázána specifická vazba s TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), který je vysoce toxickým vedlejším produktem průmyslových procesů a spalování organických materiálů<sup>[22]</sup>.

#### 1.3.1 Ligandy receptorů pro aromatické uhlovodíky

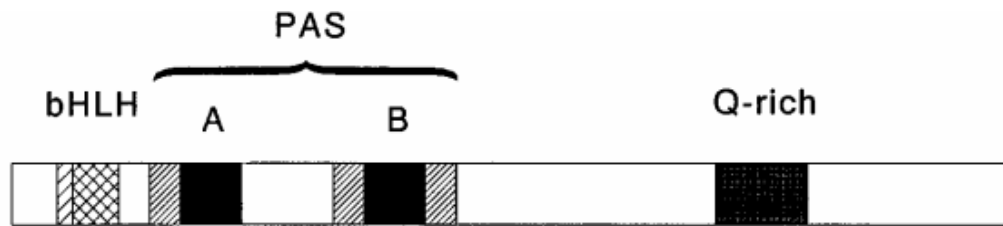
Ligandy AhR byly obecně rozděleny do dvou skupin, a to syntetické a přirozeně se vyskytující. Jako první byly objeveny právě syntetické ligandy, mezi které patří halogenované aromatické uhlovodíky (např. dibenzofurany, bifenyl) a polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzo[a]pyren)<sup>[23]</sup>. Mezi přirozeně se vyskytující ligandy AhR patří deriváty tryptofanu, kyselina arachidová a bilirubin avšak tyto endogenní ligandy jsou dodnes velkou záhadou a dosud byly objeveny pouze ty s nízkou afinitou<sup>[24, 25, 26]</sup>. Společnou vlastností většiny těchto ligandů je že jsou hydrofobními, planárními nebo koplanárními polycyklickými molekulami<sup>[27]</sup>.

#### 1.3.2 Struktura receptorů pro aromatické uhlovodíky

Protein AhR je klasifikován jako člen bazických transkripčních faktorů rodiny „helix-loop-helix“ (bHLH)<sup>[28, 29]</sup>.

Protein obsahuje 3 funkční domény (Obr. 3 na str. 13), doména bHLH je lokalizována na N-konci proteinu, je zodpovědná za vazbu Hsp90 a také za vazbu k DNA. Obsahuje sekvenci NLS (nuclear localization signal), která spolu se sekvencí NES (nuclear export signal) obsaženou v doménách bHLH a PAS umožňuje vstup AhR do jádra v případě aktivity. Další doménou je PAS, která byla pojmenována po třech proteinech, v nichž byla poprvé objevena - Per, Arnt, Sim. Je umístěna v blízkosti C-konce domény bHLH a je odpovědná za vazbu ligandu, molekulového Hsp90 a dimerizaci. Tato doména sestává ze dvou opakujících se jednotek PAS-A a PAS-B, které jsou od sebe odděleny úsekem asi

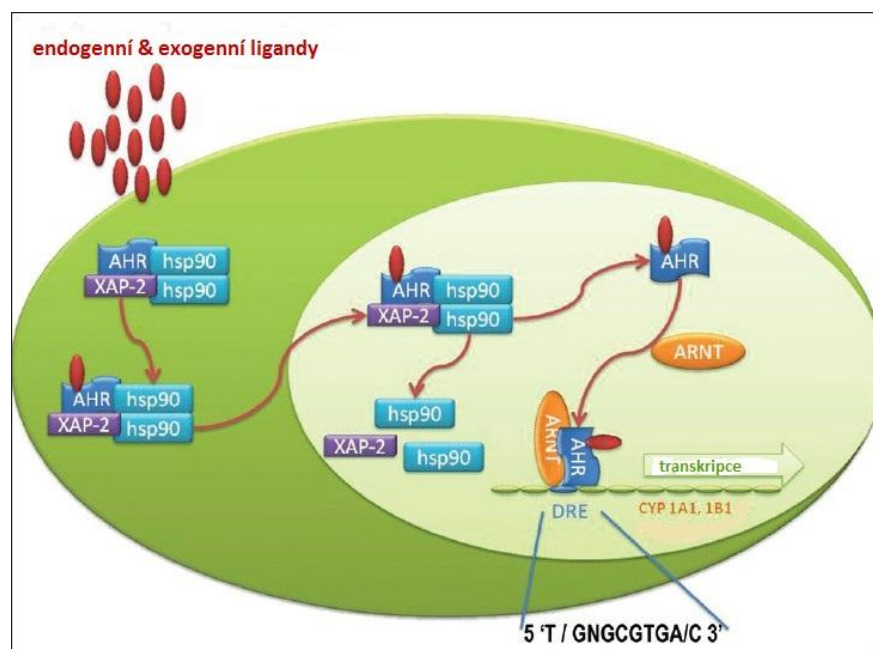
150 aminokyselin. Poslední doménou je C-terminální doména, nacházející se na C-konci. Je bohatá na glutamin a je odpovědná za transkripční aktivitu [30, 31, 32].



Obr. 3 Domény Ah receptoru [33].

### 1.3.3 Signalizační dráha receptorů pro aromatické uhlovodíky

Neaktivovaný AhR je přítomen v cytoplazmě v podobě komplexu složeného z dimeru Hsp90, proteinu P23 a proteinu XAP2. Dimer Hsp90 spolu s P23 zabraňují předčasnému navázání proteinu Arnt. Po navázání ligandu na PAS doménu dochází ke konformační změně a XAP2 se uvolňuje. Takto aktivovaný AhR se přesouvá do jádra [34]. V jádru tak vytvoří heterodimery s Arnt. Tento komplex AhR-Arnt se pak s vysokou afinitou váže na oblast DNA, která se nazývá DRE (dioxin-response element), (schéma viz Obr. 4). Konečným výsledkem je řada diferenciálních změn v genové expresi [35].



Obr. 4 Schéma signalizační dráhy AhR [36].

## 1.4 Polyfenoly

Polyfenoly jsou jednou z nejpočetnějších skupin látek v rostlinné říši. Slouží rostlinám jako stavební a strukturní složky, proto jsou přítomné v různých částech rostlin – v dřevě, listech, kořenech i plodech. Polyfenoly jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin. Jsou to látky obranné (chrání před chladem, stresem, škůdci), signální (přivolávají opylovače), chuťové a barevné látky květů a plodů. Většina rostlinných polyfenolů je produktem fenylpropanoidacetátové a/nebo šikimátové biosyntetické dráhy<sup>[37,38]</sup>. V současné době je dobře známo více než 8000 druhů fenolických skupin<sup>[5]</sup>. Tyto látky obsahují několik fenolických funkčních skupin na jednotlivých aromatických jádrech molekuly<sup>[38]</sup>.

Nakolik jsou polyfenoly přítomné ve všech rostlinných organelách, jsou nedílnou součástí lidské potravy. Až do nedávné doby byla většina zájmu polyfenolických sloučenin věnována jejich škodlivým účinkům, způsobovaných schopností těchto sloučenin navázat se a vysrážet makromolekuly jako jsou bílkoviny, sacharidy, trávicí enzymy apod., a tím snižovat stravitelnost potravin. Nicméně zájem o tuto skupinu látek v potravinách byl výrazně zvýšen po zjištění, že některé z nich mají antioxidační a zdraví prospěšné účinky, například při léčbě a prevenci rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění<sup>[37]</sup>.

