

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ÚSTAV FARMAKOLOGIE



Molekulární profil vybraných enzymů biotransformace
léčiv, transportérů a transkripčních faktorů u neobéz-
ních potkaních modelů metabolického syndromu

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Jan Soukop

Studijní obor:	Lékařská Farmakologie
Vedoucí práce:	prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.

Olomouc 2026

PALACKY UNIVERSITY OLOMOUC
FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY
DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY



Molecular profile of selected drug biotransformation
enzymes, transporters and transcription factors in
non-obese rat models of metabolic syndrome

DOCTORAL THESIS

Mgr. Jan Soukop

Study programme: Medical Pharmacology
Supervisor: prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.

Olomouc 2026

Bibliografická identifikace

Jméno autora	Mgr. Jan Soukop
Název práce	Molekulární profil vybraných enzymů biotransformace léčiv, transportérů a transkripčních faktorů u neobézních potkaních modelů metabolického syndromu
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Lékařská fakulta UPOL, Ústav farmakologie
Vedoucí práce	prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2026
Klíčová slova	Metabolický syndrom, CYP, dyslipidémie, hypertenze, chronický zánět, zvířecí modely
Počet stran	137
Jazyk	Český

Tato práce byla podpořena granty IGA_LF_2021_013, IGA_LF_2022_006, IGA_LF_2023_004, IGA_LF_2024_006, IGA_LF_2025_009, IGA_LF_2026_006, CZ-OPEN-SCREEN-LM2023052, EATRIS-CZ-LM2023053, a ministerstvem zdravotnictví České republiky v rámci jeho programu na podporu koncepčního rozvoje ve výzkumných organizacích IKEM, IN00023001.

Bibliographical identification

Author's name	Mgr. Jan Soukop
Title of the thesis	Molecular profile of selected drug biotransformation enzymes, transporters and transcription factors in non-obese rat models of metabolic syndrome
Type of the thesis	Doctoral thesis
Department	Faculty of Medicine and Dentistry UPOL, Department of Pharmacology
Supervisor	prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.
The year of presentation	2026
Keywords	Metabolic Syndrome, CYP, dyslipidaemia, hypertension, chronic inflammation, animal models
Number of pages	137
Language	Czech

This thesis was supported by grants IGA_LF_2021_013, IGA_LF_2022_006, IGA_LF_2023_004, IGA_LF_2024_006, IGA_LF_2025_009, IGA_LF_2026_006, CZ-OPENSREEN-LM2023052, EATRIS-CZ-LM2023053 and by the Ministry of Health of the Czech Republic as part of its programme to support conceptual development among research organisations IKEM, IN00023001.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracoval samostatně a je původním autorským dílem. Veškerá literatura a zdroje, ze kterých bylo pro tuto práci čerpáno, jsou řádně citovány a uvedeny v seznamu literatury.

V Olomouci dne
(podpis)

Beru na vědomí, že tato doktorská práce je majetkem Univerzity Palackého v Olomouci (autorský zákon č. 121/2000 Sb., § 60 odst. 1) a bez jejího souhlasu nesmí být z práce nic publikováno. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne
(podpis)

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval všem, kteří mě během doktorského studia podpořili a přispěli ke vzniku této práce. Děkuji vedoucímu práce, prof. MUDr. Rostislavu Večeřovi, Ph.D., za profesionální a zároveň přátelské vedení, a přednostovi ústavu, doc. MUDr. Karlu Urbánkovi, Ph.D., za poskytnutí výborných podmínek pro práci. Mé poděkování patří panu prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc., PharmDr. Martinu Porubovi, Ph.D., a kolegyním Mgr. Zuzaně Rácové, Ph.D. a Mgr. Ivetě Zapletalové za cenné rady a pomoc v začátcích mé laboratorní praxe. Speciální dík patří RNDr. Vendule Kubíčkové, Ph.D., se kterou jsme laboratoř sdíleli prakticky celou dobu mého studia a která mi byla skvělou kolegyní a oporou. Chtěl bych také vyjádřit svůj vděk kolegyním z pražského pracoviště IKEM v čele s RNDr. Hanou Malínskou, Ph.D., za vynikající spolupráci a odborné konzultace. Vzpomínka a poděkování *in memoriam* patří také paní Ing. Ludmile Kazdové, CSc., za její laskavost, čas a nezastupitelnou pomoc při sepisování mých prvních publikací. Závěrem bych rád poděkoval své rodině a blízkým za trpělivost, pochopení a podporu především ve chvílích, kdy práce nepostupovala přesně podle plánu.

Seznam zkratk

ABC	ATP-binding cassette
ABCB1 (P-gp)	P-glykoprotein
ABCG5, ABCG8	Transportéry sterolů
ABPM	Ambulantní monitoring krevního tlaku
ACE	Angiotensin konvertující enzym
ACN	Acetonitril
AhR	Aryl hydrokarbonový receptor
AKT/PKB	Proteinkináza B
ALT	Alaninaminotransferáza
AMPK	Adenosin monofosfát aktivovaná proteinkináza
ApoC-III	Apolipoprotein C-III
ApoE	Apolipoprotein E
AST	Aspartátaminotransferáza
ATP	Adenosintrifosfát
BCA	Kyselina bicinchoninová
BSA	Bovinní sérový albumin
CAR (<i>Nr1i3</i>)	Konstitutivní androstanový receptor
CD36	Translokáza mastných kyselin CD36
cDNA	Komplementární DNA
CE	Kolizní energie
CETP	Cholesterol-ester transfer protein
CNS	Centrální nervová soustava
CoA	Koenzym A
COMT	Katechol-O-methyltransferáza
CRP	C-reaktivní protein
Ct	Prahový cyklus (Cycle threshold)
CYB ₅	Cytochrom b ₅
CYP	Cytochrom P450
CYPOR	NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktáza
DM (T2DM)	Diabetes mellitus (2. typu)
ECMO	Extrakorporální membránová oxygenace
EETs	Epoxyeikosatrienové kyseliny

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endoteliální syntáza oxidu dusnatého
ESC	Evropská kardiologická společnost
ESI	Ionizace elektrosprejem
FABP	Protein vázající mastné kyseliny (Fatty acid-binding protein)
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FAS	Syntáza mastných kyselin
FATP	Protein transportující mastné kyseliny
FF	Fenofibrát
FFA	Kyselina fenofibrová
FMN	Flavin mononukleotid
FPE	First-pass effect (efekt prvního průchodu játry)
FXR	Farnesoidní X receptor
GIT	Gastrointestinální trakt
GLP-1	Glukagon-like peptide-1
GLUT4	Glukózový transportér 4
GST/GSTA1	Glutathion-S-transferáza (isoforma alfa 1)
hCRP	Lidský C-reaktivní protein
HDL	High-density lipoprotein
HDL-C	Cholesterol v HDL frakci
HHTg	Hereditárně hypertriglyceridemický potkan
HL	Jaterní lipáza
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
Hprt1	Hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferáza 1
hsCRP	Vysoce citlivý CRP
IDL	Intermediate-density lipoprotein
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IR	Inzulinová rezistence
IRS	Substrát inzulinového receptoru
IS	Interní standard
KT	Krevní tlak
KVO	Kardiovaskulární onemocnění