### 1.4.1 Metabolismus polyfenolických sloučenin

Většina polyfenolických sloučenin je metabolizována v gastrointestinálním traktu<sup>[37]</sup>. Hlavním místem resorpce v trávicím traktu je tenké a tlusté střevo, avšak některé polyfenoly obsažené zejména v nápojích mohou být částečně resorbovány již v ústní dutině<sup>[4]</sup>. Aglykony a jednoduché volné fenolické sloučeniny mohou být absorbovány prostřednictvím sliznice tenkého střeva. Avšak na druhé straně beta-glykosidy, které fenolické sloučeniny často vytvářejí, se před absorpcí musí hydrolyzovat na příslušné aglykony. Nakolik savci postrádají beta-glykosidasy, předpokládalo se, že k absorpci v tenkém střevě nedochází. Nicméně byla prokázána jejich částečná resorpce v horní části střeva. Většina glykosidů však přechází do tlustého střeva, kde jsou hydrolyzovány za vzniku volných aglykonů.<sup>[37]</sup>

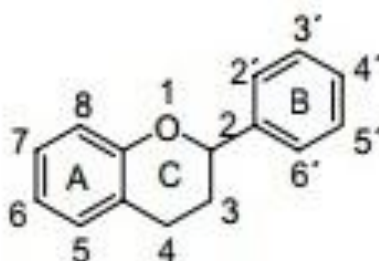
Po resorpci z trávicího traktu jsou polyfenolické látky dále metabolizovány obdobně jako ostatní xenobiotika. Polyfenoly jsou konjugovány s kyselinou glukuronovou, síro-

vou nebo glycinem, podléhají methylaci a také kombinacím těchto proměn. To spolu s bakteriálními proměnami v trávicím traktu vede k velkému počtu různých metabolitů.

Polyfenoly se z organismu vylučují močí, převážně ve formě polárních konjugátů, dobře rozpustných ve vodě. Předpokládá se, že může docházet k enterohepatálnímu oběhu polyfenolů, který prodlužuje jejich vylučování z organismu [5].

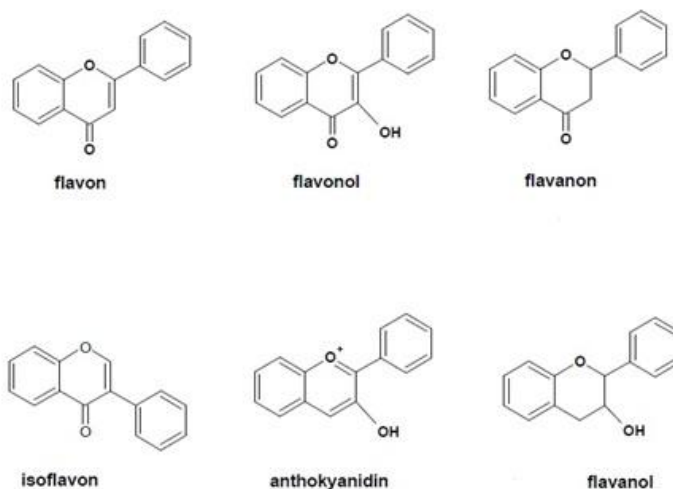
### 1.4.2 Flavonoidy

Flavonoidy představují jednu z nejrozšířenějších skupin rostlinných fenolů. Jejich společná struktura je odvozená od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem (struktura C6-C3-C6). Obr. 5 zobrazuje základní strukturu a systém číslování uhlíků flavonoidů [37].



Obr. 5 Základní struktura flavonoidů - flavonové jádro [39].

Podle struktury se flavonoidy dělí na flavanony, flavanoly, flavanony, izoflavony, anthokyaniny a flavanoly (Obr. 6) [40].



Obr. 6 Struktura jednotlivých flavonoidů [40].



Flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě beta-glykosidů obsažených zejména v ovoci a zelenině, ale také v některých nápojích jako je čaj či víno. Flavony se vyskytují ve sladké paprice, tymiánu (např. luteolin). Flavanoly najdeme především v brokolici, borůvkách, rybízu (např. myricetin). Flavanony se nacházejí v citrusových plodech (např. hesperidin) a izoflavony v sójových bobech (např. genistein). Anthokyanidiny najdeme zejména v hroznovém víně (např. malvidin) a flavanoly se vyskytují v kakau, čaji a jablkách (např. epikatechin) <sup>[40]</sup>.

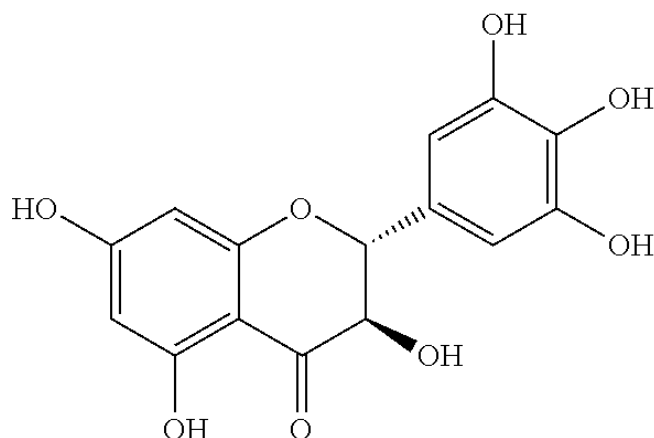
#### ***1.4.2.1 Flavonoidy a cytochromy P450***

Kromě již zmiňovaných nespecifických účinků flavonoidů, mohou tyto látky moduovat systém CYP, včetně aktivace specifických izoenzymů CYP, a také indukce nebo inhibice těchto enzymů. Některé flavonoidy mění hladiny CYP. Indukují nebo stimulují aktivitu CYP, čímž může dojít k aktivaci karcinogenů. Flavonoidy ovšem dokážou CYP i inhibovat <sup>[41]</sup>.

Jak bylo uvedeno v kapitole 1.1, cytochromy P450 hrají významnou roli v I. fázi biotransformace xenobiotik. Proto ovlivnění těchto enzymů může výrazně ovlivnit i metabolismus dalších přijatých xenobiotik. Zapojení flavonoidů do interakce s cytochromy P450 probíhá na těchto úrovních, buď ovlivňují expresi některých CYP, nebo jejich enzymovou aktivitu, a to stimulací nebo inhibicí <sup>[42]</sup>.

#### ***1.4.2.2 Dihydromyricetin***

Dihydromyricetin (struktura viz. Obr. 7 na str. 17) je bioaktivní flavonoid, který je obsažený v léčivé rostlině *Ampelopsis grossedentata*, vyskytující se v Číně a vyrábí se z ní ratanový čaj. Známý je také její výskyt v rostlině *Hoven dulcis* (český název dužistopka sladká), která se využívá v tradiční čínské medicíně <sup>[43]</sup>. Je odolná vůči oxidaci, dokáže vychytávat volné radikály a vykazuje také protinádorovou aktivitu <sup>[44]</sup>.