LC	Kapalinová chromatografie
LCFA	Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	LC-MS s tandemovou detekcí
LDL	Low-density lipoprotein
LDL-C	Cholesterol v LDL frakci
LMS	Lean metabolic Syndrome (neobézní metabolický syndrom)
LOQ	Limit kvantifikace
LPL	Lipoproteinová lipáza
Luciferin-ME EGE	Methylether-ethylenglykolether luciferinu
LXR	Jaterní X receptor
m/z	Poměr hmotnosti a náboje iontu
MASLD	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease
MetS	Metabolický syndrom
MF	Mobilní fáze
MRM	Monitorování vybraných reakcí (Multiple reaction monitoring)
mRNA	Mediátorová (messenger) RNA
NADH	Nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Nikotinamidadeninukleotid fosfát (redukovaná forma)
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
NASH	Nealkoholická steatohepatitida
NO	Oxid dusnatý
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1 transportér
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OVX (W-OVX)	Ovariectomizovaná samice (Wistar-OVX)
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PBS	Fosfátový pufr s chloridem sodným, pH 7,4
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor α
PPRE	PPAR response element
PVDF membrána	Polyvinylidendifluoridová membrána
PXR (<i>Nr1i2</i>)	Pregnanový X receptor

RAAS	Renin-angiotenzin-aldosteronový systém
RNA	Ribonukleová kyselina
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RT-(q)PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RXR	Retinoid X receptor
SAM	S-adenosylmethionin
sdLDL	Malé denzní LDL částice
SDS-PAGE	Sodno-dodecylsulfátová polyakrylamidová elektroforéza
SEM	Standard error of the mean (směrodatná chyba průměru)
SHAM (W-SHAM)	Simulovaně operovaná samice (Wistar-SHAM)
SHR	Spontánně hypertenzní potkan
SHR-CRP	Transgenní SHR exprimující lidský CRP
SIM	Sledování vybraných iontů (Selected ion monitoring)
SLM	Silymarin
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein-1c
SULT	Sulfotransferáza
TAG	Triacylglyceroly (triglyceridy)
TBS	Tris pufr s chloridem sodným, pH 7,4
TDM	Terapeutické monitorování léčiv
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Sorbitan-monolaurát polyethylenglykolu
UGT	UGT-glykosyltransferáza
UV	Ultrafialové záření
VLDL	Very low-density lipoprotein
WHO	Světová zdravotnická organizace

Obsah

1. Úvod.....	16
2. Cíle práce	18
3. Teoretická část disertační práce	19
3.1. Metabolický syndrom	19
3.2. Inzulinová rezistence.....	20
3.3. Hypertenze	21
3.3.1. Léčba hypertenze	22
3.4. Dyslipidémie	22
3.4.1. Patofyziologie dyslipidémie v kontextu metabolického syndromu	23
3.4.2. Využití fibrátů v léčbě dyslipidemie.....	24
3.4.2.1. Fenofibrát	24
3.4.2.1.1. Analytické stanovení fenofibrátu a jeho metabolitů.....	26
3.5. Chronický zánět a oxidační stres jako patofyziologické komponenty metabolického syndromu	26
3.5.1. Doplnková terapie metabolického syndromu rostlinnými produkty.....	27
3.5.1.1. Silymarin.....	28
3.6. Metabolismus látek	29
3.6.1. Cytochrom P450	31
3.6.1.1. Struktura a funkce CYP	32
3.6.1.2. Distribuce cytochromu P450 v tkáních.....	35
3.6.2. Játra a gastrointestinální trakt jako klíčová metabolická centra.....	35
3.6.2.1. Faktory ovlivňující expresi a aktivitu cytochromu P450	36
3.6.2.2. Porovnání vlastností forem CYP u člověka a potkana.....	37
3.6.3. Druhá fáze biotransformace	38
3.6.3.1. Glykosyltransferázy	39
3.6.3.2. Sulfotransferázy	40
3.6.3.3. Katechol-O-methyltransferáza	41
3.6.3.4. Glutathion-S-transferáza	42
3.6.4. ABC Transportéry	43
3.6.5. Transkripční faktory.....	44

3.7. Zvířecí modely metabolického syndromu.....	44
3.7.1. Potkan Wistar	45
3.7.2. Potkaní model hereditární hypertriglyceridémie.....	45
3.7.3. Potkan SHR.....	46
3.7.4. Potkan SHR-CRP	46
3.7.5. Potkaní model menopauzou indukovaného metabolického syndromu	47
4. Experimentální část disertační práce	49
4.1. Zvířata a design experimentů	49
4.1.1. Experimentální zvířata	49
4.1.2. Design experimentů	50
4.1.3. Porovnání genové exprese vybraných enzymů, transportérů a transkripčních faktorů v játrech a tenkém střevě potkaních modelů metabolického syndromu.....	50
4.1.4. Analýza relativního množství proteinu vybraných enzymů v játrech potkaních modelů metabolického syndromu	50
4.1.5. Analýza relativní enzymové aktivity vybraných forem cytochromu P450 v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg, SHR a SHR-CRP.....	51
4.1.6. Zavedení LC-MS metody pro stanovení kyseliny fenofibrové v jaterním homogenátu potkanů HHTg.....	51
4.2. Materiál a přístrojové vybavení	51
4.2.1. Přístrojové vybavení	51
4.2.2. Kity.....	52
4.2.3. Primery.....	53
4.2.4. Chemikálie	54
4.2.5. Příslušenství	55
4.2.6. Software	55
4.3. Metody	55
4.3.1. Odběr potkaních orgánů.....	55
4.3.2. Biochemická analýza	56

4.3.3. Izolace, kvantifikace mRNA a syntéza cDNA.....	56
4.3.4. Stanovení exprese genů na úrovni mRNA	56
4.3.5. Izolace potkaních mikrozomů z jaterní a střevní tkáně.....	57
4.3.6. Stanovení proteinu	57
4.3.7. Kvantifikace proteinu metodou SDS-PAGE a Western Blot.....	58
4.3.8. Stanovení koncentrace CYP v jaterních mikrozomech.....	59
4.3.9. Stanovení aktivity vybraných forem CYP v jaterních mikrozomech	59
4.3.10. Zavedení metody stanovení kyseliny fenofibrové pomocí LC-MS	60
4.3.10.5. Kalibrace a validace metody	61
4.4. Statistická analýza.....	62
5. Výsledky	62
5.1. Metabolická charakterizace potkaních modelů.....	62
5.2. Rozdíly v genové expresi vybraných enzymů CYP v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR.....	64
5.2.1. Proteinová exprese vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR.....	65
5.3. Vliv lidského C-reaktivního proteinu na genovou expresi CYP mRNA u potkanů SHR.....	66
5.3.1. Proteinová exprese vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkanů SHR a SHR-CRP	67
5.4. Vliv ovariektomie na genovou expresi vybraných forem CYP v jaterní tkáni samic Wistar	68
5.4.1. Vliv ovariektomie na množství proteinu vybraných forem CYP v jaterní tkáni samic Wistar.....	69
5.5. Rozdíly v aktivitě enzymů CYP1A2, CYP2C, CYP2D1 a CYP3A v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR	70
5.6. Rozdíly v expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR	72

5.7. Vliv lidského C-reaktivního proteinu na genovou expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů u potkana SHR.....	73
5.8. Vliv ovariectomie na genovou expresi vybraných transportérů a transkripčních faktorů v jaterní tkáni potkaních samic Wistar	74
5.9. Rozdíly v genové expresi vybraných enzymů druhé fáze v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR	75
5.10. Vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi enzymů druhé fáze v jaterní tkáni potkanů SHR	76
5.11. Vliv ovariectomie na genovou expresi enzymů druhé fáze v jaterní tkáni potkaních samic Wistar	78
5.12. Rozdíly v expresi mRNA vybraných forem CYP v tkáních tenkého střeva mezi kmeny Wistar, HHTg a SHR	79
5.13. Vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi CYP v tkáních tenkého střeva potkana SHR	80
5.14. Vliv ovariectomie na genovou expresi CYP v tkáních tenkého střeva.....	81
5.15. Rozdíly v expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů v tkáních tenkého střeva.....	82
5.16. Vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi mRNA transportérů a transkripčních faktorů v tkáních tenkého střeva potkana SHR	83
5.17. Vliv ovariectomie na genovou expresi vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů	84
5.18. Rozdíly v expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkanů Wistar, HHTg a SHR	85
5.19. Vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi mRNA enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkana SHR	86
5.20. Vliv ovariectomie na expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkana Wistar	89
5.21. Vliv suplementace silymarinem na jaterní distribuci kyseliny fenofibrové u potkanů HHTg.....	90
6. Diskuze	91

6.1. Molekulární profil proteinů zapojených do biotransformace v hypertriglyceridemickém stavu	92
6.2. Molekulární profil proteinů zapojených do metabolismu léčiv ve stavu hypertenze	99
6.3. Molekulární profil proteinů zapojených do biotransformace ve stavu chronického zánětu	102
6.4. Molekulární profil proteinů zapojených do biotransformace v postmenopauzálním stavu	104
6.5. Vliv suplementace silymarinem na jaterní distribuci kyseliny fenofibrové u potkanů HHTg.....	107
6.6. Limitace práce	108
7. Závěr.....	109
8. Souhrn	110
9. Summary.....	111
10. Seznam publikací, které jsou součástí této disertační práce	112
10.1. Původní vědecké publikace v časopise s IF	112
10.2. Přehledové vědecké publikace	113
10.3. Abstrakta a příspěvky na konferencích	113
10.4. Práce nesouvisející s disertační prací	113
11. Seznam literatury	114

1. Úvod

Metabolický syndrom (MetS) představuje soubor vzájemně se doplňujících rizikových faktorů zahrnujících inzulinovou rezistenci, dyslipidemii, hypertenzi a abdominální obezitu, které společně zvyšují riziko kardiovaskulárních onemocnění a rozvoje diabetu 2. typu. Prevalence MetS se v globálním měřítku pohybuje v desítkách procent dospělé populace, přičemž její výskyt je spojen se změnami životního stylu a demografickými faktory. Zároveň je dnes zřejmé, že metabolický syndrom může postihnout i neobézní jedince (tzv. lean MetS), což dále komplikuje diagnostiku a léčbu tohoto onemocnění.

Patofyziologické mechanismy MetS jsou multifaktoriální a zahrnují poruchy inzulinové signalizace, změny lipidového a energetického metabolismu, chronický nízkostupňový (tichý) zánět a narušenou redoxní homeostázu. Tyto procesy vedou k širokému spektru molekulárních a buněčných změn v cílových tkáních, zejména v játrech a gastrointestinálním traktu, které hrají klíčovou roli v absorpci, distribuci, biotransformaci a exkreci cizorodých látek (xenobiotik), např. farmak, i endogenních látek. Pochopení těchto změn je zásadní pro preklinické modelování farmakoterapie a pro predikci farmakokinetických konsekvencí léčby u pacientů s MetS.

Katalytickými centry procesu biotransformace jsou enzymy první fáze, zejména isoformy cytochromu P450 (CYP), a enzymy druhé fáze (UGT, SULT, GST, COMT apod.), spolu s membránovými transportéry z rodiny ABC. Regulace exprese a aktivity těchto proteinů je řízena komplexní sítí jaderných receptorů a transkripčních faktorů (např. PPAR α , PXR, CAR, AhR), které reagují na endogenní signály, dietní složky i farmaka. Změny v expresi těchto enzymů a transportérů mohou významně ovlivnit farmakokinetiku léčiv, včetně fenofibrátu, a tím i jejich účinnost a bezpečnost v kontextu MetS.

Fenofibrát a jeho aktivní metabolit kyselina fenofibrová jsou klinicky používané fibráty určené k léčbě hypertriglyceridémie. Jejich účinek je zprostředkován aktivací PPAR α , čímž dochází k modulaci lipidového metabolismu i exprese genů zapojených do biotransformace cizorodých i endogenních látek. Silymarin, komplex flavonolignanů z ostropestřce mariánského, je v experimentálním i klinickém výzkumu zkoumán pro své hepatoprotektivní, antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Potenciální farmakokinetické interakce mezi fenofibrátem, silymarinem a změněným metabolickým prostředím MetS jsou dosud nedostatečně prozkoumány a představují důležitou oblast preklinického výzkumu.

Zvířecí modely metabolického syndromu (např. HHTg, SHR, SHR-CRP, ovariektomizované samice Wistar) poskytují možnost detailního zkoumání molekulárních změn v regulaci enzymů a transportérů v podmínkách odpovídajících jednotlivým komponentům MetS. Srovnávací studium genové exprese, množství proteinu a enzymové aktivity v játrech a tenkém střevě mezi těmito modely a kontrolními kmeny umožňuje identifikovat modelové specifické rozdíly s přímým dopadem na interpretaci farmakologických dat a na výběr vhodných modelů pro evaluaci farmakoterapií.

Výsledky předkládané disertační práce by tak mohly přispívat k lepšímu pochopení, jak specifické fenotypy metabolického syndromu ovlivňují expresi a funkci klíčových biotransformačních systémů a jak tyto změny mohou modifikovat farmakokinetiku léčiv, zejména fenofibrátu, včetně možného vlivu silymarinu při kombinované terapii.