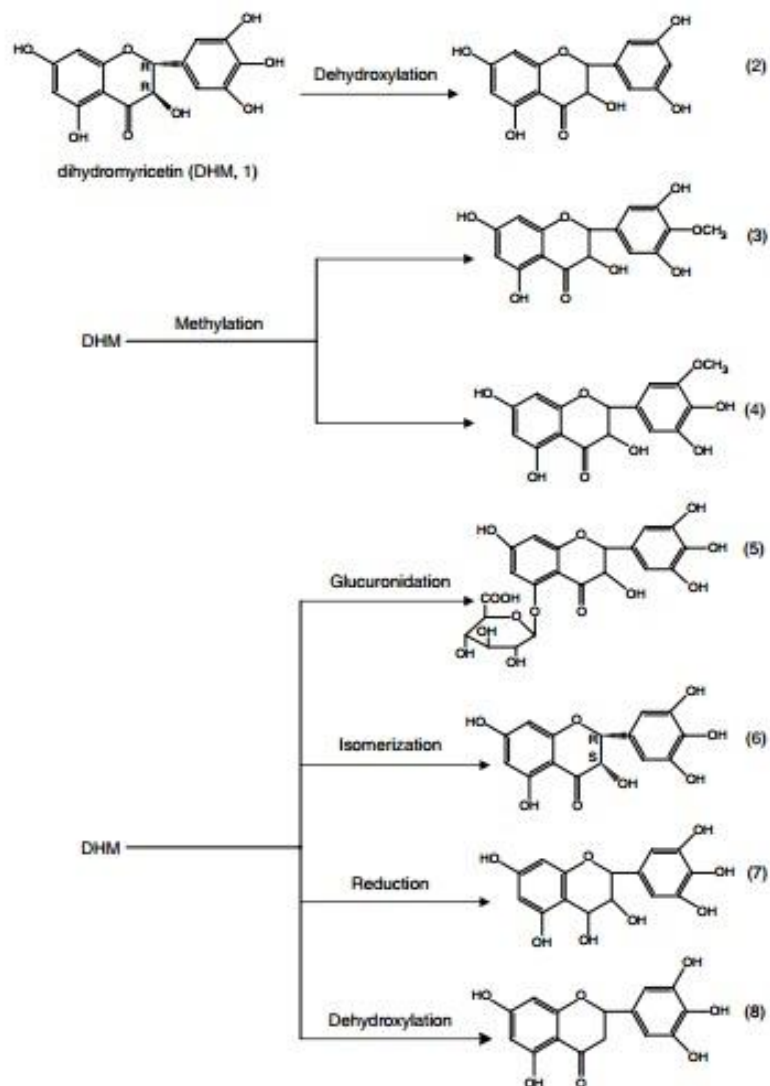


Obr. 7 Struktura dihydromyricetinu <sup>[45]</sup>.

Díky svým nutričním vlastnostem by dihydromyricetin mohl mít uplatnění v potravinářském průmyslu, ale jeho špatná rozpustnost ve vodě omezuje jeho použití jako doplňku stravy, mnohé studie se zabývají vznikem rozpustnějších komplexů dihydromyricetinu <sup>[46]</sup>. Nejčastějšími komplexy jsou s atomy kovů, které zlepšují jeho vlastnosti a účinky <sup>[47]</sup>.

Dihydromyricetin je známý hlavně tím, že blokuje akutní alkoholovou intoxikaci, antagonistickým působením na GABA receptory v mozku, čímž blokuje vazbu alkoholu na tyto receptory <sup>[48]</sup>. Také ovlivňuje vznik abstinenčních příznaků, jako jsou úzkost, citlivost a záchvaty, snižuje dokonce i chuť na alkohol <sup>[49, 48]</sup>. V poslední době byly pozorovány další aktivity dihydromyricetinu, a to hypoglykemické, antibakteriální a hepatoprotektivní <sup>[50]</sup>.

Doposud není zcela znám metabolismus dihydromyricetinu v lidském organismu. Avšak některé studie prokázaly různé metabolity dihydromyricetinu (Obr. 8 na str. 18) po jeho perorálním podání potkanům.



Obr. 8 Schéma metabolitů dihydromyricetinu<sup>[50]</sup>.

Metabolity 2 až 5 byly získány chromatografickou separací z moči potkanů a metabolity 6 až 8 byly detekovány ve vzorcích stolice potkanů.

Názvy jednotlivých metabolitů podle schématu na Obr. 8:

- (2): 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanol
- (3): 5,7,3',5'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavanol
- (4): 5,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavanol
- (5): 5,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavanol
- (6): 5,7,3',4',5'-heptahydroxyflavanů
- (7): 3,4,5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanon
- (8): 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanon<sup>[50]</sup>.

## 2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

1. Izolovat celkovou RNA z orgánů laboratorních potkanů kontrolních nepremedikovaných a premedikovaných dihydromyricetinem
2. převést izolovanou RNA pomocí reverzní transkripce na cDNA využitím náhodných hexamerů jako primerů
3. kvantifikovat metodou „real-time“ PCR původní obsah mRNA pro enzym CYP1A1 v orgánech potkanů premedikovaných dihydromyricetinem relativně vůči kontrolnímu genu ( $\beta$ -aktin)
4. porovnat získané výsledky se stanovením relativního množství mRNA pro CYP1A1 v orgánech potkanů, kterým dihydromyricetin nebyl podáván

### 3 Materiál a metody

#### 1.5 Použité chemikálie

Ambion	RNase free H <sub>2</sub> O
Applied Biosystems	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Gene Expression Master Mix
Bio Basic Inc.	Tris, kyselina boritá, EDTA
Fermentas	λ DNA EcoRI + Hind III
Invitrogen	Trizol® Reagent
Lachema	Ethanol
Lech-Ner	Isopropanol
Life Technologies	Prime & Probes β-actin, Prime & probes CYP1A1 (Rn00667869_m1/Rn00487218_m1specifické pro potkaní gen pro β-aktin/CYP1A1)
Linde	Tekutý dusík
New England BioLabs	Gel loading Dye, Blue (6x)
Penta	Chloroform

#### 1.6 Použité přístroje

Centrifuga	Centrifuge Eppendorf 5415R
Cykler	Techgene

DarkReader	Transilluminator DR-45M
Flow-box	Labox
Real-time cykler	RotorGene2000 – Real-Time Cyclers
Spektrofotometr	Helios $\alpha$
Termoblok	VLMLS1
Vortex	VELP scientifica Rx <sup>3</sup>
Zdroj napětí	Electrophoresis Power Supply-EPS 301

## 1.7 Použité metody

### 1.7.1 Premedikace potkanů

Laboratorní potkani (samci, kmen Wistar, 150-200 g) byli drženi při teplotě  $22 \pm 2$  °C. 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. Den před usmrcením byla zvířatům odebrána strava.

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. 207/2004 v prostorech Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK (U nemocnice 478/5, Praha 2).

Po usmrcení byla potkanům odebrána játra a tenké střevo. Tenké střevo bylo dále rozděleno na tři části: proximální, střední a distální část. Proximální část střeva byla oddělena přibližně 2 cm pod žaludkem. Každá oddělená část měla délku přibližně 2 cm.

### 1.7.2 Izolace RNA

Izolace vysoce kvalitní RNA je značně náročná. Ribonukleasy, které hydrolyticky štěpí RNA, jsou všudypřítomné. Dělíme je na exogenní (z prostředí) a endogenní (z izolovaného materiálu), jejich zdrojem mohou být vlasy, kůže, pot apod., navíc jsou tyto enzymy velmi odolné, proto je při práci s RNA třeba dodržovat preventivní opatření proti ribo-

nukleasam a vysokou čistotu. Pro tuto práci byly použity automatické pipety, špičky s filtrem, laboratorní sklo a chemikálie vyčleněné jenom na práci s RNA<sup>[51]</sup>.