2. Cíle práce

Cílem předkládané disertační práce je charakterizovat a porovnat expresní profil vybraných enzymů biotransformace, transportérů a transkripčních faktorů v játrech a tenkém střevě u vybraných neobézních potkaních modelů metabolického syndromu a posoudit, jak se tyto modely liší od kontrolních zvířat z hlediska molekulárních determinant metabolismu xenobiotik.

Práce byla zaměřena na komplexní hodnocení změn na úrovni genové exprese, množství proteinu a enzymové aktivity s cílem přispět k lepšímu pochopení modelově specifických rozdílů v regulaci biotransformačních systémů, které mohou mít významný dopad na farmakokinetiku léčiv.

Konkrétní dílčí cíle práce byly následující:

- Stanovení a porovnání relativní genové exprese biotransformačních enzymů, transportérů a transkripčních faktorů v játrech a tenkém střevě neobézních potkaních modelů samců Wistar, HHTg, SHR, SHR-CRP a samic Wistar-SHAM a Wistar-OVX
- Stanovení množství relativního proteinu enzymů, transportérů a transkripčních faktorů v játrech neobézních potkaních modelů samců Wistar, HHTg, SHR a SHR-CRP
- Stanovení relativní enzymové aktivity vybraných forem cytochromu P450 v játrech neobézních potkaních modelů samců Wistar, HHTg, SHR a SHR-CRP
- Zavedení LC-MS metody stanovení kyseliny fenofibrové v jaterním homogenátu. Stanovení množství kyseliny fenofibrové v jaterní tkáni potkana HHTg a porovnání při monoterapii a v kombinaci fenofibrátu se silymarinem

3. Teoretická část disertační práce

3.1. Metabolický syndrom

Metabolický syndrom (MetS), často také označovaný jako syndrom X, Reavenův syndrom, civilizační syndrom, „deadly quartet“ nebo syndrom inzulinové rezistence, je komplexním souborem patologických faktorů vyskytujících se zároveň, které mohou vést ke zrychlení vývoje kardiovaskulárních onemocnění (KVO) a také mohou mít vliv na rozvoj onkologických a psychiatrických chorob [1,2]. Poprvé byl koncept MetS představen v druhé polovině 20. století, kdy byly poprvé popisovány vztahy mezi obezitou, hypertenzí, dyslipidemií a inzulinovou rezistencí, což jsou faktory patřící mezi hlavní symptomy MetS, které zvyšují morbiditu a mortalitu tohoto syndromu [3]. Důsledkem MetS je pak významně zvýšené riziko rozvoje závažných komplikací, jako jsou ateroskleróza, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, nealkoholové ztučnění jater (NAFLD), které se nově označuje jako metabolická dysfunkce spojená se steatotickým onemocněním jater (MASLD), a chronické onemocnění ledvin [4,5].

Definicí MetS existuje několik a různé zdravotnické organizace k nim přistupují s mírnými odchylkami. Světová zdravotnická organizace (WHO) poprvé v roce 1998 vydala kritéria pro diagnostiku MetS s inzulinovou rezistencí, jakožto klíčovým faktorem, načež následovaly další výklady [6]. V současnosti je MetS nejčastěji diagnostikován dle harmonizované definice konsenzuálně přijaté v roce 2009 předními mezinárodními organizacemi, mezi něž patří například International Diabetes Federation nebo American Heart Association, a další. Podle této definice musí pacient vykazovat alespoň tři současně vyskytující se rizikové faktory (viz Tab. 1) [1].

Tab. 1. Faktory definující metabolický syndrom u dospělých jedinců [1,7].

Obvod pasu	muži: ≥ 102 cm; ženy: ≥ 88 cm specifikováno danou populací / zemí
Zvýšený krevní tlak / léčba hypertenze	$\geq 130/85$ mmHg
Triglyceridy v krvi / léčba dyslipidémie	$\geq 1,7$ mmol/l
Glykémie nalačno / léčba antidiabetiky	$\geq 5,6$ mmol/l
HDL-cholesterol	muži: $<1,03$ mmol/l; ženy: $<1,29$ mmol/l

Dle epidemiologických dat je zjevné, že prevalence metabolického syndromu v populaci celosvětově stoupá, zejména však v ekonomicky vyspělých zemích. Důvodem je spojení nezdravého životního stylu a stres [8]. Častěji je také MetS diagnostikován u dětí a adolescentů [9]. Vzrůstající trend významnosti tohoto problému veřejného zdraví podtrhuje potřebu účinných diagnostických a terapeutických strategií. Z uvedeného vyplývá, že diagnostika metabolického syndromu není striktně vázána na obezitu; může se rozvinout i u neobézních jedinců, což je stav označovaný jako Lean Metabolic Syndrome (LMS), v případě souběžného výskytu inzulinové rezistence, hypertenze a dyslipidémie [10]. Pro komplexní pochopení celého syndromu je nezbytný detailní pohled na tyto klíčové komponenty, jejich patogenezi a vzájemné interakce.

3.2. Inzulinová rezistence

Stav organismu, kde buňky kosterního svalstva, adipocyty a hepatocyty nejsou schopny efektivně reagovat na inzulin, se nazývá inzulinová rezistence (IR). Tento jev je prekurzorem hypertenze, dyslipidémie, a také metabolických poruch, jako je Diabetes Mellitus 2. typu (T2DM), či MASLD (dříve NAFLD), z čehož lze vyvodit, že IR představuje klíčový patologický znak MetS [11,12].

Mechanismus IR není zcela objasněn, existuje však několik teorií, které ho do jisté míry popisují. Mezi zásadní a nejvíce studii podložené faktory patří vliv ektopické akumulace lipidů v játrech a kosterním svalstvu, což má za následek narušení signální dráhy inzulinu, konkrétně fosforylace tyrosinových zbytků inzulinového receptoru a substrátu inzulinového receptoru IRS1/2, což vede k down-regulaci transportéru glukózy GLUT4 a sníženému vychytávání glukózy buňkami [11]. K dalším faktorům přispívajícím k IR patří chronický zánět (zejména nízkostupňový adipocytární zánět vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů), oxidační stres, mitochondriální dysfunkce, či dysbióza střevního mikrobiomu [13,14].

Inzulinová signalizace je komplexní proces projevující se inzulinovou selektivitou. Některé signalizační dráhy inzulinu tedy mohou být postiženy více než jiné. V játrech může IR primárně ovlivnit potlačení glukoneogeneze, zatímco lipogeneze zůstane relativně citlivější na inzulin. Selektivní inzulinová rezistence může vést ke zvýšené produkci glukózy v játrech a zároveň k steatóze. Takový faktor významně přispívá k rozvoji hypertenze a dyslipidémie [11].

Dalším důsledkem IR je kompenzační hyperinzulinémie, při které dochází k nadměrné sekreci inzulinu v pankreatu. Dlouhodobě zvýšená sekrece tohoto hormonu pak vede k rozvoji T2DM, hypertenze způsobenou zvýšenou retencí sodných iontů v ledvinách a aktivaci sympatiku, a v důsledku zvýšené syntézy VLDL v játrech i k dyslipidemii [11,15].

3.3. Hypertenze

Hypertenze je závažným onemocněním a důležitým faktorem MetS. V současnosti je definována, dle Evropské kardiologické společnosti (ESC), jako chronické zvýšení krevního tlaku. Při ambulantním měření KT jsou za hypertenzi považovány hodnoty nad 140/90 mmHg, ale definice a klasifikace se liší v závislosti na metodě měření (ambulantní, domácí, 24 h monitoring), jak je detailněji uvedeno v Tab. 2 [16]. Dlouhodobé zvýšení krevního tlaku zvyšuje riziko vážných zdravotních komplikací, zejména srdečního selhání, cévní mozkové příhody, ischemické choroby srdeční, či selhání ledvin [16].

Patofyziologie hypertenze je multifaktoriální a zahrnuje komplexní interakce mezi genetickými predispozicemi a faktory životního stylu. Mezi hlavní mechanismy patří dlouhodobě zvýšená aktivita renin-angiotenzin-aldosteronového systému (RAAS), zvýšená aktivita sympatiku, endoteliální dysfunkce, remodelace cév a poruchy regulace objemu tekutin [16].

Hypertenze se dělí na primární (esenciální), u které není zjevná příčina, a sekundární, kdy je zvýšení krevního tlaku důsledkem jiné choroby, např. onemocnění ledvin [16]. Dle nejnovějších doporučení Evropské kardiologické společnosti z roku 2024 již není krevní tlak rozdělován do tradičních stupňů závažnosti, ale je kategorizován jako normální, zvýšený nebo odpovídající hodnotám hypertenze, viz Tab. 2 [16]. Často se však lze setkat s rozdělením do 3 stupňů hypertenze, jak bylo uváděno v doporučeních z roku 2018 [16,17].

Tab. 2. Klasifikace krevního tlaku dle typu měření, podle doporučení Evropské kardiologické společnosti 2024 pro management hypertenze [16].

Kategorie	KT v ordinaci	KT doma	Denní ABPM	24 h ABPM	ABPM v noci
Normotenze	<120/70	<120/70	<120/70	<115/65	<110/60
Zvýšený KT	<140/90	<135/85	<135/85	<130/80	<120/70
Hypertenze	≥140/90	≥135/85	≥135/85	≥135/85	≥120/70

Seznam zkratk: KT – krevní tlak, ABPM – ambulantní monitorování krevního tlaku.

3.3.1. Léčba hypertenze

Terapie hypertenze, stejně jako u ostatních faktorů MetS, je založena primárně na změně životosprávy, která zahrnuje různá dietní opatření (např. omezení příjmu soli), zvýšení fyzické aktivity, redukci tělesné hmotnosti, či omezení alkoholu [16]. Při nedostatečném snížení krevního tlaku nebo u pacientů s vysokým kardiovaskulárním rizikem následuje farmakoterapie.

Farmakologická léčba hypertenze využívá několik hlavních skupin léků. První volbou jsou většinou inhibitory RAAS, jako jsou inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE inhibitory) nebo blokátory angiotenzinových receptorů (sartany). Dále bývají uplatňována diuretika, blokátory kalciových kanálů a beta-blokátory. Pro dosažení cílových hodnot krevního tlaku se často využívá kombinovaná terapie těmito léky [16]. Cílem léčby je snížit krevní tlak a minimalizovat tak riziko dlouhodobých komplikací hypertenze.

3.4. Dyslipidémie

Termínem dyslipidémie je označován soubor metabolických poruch, které vedou k abnormálním koncentracím lipidů a lipoproteinů v plazmě. Mezi její klíčové charakteristiky patří zvýšené hladiny triglyceridů (TAG) a/nebo nízkodenzitních lipoproteinů (LDL), či snížené množství vysokodenzitních lipoproteinů (HDL) [18]. Dysregulace poměru lipoproteinů může nastat vlivem genetických predispozic a označuje se, podobně jako u hypertenze, jako primární dyslipidémie, nebo vlivem nezdravých stravovacích a pohybových návyků, či v souvislosti s jiným onemocněním, kdy je označována jako sekundární [18]. Primární dyslipidémie vzniká v důsledku genetických predispozic a její rozvoj může být způsoben monogenními či polygenními faktory, s dědičností autozomální nebo

vázanou na pohlavní chromozom X [19]. Hlavními důvody vzniku primární dyslipidémie zahrnují poruchy regulace lipoproteinů, které hrají hlavní roli v přenosu lipidů v krvi [20].

Sekundární dyslipidémie je pak důsledkem jiných základních onemocnění, jako je například hypotyreóza, chronické onemocnění ledvin, či diabetes mellitus (zejména T2DM), nebo je ovlivněna faktory životního stylu, jako jsou nezdravé stravovací návyky (např. vysoký příjem nasycených tuků) a nedostatek fyzické aktivity [18–20]. Bez ohledu na etiologii představuje dyslipidémie významný rizikový faktor pro rozvoj aterosklerózy a následně KVO, včetně ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody [18–20].

3.4.1. Patofyziologie dyslipidémie v kontextu metabolického syndromu

Ve spojení s MetS je dyslipidémie často charakterizována specifickou kombinací zvýšených triglyceridů, sníženého HDL-cholesterolu a zvýšeným množstvím tzv. malých hustých LDL (sdLDL) [18–20]. Tento dyslipidemický profil je úzce spojen s IR a viscerální obezitou, jenž vedou k dysfunkci adipocytů a zvýšené lipolýze, čímž dochází ke zvýšenému přísunu volných mastných kyselin do jater a stimulaci syntézy a sekrece TAG a lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL) [12,20]. Je důležité poznamenat, že rozvoj patologií v lipidovém profilu může nastat i v případech, kdy obezita není dominantním fenotypem (LMS) [10].

V kontextu hypertriglyceridémie a IR hrají klíčovou roli ve vývoji dyslipidemického profilu sdLDL částice, které vznikají typicky při výměně lipidů mezi VLDL a LDL/HDL lipoproteiny zprostředkovanou cholesteryl-ester transfer proteinem (CETP) a následným působením jaterní lipázy (HL) na LDL částice bohaté na TAG [21]. Tyto částice jsou považovány za vysoce aterogenní, vzhledem k jejich zvýšené schopnosti pronikat do cévní stěny, vyšší náchylnosti k oxidaci a glykaci, nižší afinitě k LDL receptorům a delší době setrvání v cirkulaci. Jejich přítomnost je spojena se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem i u jedinců s normálními hladinami celkového LDL-cholesterolu [21]. Současně, důsledkem zvýšené výměny lipidů mezi výše zmíněnými částicemi, je často pokles koncentrace HDL-cholesterolu, ke kterému dochází katabolizací HDL částic bohatých na TAG [15,18,20].