Při izolaci RNA se využívají komerčně dostupná činidla, které umožňují izolaci RNA (také DNA) z buněčných kultur a vzorků tkání. Přispívají k maximalizaci informací, které mohou být z těchto tkání získané. Mezi tato činidla patří i TRIzol®, který byl využit v této bakalářské práci<sup>[52]</sup>. TRIzol® obsahuje guanidin thiokyanát a fenol. Udržuje integritu RNA díky vysoce účinné inhibici aktivity RNAs při narušení buněk a rozpouštění jejich složek v průběhu homogenizace vzorku. Po homogenizaci je materiál přenesen do TRIzolu. Přidáním chloroformu se zajistí rozdělení RNA do vodného roztoku supernatantu. Homogenát se centrifuguje a rozdělí se na horní, čirou vrstvu, obsahující RNA, mezifázi a spodní červenou organickou vrstvu obsahující DNA a proteiny. RNA se z vodné vrstvy vysráží pomocí isopropanolu a promyje ethanolem (1 ml 75% ethanolu na 1 ml TRIzolu)<sup>[53]</sup>.

Po celou dobu izolace byly používány rukavice bez pudru a pracovalo se ve flow-boxu (Labox typ: BIO 126). Pinzety, špachtle, třecí misky, tloučky a kádinky byly nejdříve ošetřeny 10% peroxidem vodíku a společně s pipetovacími špičkami s filtrem a mikrozkuvkami Eppendorf (0,5; 1,5; 2ml) byly sterilizovány v sušárně po dobu 6 hodin při 130 °C. Sterilizované pomůcky byly vloženy do flow-boxu spolu se stojany na mikrozkuvky Eppendorf, špičkami s filtry, pipetami se stojanem, mikrocentrifugou, a polystyrenovou krabicí na tekutý dusík a asi na 15 minut byl flow-box vysvícený UV zářením, kvůli eliminaci četnosti mikroorganismů.

Vzorek každé tkáně byl homogenizován v třecí misce za pomoci tekutého N<sub>2</sub>. Pomocí špachtle bylo přeneseno přibližně stejné množství homogenizovaného materiálu do příslušných mikrozkuvek Eppendorf s TRIzolem, přičemž na 1 ml TRIzolu je třeba přidat 50 až 100 mg tkáně<sup>[54]</sup>. Vzorky byly promíchány na vortexu (Velp scientifica Rx<sup>3</sup>), postaveny na víčko a nechány inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Následně bylo do každé mikrozkuvky přidáno 150 µl chloroformu. Vzorky byly 15 sekund míchány na vortexu (Velp scientifica Rx<sup>3</sup>) a opět nechány inkubovat při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Vzorky byly centrifugovány (Eppendorf 5415R) při 12 000 x g při 4°C po dobu 15 minut. Ze vzorků byla opatrně odebrána bezbarvá vodní fáze po 80 µl do 1,5 ml čisté mikrozkuvky. Do všech vzorků bylo přidáno množství isopropanolu odpovídající objemu

odebrané vodné fáze a každá mikrozkušavka byla 5krát překlopěna. Vzorky byly nechány inkubovat 10 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly opět cetrifugovány (Eppendorf 5415R) při 12 000 x g při 4 ° C po dobu 15 minut. Supernatant byl slit do kádinky, bylo přidáno 750  $\mu$ l 75 % ethanolu (v RNase free vodě) a vzorek byl 10 sekund vortexován (Velp scientifica Rx<sub>3</sub>). Následovala centrifugace (Eppendorf 5415R) 5 minut při 7 600 x g a teplotě 4 °C. Pipetou byl opatrně odebrán supernatant a na termobloku (VLMLS1), vyhřátém na 60°C, byl odpařen zbývající ethanol. Vzorky byly ředěny, krátce vortexovány (Velp scientifica Rx<sup>3</sup>) a inkubovány 15 minut při 60°C. Následně byly vzorky rozpipetovány a aliquoty mRNA byly uchovány při teplotě -80°C v hluboko mrazicím boxu.

### 1.7.3 Agarosová elektroforéza

Elektroforéza na agarosovém gelu je jedna z neúčinnějších metod separace fragmentů RNA (i DNA) o různé velikosti (100 bp až 25 kb). Během želatinace se polymery agarosy nekovalentně spojují a vytvářejí síť svazků. Fosfátový zbytek na nukleotidech způsobuje, že je molekula nukleové kyseliny záporně nabitá. Proto pokud je RNA umístěna v elektrickém poli, fragmenty migrují ke kladně nabitě anodě. Vzhledem k tomu, že RNA má jednotný poměr hmotnost/náboj. Fragmenty RNA jsou odděleny podle velikosti v agarosovém gelu tak, že vzdálenost, kterou urazí fragmenty, je nepřímou úměrná logaritmu molekulové hmotnosti [54].

Elrlenmayerova baňka a odměrné válce byly sterilizovány 6 hodin při teplotě 130°C. Následně byla připravena 1% (w/v) agarosa v 0,5 x TBE (zásobní TBE pufr 5x koncentrovaný, 445mM TRIS; 445mM kyselina boritá; 10mM EDTA; pH 8-8,3). Směs byla ohřívána v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy. Po ochlazení pod proudem tekoucí vody byl gel přelit do připravené aparatury. Do gelu byl vložen hřeben na vytvoření jamek. Po ztuhnutí (30 min) byl hřeben vyňat a vanička se ztuhlým gelem byla přemístěna do aparatury na elektroforézu. Jako elektrodový pufr byl použit 0,5x TBE pufr

Vzorky byly připraveny tak, že příslušné množství izolované RNA bylo doplněno na 5  $\mu$ l RNase free vodou a ke každému vzorku byl přidán 1  $\mu$ l vzorkového pufru "6x Loading dye". Marker byl připraven dle návodu smícháním 1  $\mu$ l  $\lambda$  EcoRI + HinDIII s 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O a 1  $\mu$ l "6x Loading dye", následně byl zahřát na 65 °C a na 3 minuty umístěn na led. Vzorky byly nanášeny do jamek a aparatura byla připojena ke zdroji (Electrophoresis



Power supply-EP5 301), elektroforéza probíhala při napětí 110 V po dobu přibližně 45 minut.

Pro vizualizaci byla použita barva SyberGreen II, která byla 10000x naředěna v 1x TBE do celkového objemu 50 ml v určené plastové misce. Gel byl vložen do této lázně a po dobu 30 minut ponechán na třepačce. Následně byl gel vyvolán na DarkReaderu (Transilluminator DR-45M) v temné místnosti a vyfotografován.

#### 1.7.4 Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace RNA je stanovena měřením absorbance při 260 nm. Při této vlnové délce nukleové kyseliny vykazují absorpční maximum, kvůli jejich aromatickému základu. Pro odečítání signálu pozadí se měří absorbance při 320 nm. To však platí pouze při měření ve vodě, proto je nutné RNA ředit vodou. Poměr mezi hodnotami absorbance při 260 nm a 280 nm umožňuje odhadnout čistotu RNA s ohledem na kontaminanty absorbující v UV. Čistá RNA má poměr  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  1,9–2,1 při 10 mM koncentraci [55].