Snížená aktivita lipoproteinových lipáz (LPL), které jsou klíčové pro hydrolytické štěpení TAG, následně zhoršuje clearance TAG-bohatých lipoproteinů, jako jsou chylomikrony, VLDL, a jejich remnanty, z cirkulace [19,20]. Důsledkem je zvýšené množství TAG-bohatých částic, kam jsou zahrnovány chylomikrony, VLDL, a jejich remnanty,

často označované jako lipoproteiny střední hustoty (IDL). IDL částice jsou vysoce atherogenní a přispívají k progresi aterosklerózy. Důvodem je jejich schopnost pronikat do endotelu a možnost být vychytávány makrofágy, což vede k tvorbě pěnových buněk [20].

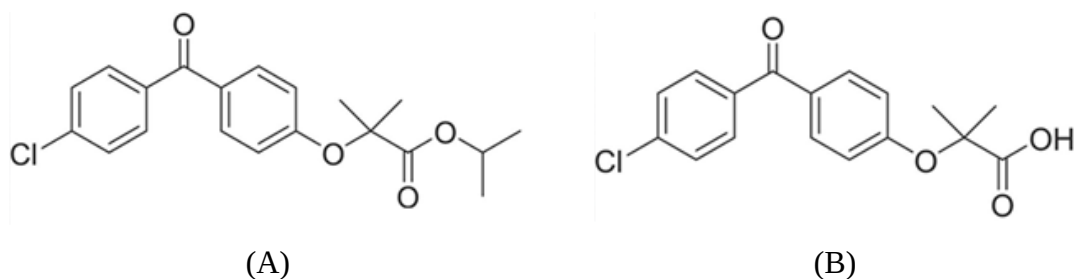
3.4.2. Využití fibrátů v léčbě dyslipidemie

Terapie dyslipidémie představuje klíčový aspekt managementu MetS s primárním cílem zlepšit hodnoty lipidového profilu a snížit kardiovaskulární riziko. Mezi současné terapeutické strategie patří, podobně jako u ostatních aspektů MetS, zejména nefarmakologické intervence zaměřené na komplexní změny životního stylu, s cílem redukce tělesné hmotnosti, úpravy stravovacích návyků, či pravidelná fyzická aktivita [20]. V případech nedostatečné odezvy na režimová opatření, nebo u pacientů s vysokým kardiovaskulárním rizikem, je zařazena farmakoterapie léčivými snižujícími množství atherogenních lipoproteinů, LDL, VLDL a chylomikronů. V některých případech jsou použita léčiva zvyšující množství HDL lipoproteinů [19,20]. Mezi často využívaná hypolipidemika patří fibráty, které jsou využívány zejména pro léčbu hypertriglyceridémie, anebo k terapii smíšené dyslipidémie v kombinaci se statiny [19,22]. Tato skupina léčiv byla poprvé zavedena do klinické praxe v druhé polovině 20. století, a proto je v dnešní době již poměrně zevrubně prozkoumána [23]. Mechanismem účinku fibrátů je aktivace jaderných receptorů aktivovaných proliferátory peroxizomů alfa ($PPAR\alpha$), čímž dochází ke změnám metabolických drah a výsledkem je zlepšení lipidogramu [23]. Aktivace $PPAR\alpha$ vede k modulaci exprese řady genů zapojených do metabolismu lipidů, především indukce syntézy LPL a snížení produkce apolipoproteinu C-III (ApoC-III), inhibitoru LPL. Dále dochází ke zvýšení syntézy apolipoproteinů A-I a A-II, které jsou klíčové při syntéze HDL. Výsledkem těchto změn je výrazné snížení TAG, částečné snížení množství LDL-cholesterolu a zvýšení množství HDL-cholesterolu [23,24].

3.4.2.1. Fenofibrát

Fenofibrát (FF), jeden z nejrozšířenějších zástupců fibrátů, je syntetický derivát kyseliny fibrové. V klinické praxi je indikován především k farmakoterapii izolované hypertriglyceridémie, smíšené dyslipidémie a případně primární hypercholesterolémie u pacientů s intolerancí statinů [25]. Molekula FF je lipofilní a lékové formy jsou podávány perorálně. Po požití je v tenkém střevě absorbován přibližně z 60 % a jeho plazmatické koncentrace (C_{max}) dosahují maxima během 4-8 hodin [25]. Pro optimalizaci vstřebávání a

zvýšení biologické dostupnosti je doporučeno podávat FF s jídlem, což významně zvyšuje jeho rozpustnost a následné vstřebání. Po absorpci je FF hydrolyzován esterázami, při čemž vzniká jeho farmakologicky aktivní metabolit, kyselina fenofibrová (FFA). Ta je pak dále přeměňována, zejména však prostřednictvím UDP-glykosyltransferáz, na její acyl- β -D-glukuronid, často označovaný jako fenofibryl-glukuronid [26]. Eliminace FFA a ostatních metabolitů probíhá převážně renální cestou, přičemž 60-88 % je vyloučeno močí a 5-25 % stolicí [27]. FFA má biologický poločas 20-23 hodin a fenofibrát 19-27 hodin u zdravých jedinců, což umožňuje dávkování jednou denně. U pacientů se sníženou renální funkcí či selháním ledvin může dojít k prodloužení poločasu až na 143 hodin, přičemž je nutná individuální úprava dávkování nebo změna farmakoterapie [27].



Obr. 1. Strukturní vzorec fenofibrátu (A) a kyseliny fenofibrové (B).

Mechanismem působení kyseliny fenofibrové je specifická aktivace $\text{PPAR}\alpha$, který se následně váže na retinoid X receptor (RXR). Výsledný heterodimer pak navázáním na specifické sekvence DNA, tzv. „PPAR response elements“ (PPRE), vyvolává modulaci transkripce a následnou změnu genové exprese projevující se indukcí exprese lipoproteinové lipázy, zvýšenou syntézou HDL lipoproteinů a sníženou produkcí apolipoproteinu C-III (ApoC-III) v jaterní tkáni [25,28]. Fenofibrát, společně s ostatními fibráty, rovněž zvyšuje oxidaci mastných kyselin indukcí mRNA Acyl-CoA syntetázy a dalších enzymů, které jsou zapojeny do transportu mastných kyselin [29].