K 5  $\mu$ l roztoku izolované RNA jsem přidala 395  $\mu$ l RNase free vody a proměřila absorpční spektrum od 230 nm do 330 nm na spektrofotometru He $\lambda$ ios  $\alpha$  za použití křemenné květy.

Čistotu izolované RNA jsem počítala podle poměru:

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

Koncentraci izolované RNA [ $\mu$ g. $\mu$ l<sup>-1</sup>] jsem určila podle vzorce:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \times 40 \times \text{ředení} \quad (3)$$

#### 1.7.5 Syntéza cDNA - reverzní transkripce

Reverzní transkripce RNA do cDNA je základní metodou pro studium genové exprese. Vytvořená cDNA odráží množství a složitost původní mRNA. Samotná reverzní

transkripce probíhá ve třech základních krocích. První, iniciační krok, zahrnuje navázání RNA polymerasy na promotor, který představuje přesně sekvenčně definovanou oblast na DNA. Iniciační fáze končí zahájením syntézy řetězce RNA ve směru 5'-3' podle komplementarity bází pouze na jednom vlákně, na tzv. matricovém řetězci. Druhý krok se nazývá elongace transkripce. RNA-polymerasa postupně přidává nukleosid-5'-monofosfát na 3'-konec řetězce RNA, přičemž se posouvá po kódující řetězci DNA, jehož směr fosfodiesterových vazeb je 3'-5'. Třetí krok, terminace transkripce, zahrnuje zastavení elongace řetězce RNA na konci genu a vyvázání RNA-polymerasy z matricového řetězce DNA <sup>[56]</sup>.

Při kvantifikaci míry exprese genů, je třeba současně se specifickou amplifikací provést i amplifikaci srovnávacího genu. Používají se na to geny, které kódují proteiny esenciálně zastoupené ve většině tkání (resp. pletiv) a jejich exprese je za všech podmínek stejná a nebývá ničím ovlivněna. V této bakalářské práci byl použit  $\beta$ -aktin.

Po celou dobu práce byly používány rukavice bez pudru a pracovalo se ve flow-boxu (Labox typ: BIO 126). Odpovídající množství RNA, vztaženo na 1  $\mu$ g, bylo napipetováno do RNase free vody do celkového objemu 10  $\mu$ l. Vzorky byly promíchány a centrifugovány na mikrocentrifuze. Jako negativní kontrola bylo použito odpovídající množství RNase free vody.

Do mikrozkušavky byl připraven roztok "mixu", který na jeden vzorek obsahoval:

2 $\mu$ l	10x RT pufr (inhibitor RNAs)
0,8 $\mu$ l	25x dNTP mix (prekurzory nukleotidů)
2 $\mu$ l	10x RT Random Primers (iniciují syntézu nových řetězců DNA)
1 $\mu$ l	RNase inhibitor
3,2 $\mu$ l	RNase free voda

Do každého vzorku, a také do negativní kontroly, bylo pipetováno 9  $\mu$ l tohoto "mixu" a vzorky byly opět promíchány a centrifugovány. Z každého vzorku byly odebrány 2  $\mu$ l, které sloužily jako vzorky kontrolní.

Do všech vzorků (kromě kontrolních), a také do negativní kontroly, byl přidán 1  $\mu$ l reverzní transkriptasy, což je specifický enzym, který zprostředkovává syntézu cDNA.

Zkumavky byly vloženy do cykleru (Techgene) a byl použit následující časový resp. teplotní protokol:

25°C	10 min (nasednutí náhodných hexamerů)
37°C	120 min (prodlužování řetězce cDNA)
85°C	5 min (inaktivace reverzní transkriptázy)

Po ukončení celého cyklu byly zkumavky udržovány při teplotě 4°C. Následně byly vzorky uchovány v mrazicím boxu při -80°C pro další použití.

### 1.7.6 „Real-time“ Polymerázová řetězová reakce

Tato metoda využívá kromě PCR i 5' nukleasovou aktivitu DNA polymerasy a také fluorescenci. TaqMan sonda má na 5' konci fluorescenční barvivo (např. FAM<sup>™</sup>) a na 3'konci zhášecí barvivo (v této bakalářské práci bylo použito MGB). V průběhu reakce dochází na základě 5' nukleasové aktivity ke štěpení sondy, která se tím vzdaluje od zhášecího barviva, čímž dochází ke zvýšení fluorescence<sup>[57]</sup>. Reakce jsou charakterizovány bodem v čase (nebo PCR cyklu), kde je jako první zjištěna cílová amplifikace. Tato hodnota se obvykle označuje jako práh cyklu (cycle treshold, C<sub>T</sub>), v okamžiku, kdy intenzita fluorescence je větší než fluorescence pozadí. V důsledku toho, čím větší je množství cílové cDNA ve výchozím materiálu, tím rychleji se objeví významné zvýšení fluorescenčního signálu, čímž se získá nižší C<sub>T</sub><sup>[58]</sup>.

Celou dobu bylo pracováno v rukavicích bez pudru, se sterilními špičkami s filtrem a mikrozukumavkami. cDNA bylo třeba naředit RNase free vodou 10x (v některých případech 100x) do celkového objemu 12 µl. Pak byl připraven roztok "mixu", který na jeden vzorek obsahoval:

10 µl	TaqMan® Gene Expression Master Mix
4 µl	RNase free voda
1 µl	TaqMan® Gene Expression assay (β-aktin resp. CYP 1A1)

Do mikrozukumavek Eppendorf bylo napipetováno 15 µl "mixu" a následně 5 µl naředěné cDNA, do blanku bylo namísto cDNA napipetováno 5 µl RNase free vody.

Následně byly všechny vzorky vloženy do přístroje pro „Real-time“ PCR (Rotor Gene 2000). Neobsazená místa v karuselu byly vyplněna prázdnými mikrozukumavkami.

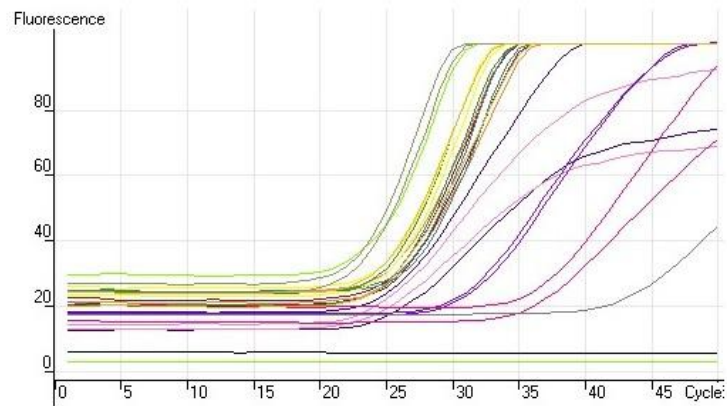
Podmínky real-time PCR:

2 min	50°C (nasednutí primerů)
10 min	95°C (aktivace DNA polymerasy)