Ačkoliv je fenofibrát obecně dobře tolerován, s jeho užíváním je spojena řada nežádoucích účinků, které mohou narušovat kvalitu života pacienta. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří bolest hlavy, gastrointestinální potíže, či kožní vyrážky. Mezi závažnější, které mohou vyžadovat úpravu dávkování či ukončení léčby, patří zvýšení množství jaterních enzymů, pankreatitida, infarkt myokardu, a jiné [25]. V kombinaci se statiny je

častý výskyt myopatie a rhabdomyolýzy, se kterou je pak spojena i dysfunkce ledvin [25]. Poruba a kol. zaznamenali ve své studii významné snížení exprese efluxního transportéru P-glykoproteinu (P-gp) v potkaním modelu MetS, což může mít vliv na biologickou dostupnost léčiv využívaných při léčbě metabolických poruch. Toto tvrzení však nelze přímo vztahovat, vzhledem k druhové rozdílnosti, na lidský organismus a k potvrzení klinické relevance je potřeba další výzkum [30].

3.4.2.1.1. Analytické stanovení fenofibrátu a jeho metabolitů

Kyselina fenofibrová, jako aktivní metabolit FF, nevyžaduje terapeutické monitorování (TDM), neboť má široký terapeutický index a její terapeutické a případné nežádoucí účinky nejsou výlučně navázány na její koncentraci v krvi. V klinické praxi se tedy pozorují zejména biochemické parametry, jako je kontrola lipidogramu, jaterních testů a renálních funkcí, což jsou vyšetření dostatečně reflektující efekt léčby a výskyt nežádoucích účinků [25].

Pro farmakologický výzkum fenofibrátu jsou hojně používané analytické metody využívající separaci analytu. Typickým příkladem je kapalinová chromatografie (LC) s UV detekcí, kterou v mnoha případech postupně nahrazuje LC s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (LC-MS), či s tandemovou detekcí (LC-MS/MS) [31,32]. Výhodou zavedení LC-MS/MS metod je vyšší selektivita a citlivost, což umožňuje kvantifikaci analytu při nízkých koncentracích. Díky způsobu detekce, tedy analýze poměru hmotnosti a náboje fragmentu (m/z), lze kvantifikovat několik analytů současně a tím dochází k úspoře času u analýzy samotné. Ve spojení se základním farmakologickým výzkumem představují LC-MS/MS metody klíčový nástroj pro komplexní pozorování distribuce farmak v biologických matricích [32].

3.5. Chronický zánět a oxidační stres jako patofyziologické komponenty metabolického syndromu

Chronický systémový zánět představuje jeden z klíčových faktorů podílejících se na vzniku metabolických onemocnění, včetně metabolického syndromu. Pro jeho rozvoj je typická zvýšená sekrece zánětlivých a prozánětlivých mediátorů produkovaných v tukové tkáni. Adipocyty při nevyváženém životním stylu, zejména při nadměrném příjmu energeticky bohatých potravin, akumulují mastné kyseliny, čímž dochází k jejich hyperplazii a hypertrofii. V důsledku modifikací tukové tkáně dochází u špatně prokrvených buněk k

hypoxii a následné nekróze. Tyto mrtvé buňky jsou následně zpracovány makrofágy adipocytární tkáně za vzniku dalších prozánětlivých cytokinů [13,33].

Jedním z nejvýznamnějších biomarkerů chronického tichého zánětu je C-reaktivní protein (CRP), akutní fázový protein produkovaný zejména v játrech, jehož plazmatické koncentrace se zvyšují v reakci na zánět, infekci, či poškození tkání [34]. Současné studie však naznačují, že CRP, coby citlivý ukazatel zánětu, se může aktivně podílet v patogenezi metabolických onemocnění a aterosklerózy [34]. Dlouhodobě zvýšené množství CRP, charakteristické pro chronický systémový zánět, přispívá, společně s výše zmíněnou akumulací mastných kyselin v adipocytech, k rozvoji oxidačního stresu, narušení buněčných funkcí a k perzistenci systémového zánětu [13,33].

Oxidační stres, při kterém dochází k narušení rovnováhy v produkci oxidantů a kapacitou endogenního antioxidačního systému [35,36], je se systémovým zánětem úzce propojen. Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), produkované například dysfunkčními mitochondriemi, narušují redoxní signalizaci a rovněž způsobují molekulární a buněčné poškození, čímž se podílí na rozvoji hyperlipidémie, hypertenze a inzulinové rezistence [36].

3.5.1. Doplnková terapie metabolického syndromu rostlinnými produkty

Zařazování funkčních potravin do stravy a užívání nutraceutik je, díky rostoucímu povědomí o vlivu životního stylu a stravování na zdraví, oblíbenou doplňkovou terapií a prevencí chronických neinfekčních onemocnění, mezi která patří i MetS [37,38]. Bioaktivní látky obsažené v těchto produktech představují zejména sekundární rostlinné metabolity, produkované rostlinami především pro jejich vlastní obranu a adaptaci vůči nepříznivým abiotickým a biotickým podmínkám, jako jsou náhlé změny klimatu nebo infekce patogeny [37]. Přes jejich primární obrannou funkci u rostlin jsou však tyto rostlinné produkty a v nich obsažené bioaktivní látky člověkem a ostatními vyššími živočichy využívány pro jejich prokazatelný pozitivní vliv na organismus [39].

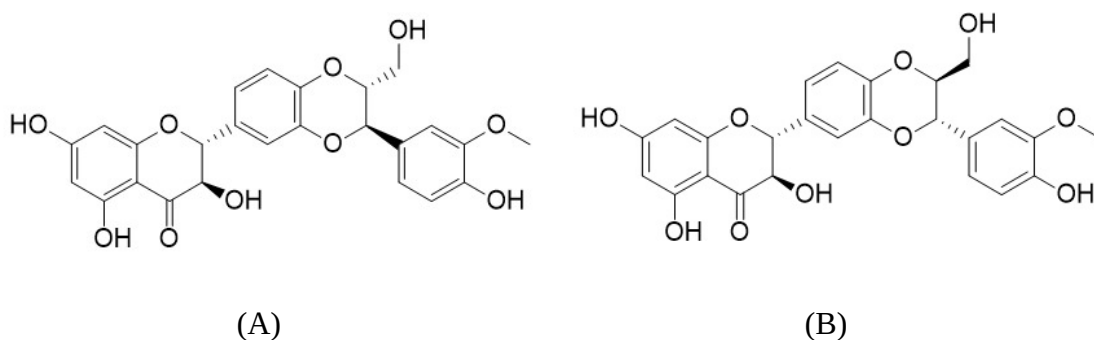
Mezi klíčové aspekty v praxi využívaných rostlinných bioaktivních látek patří jejich antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. S ohledem na multifaktoriální povahu MetS, včetně chronického zánětu a oxidačního stresu, jsou schopnosti těchto produktů obzvlášť žádoucí. Studie se rovněž zabývají vlivem doplňkové fytoterapie na regulaci lipidového metabolismu a zvýšení citlivosti na inzulin [40]. Je potřeba zdůraznit, že terapeutická efektivita těchto látek při perorálním podání bývá často limitována nízkou biologickou

dostupností a rozsáhlým first-pass efektem (FPE). Následkem je nedostatečná utilizace organismem a nízké koncentrace v cílových tkáních [41]. Řešením mohou být technologie mikronizace a vazba bioaktivních látek na koloidní nosiče, jako jsou například liposomy. Tyto přístupy jsou extenzivně zkoumány a díky jejich vlastnostem, jako je jejich vyšší volná povrchová energie a předvídatelnější profil uvolňování, mají potenciál významně zvýšit schopnost prostupu rostlinných produktů do systémové cirkulace a tím zvýšit jejich efektivní utilizaci [42].