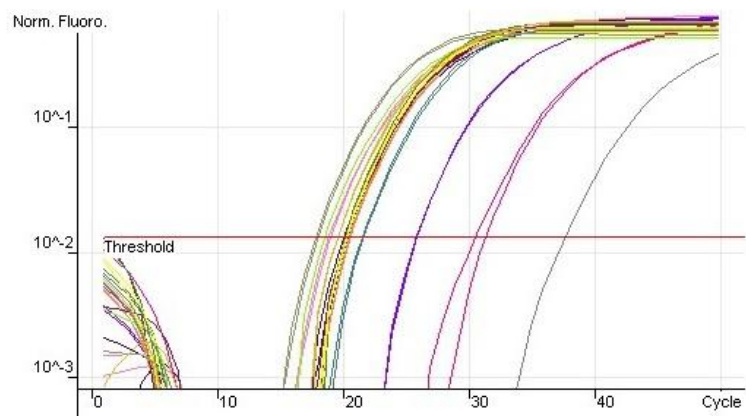
A 50 opakujících se cyklů s podmínkami:

15 sec	95°C (denaturace DNA řetězce)
60 sec	60°C (hybridizace sond a prodlužování řetězce DNA)

K vyhodnocení byl použit program Rotor Gene 5 (Rotor-Gene Real-Time Analysis Software, Corbett Research 2000), pomocí kterého byla určena hodnota  $C_T$  (viz Obr. 9).



A)



B)

blank	middle DHMR 1
proximal DHMR 1	middle DHMR 2
proximal DHMR 2	middle DHMR 3
proximal DHMR 3	middle kontrolní 1
proximal kontrolní 1	middle kontrolní 2
proximal kontrolní 2	middle kontrolní 3
proximal kontrolní 3	negativní kontrola

C)

Obr. 9 Amplifikační graf „real-time“ PCR v lineárním (A) a logaritmickém (B) zobrazení s vyznačenou linií „threshold“ spolu s popiskami křivek (C).

### 1.7.7 Vyhodnocování výsledků „Real-time“ polymerázové řetězové reakce

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu REST2009.

Nejdřív byl vypočítán aritmetický průměr  $C_T$  dvou paralelních měření pro jeden vzorek, který vyjadřuje expresi daného genu v daném vzorku.

Stanovení  $\Delta C_T$  podle vzorce:

$$\Delta C_T = C_T(\text{CYP1A1}) - C_T(\beta\text{-aktin}) \quad (4)$$

Takto vypočtený  $\Delta C_T$  vyjadřuje expresi sledovaného genu ve srovnání s referenčním genem v daném vzorku tkáně.

Míra indukce exprese genu CYP1A1 ve vzorcích tkání odebraných z potkanů premedikovaných dihydromyricetinem a nepremedikovaných byla vypočítána podle vzorce:

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

dHMR značí tkáně potkanů premedikované dihydromyricetinem, a kontrola tkáně nepremedikované.

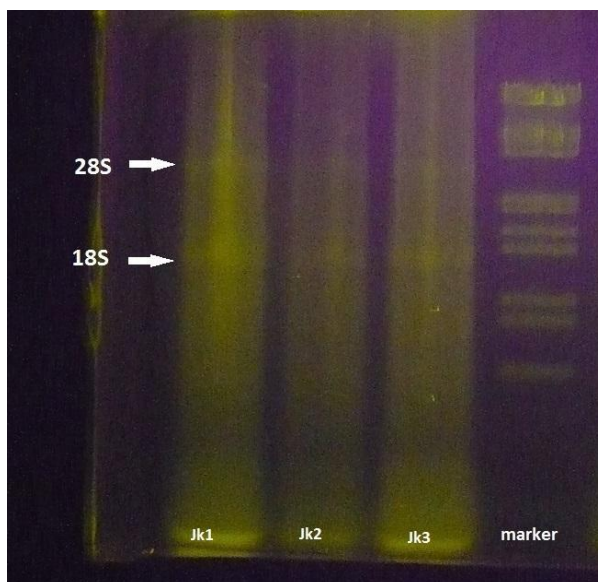
## 4 Výsledky

Pro určení obsahu mRNA pro CYP1A1 v orgánech laboratorních potkanů, kterým byl podáván dihydromyricetin, byla nejprve izolována celková RNA. Jednotlivé preparáty celkové RNA byly pomocí metody reverzní transkripce, s použitím náhodných hexamerů jako primerů, převedeny na komplementární DNA, která byla následně analyzována metodou real-time PCR s využitím komerčních sond.

### 4.1 Izolace celkové RNA

Izolace celkové RNA z tkání potkanů byla prováděna pomocí činidla TRIzol® Reagent (viz. kap. 3.3.2. na str. 21). Homogenizace vzorku tkáně byla provedena pomocí kapalného dusíku v třecí misce. Výtěžek a čistota izolované RNA byl posuzován pomocí horizontální agarosové elektroforézy a spektrofotometricky.

Za použití horizontální agarosové elektroforézy (viz. kap. 3.3.3) byly na gelu viditelné dva proužky (28S a 18S) (viz Obr. 10), které byly důkazem, že nedošlo k degradaci RNA.



Obr. 10 Horizontální agarosová elektroforéza preparátů celkové RNA izolované z jater kontrolních potkanů (Jk)

Čistota izolovaných preparátů a jejich koncentrace byla určována spektrofotometricky. V absorpčním spektru se objevil velký nárůst v oblasti 260 nm, avšak bez výrazného nárůstu v oblasti 280 nm. Výsledky tohoto měření jsou shrnuty v tabulce 1.

*Tab.1 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované RNA.*

			riedenie	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	čistota	c(RNA) [μg/μl]
Játra	kontrolné	JK1	80x	1,045	0,553	0,001	1,89	3,34
		JK2		0,250	0,121	-0,001	2,08	0,80
		JK3		0,396	0,200	-0,002	1,99	1,27
	dHMR	Jd1	160x	0,618	0,331	-0,002	1,87	3,97
		Jd2	80x	0,732	0,383	-0,002	1,92	2,35
		Jd3	160x	0,779	0,422	0,000	1,85	4,99
Střeva	middle dHMR	Mid1	80x	0,999	0,506	0,015	1,93	3,15
		Mid2	160x	0,664	0,351	0,008	1,86	4,20
		Mid3	80x	0,568	0,286	0,005	1,96	1,80
	distal dHMR	Did1	80x	0,363	0,167	0,002	2,16	1,16
		Did2	160x	0,587	0,252	0,005	2,30	3,72
		Did3		1,010	0,503	0,005	1,99	6,43

## 1.8 Kvantifikace získané RNA pomocí reverzní transkripce a real-time PCR

Všechny získané izolované vzorky RNA byly pomocí reverzní transkripce převedeny na cDNA a to z 1 μg původní RNA (viz kap. 3.3.5.).

Metodou „real-time“ PCR (viz. kap. 3.3.6.) byly analyzovány všechny získané vzorky nejprve z hlediska exprese β-aktinu jako referenčního genu, který je v tkáních exprimován ve stejném množství. A následně byly stejným postupem vzorky analyzovány z hlediska exprese námi sledovaného genu CYP1A1. Statistické zpracování dat je shrnuto v tabulce 2. Výsledná míra indukce je zobrazena v tabulce 3.

Tab.2 Určení míry exprese *CYP1A1* v porovnání s referenčním genem vyjádřené jako  $\Delta C_T$

orgán	vzorek	$C_T(\beta\text{-actin})$	$C_T(\text{CYP1A1})$	$\Delta C_T$
Játra	K1	20,31	32,69	12,39
	K2	19,45	30,75	11,30
	K3	18,90	31,01	12,11
	DHMR1	20,14	32,59	12,45
	DHMR2	20,98	32,26	11,55
	DHMR3	20,45	31,19	10,72
Střevo proximal	K1	21,415	31,9	10,46
	K2	20,63	31,255	10,63
	K3	21,09	31,13	10,04
	DHMR1	20,14	28,29	8,15
	DHMR2	19,68	28,37	8,69
Střevo middle	K1	24,985	35,73	10,75
	K2	18,65	29,515	10,88
	K3	20,32	30,615	10,30
	DHMR1	20,42	33,11	12,69
	DHMR2	18,03	32,125	14,10
	DHMR3	19,695	33,595	13,90
Střevo distal	K1	18,615	32,11	13,50
	K2	18,37	29,23	10,86
	K3	19,675	31,68	12,01
	DHMR1	21,85	39,75	17,90
	DHMR2	23,555	34,33	10,78
	DHMR3	18,705	32,14	13,44

Tab.3 Indukce exprese genů pro *CYP1A1* v orgánech potkanů premedikovaných dihydro-myricetinem v porovnání s potkany nepremedikovanými, zpracováno programem REST2009.

orgán	$\overline{\Delta C_T}^{(dhmr)} \pm SD$	$\overline{\Delta C_T}^{(kontrola)} \pm SD$	Míra indukce $2^{-\Delta\Delta C_T}$	Statistická významnost
Játra	11,79 ± 0,87	11,93 ± 0,62	1,10	nesignifikantní
Střevo proximal	7,87 ± 1,02	10,38 ± 0,29	5,69	P<0,01 **
Střevo middle	13,56 ± 0,89	10,59 ± 0,33	0,13	P<0,05 *
Střevo distal	14,04 ± 3,23	12,12 ± 1,383,23	0,26	nesignifikantní



## 5 Diskuze

Tato bakalářská práce navazuje na dosavadní studie týkající se studia polyfenolických látek a jejich vlivu na cytochromy P450, které vznikly v laboratořích PŘF UK, a to zejména na diplomovou práci Mrg. Elišky Babencové, ve které byl sledován vliv dihydromyricetinu na aktivitu CYP1A1 a jeho expresi metodou Western blotting. V již obhájené práci bylo zjištěno mírné zvýšení EROD aktivity CYP1A1 (taky i CYP1A2) v játrech potkanů premedikovaných dihydromyricetinem na druhou stranu nebyl zjištěn vliv dihydromyricetinu na hladinu exprese CYP1A1 ani v játrech ani v tenkém střevu potkanů vystavených dihydromyricetinu<sup>[59]</sup>.

V této bakalářské práci byl zkoumán, vliv dihydromyricetinu na expresi CYP1A1 na úrovni mRNA, a to v játrech a tenkém střevě potkanů, v orgánech, které jsou významným místem metabolismu xenobiotik. Dihydromyricetin byl potkanům podán jednorázově perorálně gaváží do žaludku, v dávce 60 mg / kg živé hmotnosti potkana. Tenké střevo je velmi dlouhým orgánem (až 90 cm) skládajícím se z dvanáctníku (duodenum), lačnicku (jejunum) a kyčelníku (ileum). Střevo proto bylo rozděleno na tři části, a to na proximální (přibližně odpovídající dvanáctníku), střední (přibližně odpovídající lačnicku) a distální (přibližně odpovídající kyčelníku). Dále se práce zabývala nejen porovnáním indukce CYP1A1 meziorgánově (játra vs. tenké střevo), ale i v rámci jednotlivých částí tenkého střeva. Ke zjištění indukce CYP1A1 byla použita metoda „real-time“ PCR.

Vlivem dihydromyricetinu nedocházelo k jakékoli statisticky významné změně exprese CYP1A1 v játrech potkanů.

V distální části střeva potkanů premedikovaných dihydromyricetinem nebyla pozorována žádná významná změna ve srovnání s kontrolními, nepremedikovanými, potkany. Ve střední části střeva (middle) byl zjištěn mírný pokles exprese CYP1A1. Naproti tomu, v části proximální byl zaznamenán statisticky významný nárůst relativní exprese CYP1A1 u potkanů premedikovaných dihydromyricetinem, a to 5.7x oproti potkanům kontrolním.

Výsledky získané tímto experimentem můžeme považovat za pozitivní z hlediska bezpečnosti dihydromyricetinu, jelikož případná indukce CYP1A1 by mohla vést k aktivaci karcinogenů.

## 6 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla úspěšně izolována celková RNA z jater a tenkého střeva potkanů kontrolních – nepremedikovaných a premedikovaných dihydromyricetinem, který byl potkanům podán jednorázově perorálně gaváží do žaludku, v dávce 60 mg / kg živé hmotnosti potkana. Následně byla tato RNA převedena do cDNA s použitím hexamerů jako náhodných primerů. Metodou „real-time“ PCR bylo kvantifikováno zastoupení mRNA pro CYP1A1 v tkáni premedikovaných potkanů ve srovnání s kontrolním genem ( $\beta$ -aktin). Na závěr byly výsledky porovnány s hodnotami získanými z tkání potkanů kontrolních nepremedikovaných. Z výsledků je patrné, že v játrech nedochází k výrazné změně exprese CYP1A1. V tenkém střevě ovšem změny zaznamenány byly, a to mírný pokles exprese v případě střední části a nárůst exprese studovaného cytochromu P450 v proximální části.

## Seznam použité literatury

- [1] Hollman P. C. H., Katan M. B., (1999), Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability.; *Food Chem. Toxicol.* 37, 937.
- [2] Le Marchand L., Murphy S. P., Hankin J. H., Wilkens L. R., Kolonel L. N., (2000), Intake of flavonoids and lung cancer.; *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 154.
- [3] Adlercreutz H., (2002), Phyto-oestrogens and cancer.; *Lancet Oncol.* 3, 364.
- [4] Slanina J., Táborská E., (2004), Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka.; *Chem. Listy* 98, 239.
- [5] Matějková Š., Gut I., (2000), Polyphenols in nutrition as protective compounds.; *Remedia*, 10, 272., citováno podle: Slanina J., Táborská E., (2004), Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka.; *Chem. Listy* 98, 239.
- [6] Tůmová L., (1995), Flavonoids in the prevention of cancer.; *Ceska Slov Farm.* 44, 18.
- [7] Skibola C. F., Smith M. T., (2000), Potential health impacts of excessive flavonoid intake.; *Free Radical Biol. Med.* 29, 375.
- [8] Zheng J., Zhou H. H., (2007), Effects of the flavonoids on cytochrome P-450 CYP1, 2E1, 3A4 and 1.; *Yao Xue Xue Bao* 45, 8.
- [9] Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W., (1996), P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature.; *Pharmacogenetics* 6, 1.
- [10] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., (1999), Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví.; *Chem. Listy* 93, 229.
- [11] Omura, T., Sato, R., (1964), The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes II. Solubilization, purification, and properties.; *J. Biol. Chem.* 239, 2379.
- [12] Spiecker M., Liao J., (2006), Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 and the risk of coronary artery disease.; *Trends Cardiovasc Med.* 6, 204.
- [13] Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W., (1996), P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature.; *Pharmacogenetics.* 6, 1.

- [14] Hasler J.A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck J.R., Farrell G., Kaminsky L.S., Spivack, S.D., Boitier E., Beaune P., (1999), Human cytochromes P450.; *Mol. Aspects Med.* 20, 1.
- [15] Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J., (2004), Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí.; *Chem. Listy* 98, 876.
- [16] <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/hemoglobin/hemoglobh.htm>, ze dne 5.3.2014
- [17] Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M., (2001), Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí.; *Chem. Listy* 95, 212.
- [18] Guengerich, F.P. (2005), v knize *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano, P.R.), str. 377.
- [19] Walsh A.A., Szklarz G.D., Scott E.E., (2013), Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism.; *J Biol Chem.* 288(18).
- [20] Lewis, D. F., Lake, B. G., George, S. G., Dickins, M., Eddershaw, P. J., Tarbit, M. H., Beresford, A. P., Goldfarb, P. S., Guengerich, F. P., (1999), Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102.; *Toxicology* 139, 53.
- [21] Goldstone, J. V., Jönsson, M. E., Behrendt, L., Woodin, B. R., Jenny, M. J., Nelson D. R., Stegeman, J. J., (2009), Cytochrome P450 1D1: A novel CYP1A-related gene that is not transcriptionally activated by PCB126 or TCDD.; *Arch. Biochem. Biophys.* 482, 7.
- [22] Safe S., (2001), Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis.; *Toxicology Letters* 120, 1-7.
- [23] Denison M. S., Nagy S.R., (2003), Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 309.
- [24] Adachi J., Mori Y., Matsui S., Takigami H., Fujino J., Kitagawa H., Miller C.A., Kato T., Saeki K., Matsuda T., (2001), Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine.; *J. Biol. Chem.* 276 (34): 31475.
- [25] Sinal C.J., Bend J.R., (1997), Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells.; *Mol. Pharmacol.* 52, 590.
- [26] Seidel S.D., Winters G.M., Rogers W.J., Ziccardi M.H., Li V., Keser B., Denison M.S., (2001), Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins.; *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 187.
- [27] Delescluse, C., Lemaire, G., de Soussa, G., Rahmani, R., (2000), Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?; *Toxicology* 153, 73.

- [28] Fukunaga B.N., Probst M.R., Reisz-Porszasz S., Hankinson O., (1995), Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor.; *J. Biol. Chem.* 270.
- [29] Burbach K.M., Poland A., Bradfield C.A., (1992), Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89.
- [30] Jones S., (2004), An overview of the basic helix-loop-helix proteins.; *Genome Biol.* 5, 226.
- [31] Ema M., Sogawa K., Watanabe N., Chujoh Y., Matsushita N., Gotoh O., Funae Y., Fujii-Kuriyama Y., (1992), cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 246.
- [32] Kumar MB., Ramadoss P., Reen RK., Vanden Heuvel JP., Perdew GH., (2001), The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity.; *J. Biol. Chem.* 276.
- [33] <http://molpharm.aspetjournals.org/content/59/3/557/F1.expansion.html>, ze dne 8.3.2014
- [34] Pollenz RS., Barbour ER., (2000), Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation.; *Mol. Cell. Biol.* 20.
- [35] Shen ES., Whitlock JP., (1992), Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor.; *J. Biol. Chem.* 267.
- [36] Nan Zhang, (2011), The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology.; *Invited review* 2, 91.
- [37] Bravo L., (1998), Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.; *Nutrition Reviews* 56.11, 317.
- [38] Harmatha J., (2005), Studium bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylypropanoidů.; *Chem. Listy* 99, 622.
- [39] Ondrejovič M., Maliar T., Polívka L., Šilár S., (2009), Polyfenoly jablk.; *Chem. Listy* 103, 394.
- [40] Ross, J.A., Kasum, C.M., (2002), Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety.; *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19.
- [41] Moon Y. J., Wang X., Marilyn E. Morris M.E., (2006), Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism.; *Toxicology in Vitro* 20, 187.

- [42] Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M., (2002), Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450.; *Chem. Biol. Interact.* 139, 1.
- [43] Hyun, T.K., Eom, S.H., Yu, C.Y., Roitsch, T., (2010), *Hovenia dulcis*--an Asian traditional herb.; *Planta Med.* 76, 943.
- [44] Xia J., Guo S., Fang T., Feng D., Zhang X., Zhang Q., Liu J., Liu B., Li M., Zhu R., (2014), Dihydromyricetin induces autophagy in HepG2 cells involved in inhibition of mTOR and regulating its upstream pathways.; *Food and Chemical Toxicology* 66, 7.
- [45] <http://www.google.com/patents/US20120053235>, ze dne 6.3.2014
- [46] Ma Y., Yang L., Chen C., Liu Y., Wang X., (2012), Characterization, stability and antioxidant activity of the inclusion complex of dihydromyricetin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin.; *Journal of food biochemistry* 36, 634.
- [47] Guo Q., Yuan J., Zeng J., He X., Li Daguang, (2012), Synthesis of dihydromyricetin-manganese (II) complex and interaction with DNA.; *Journal of molecular structure* 1027, 64.
- [48] Shen, Y., Lindemeyer, A.K., Gonzalez, C., Shao, X.M., Spigelman, I., Olsen, R.W., Liang, J., (2012), Dihydromyricetin As a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication.; *J. Neurosci.* 32, 390.
- [49] Chen S.H., Zhong G.S., Li A.L., Li S.H., Wu L.K., (2006), Influence of *Hovenia dulcis* on alcohol concentration in blood and activity of alcohol dehydrogenase (ADH) of animals after drinking., 13, 1094.
- [50] Zhang Y., Que S., Yang X., Wang B., Qiao L., Zhao Y., (2007), Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin., *Magn. Reson. Chem.* 45, 909.
- [51] Yu C., Young S., Russo V., Amsden B.G., Flynn L.E., (2013), Techniques for the isolation of high-quality RNA from cells encapsulated in chitosan hydrogels.; *Tissue Eng Part C Methods* 11, 829.
- [52] Simões A. E., Pereira D M., Amaral J. D., Nunes A. F., Gomes S. E., Rodrigues P. M., Lo A. C., D'Hooge R., Steer C.J., Thibodeau S.N., Borralho P.M., Rodrigues C.M., (2013), Efficient recovery of proteins from multiple source samples after trizol® or trizol®LS RNA extraction and long-term storage.; *BMC Genomics* 14, 1186.
- [53] TRIzol Reagent Protocol, dostupné na [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf), ze dne 28.3.2014
- [54] Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y., Kim Y.H., (2012), Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments.; *J Vis Exp.* 62.

- [55] Wilfinger W.W., Mackey K., Chomczynski P. , Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.; (1997), *BioTechniques* 22, 474.
- [56] Stangegaard M., Dufva I.H., Dufva M., (2006), Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA.; *BioTechniques* 40, 649.
- [57] TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol, dostupné na [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_039284.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_039284.pdf), ze dne 27.3.2014
- [58] Wong M.L., Medrano J:F:, (2005), Real-time PCR for mRNA quantitation.; *Bio-Techniques* 39, 75.
- [59] Brabencová E., (2013), Studium interakce vybraných chemopreventivních sloučenin a potravních karcinogenů s cytochromy P450, diplomová práce PřF UK.