Mezi významné skupiny rostlinných bioaktivních látek využívaných v doplňkové terapii patří flavonoidy, karotenoidy, terpeny, omega-3 polynenasycené mastné kyseliny a některé alkaloidy [37,38]. V kontextu MetS a MASLD je dlouhodobě populárním předmětem intenzivního výzkumu Silymarin.

3.5.1.1. Silymarin

Silymarin je komplexem flavonolignanů a dalších polyfenolických sloučenin extrahovaných z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum Marianum*). Hlavní bioaktivní složkou tohoto komplexu jsou diastereomery silybinu (silybin A a silybin B), který je zastoupen z cca 50–70 %. Jeho ostatní komponenty jsou isosilybin A, isosilybin B, silydianin, silychristin, isosilychristin, taxifolin, 2,3-dehydrosilybin B, a další, dosud nedostatečně prozkoumané fenolické sloučeniny, označované jako polymerní flavonoidní frakce, které rovněž přispívají k biologické aktivitě silymarinu [43,44]. S výjimkou silydianinu se tyto flavonolignany v silymarinu vyskytují v diastereomerických párech označovaných A a B v různých poměrech [44].



Obr. 2. Strukturní vzorce diastereomerů silybinu A (A) a silybinu B (B).

Jedním z hlavních mechanismů působení silymarinu je jeho schopnost stabilizovat buněčné membrány a tím přispět k inhibici lipidové peroxidace a neutralizaci ROS. Mimo jiné, tento extrakt stimuluje aktivitu antioxidačních enzymů a inhibuje expresi prozánětlivých cytokinů, jako tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α) a interleukinu- β (IL-1 β) [45]. Tyto vlastnosti řadí silymarin mezi látky s prokazatelným hepatoprotektivním účinkem a mezi nejpopulárnější přírodní látky využívané při prevenci a podpůrné léčbě jaterních onemocnění [46]. Terapeutický efekt je v klinické praxi částečně limitován relativně nízkou biologickou dostupností při perorálním podání, která souvisí zejména s nízkou absorpcí v GIT. Tato limitace je v současnosti řešena technologiemi mikronizace a syntézou fytozomálních frakcí, které významně zvyšují biologickou dostupnost silymarinu ve srovnání s klasickými extrakty [47,48].

Současný výzkum se zaměřuje nejen na hepatoprotektivní, ale také antioxidační, protizánětlivé a imunomodulační účinky silymarinu a možnost využití v onkologii [49,50]. Pozornost je věnována také jeho roli v modulaci exprese enzymů, transportních proteinů a jejich transkripčních faktorů, které jsou zapojeny do metabolismu xenobiotik a endogenních látek [51]. Tato schopnost je významná jak z pohledu ovlivnění patofyziologických procesů MetS, tak z hlediska možných interakcí s léčivý a celkovým metabolismem látek.

3.6. Metabolismus látek

Živé organismy jsou nepřetržitě vystavovány širokému spektru chemických látek pocházejících z jejich vnějšího prostředí, tzv. xenobiotika, nebo jsou produkovány endogenně. Xenobiotika (např. léky, toxiny, nutraceutika) i endogenní sloučeniny (např. hormony, žlučové kyseliny, aj.) jsou schopny ovlivňovat životaschopnost a správnou funkci organismu [52,53]. Pro udržení homeostázy a předcházení patologickým stavům je pro organismus nezbytná kontinuální eliminace a modulace biologické aktivity těchto látek. Většina zmíněných chemických sloučenin před eliminací podstupuje procesy, často označované jako biotransformace [54]. Metabolismus xenobiotik probíhá za přítomnosti různých enzymů zejména v játrech, ale do jisté míry mohou být látky přeměňovány i v ostatních tkáních, jako jsou např. ledviny, plíce, kůže, tkáň gastrointestinálního traktu (GIT) a centrální nervové soustavy (CNS) [54].

Procesy metabolismu látek lze rozdělit do dvou fází. První fáze, tzv. funkcionizace (někdy označována jako nesyntetická nebo konverzní), zahrnuje reakce, při nichž

dochází k oxidaci, redukci, anebo hydrolýze substrátu. Výsledkem je metabolit původní látky s odhalenými funkčními skupinami, čímž je zvýšena jeho polarita a je usnadněna jeho následná exkrece organismem. Druhá fáze zahrnuje enzymy katalyzované konjugální reakce, při nichž dochází k navázání endogenních funkčních skupin na substrát. S výjimkou methylace, kdy je produkt většinou méně polární a podléhá dalším reakcím druhé fáze, vzniká produkt s vyšší polaritou oproti látce původní. Reakce první fáze jsou typicky výrazně pomalejší než reakce fáze druhé, a proto jsou pro rychlost metabolismu látek často limitujícím faktorem. Metabolismus však může, v závislosti na vlastnostech metabolizované látky, probíhat buď oběma po sobě jdoucími fázemi, či pouze jednou fází [52].

Metabolismus xenobiotik je obranný mechanismus usnadňující exkreci cizorodé látky z organismu. Kromě této funkce však dochází i k přeměně a deaktivaci farmakologicky aktivních látek, nebo naopak k jejich aktivaci, u tzv. pro-drugs. Tyto reakce jsou zprostředkovávány řadou enzymů, jejichž funkce a zařazení do fází jsou shrnuty v Tab. 3 a 4.

Tab. 3. Typy reakcí funkcionalizační fáze metabolismu látek, enzymy katalyzující tyto reakce a příklady metabolizovaných substrátů [55].

Funkcionalizační fáze (Fáze I.)		
Typ reakce	Enzym	Substrát
Oxidace	cytochrom P450	metformin, statiny, warfarin, mastné kyseliny, steroidní hormony
	alkoholdehydrogenáza	ethanol
	aldehyddehydrogenáza	acetaldehyd, glutamát
	aldehydoxidáza	nikotin, trans-retinaldehydy
	xanthinoxidáza	eskuletin, allopurinol
	monoaminoxidáza	inhibitory monoaminoxidáz, serotonin, dopamin, tyramin
	diaminoxidáza	putrescin
	flavin monooxygenáza	nikotin, trimethylamin
Azoredukce	cytochrom P450 reduktáza (CYPOR)	sulfasalazin
Nitroredukce	CYPOR, nitroreduktáza	metronidazol, nitrazepam
Hydrolýza	peptidáza	inzulin, GLP-1 analoga
	esteráza	ACE inhibitory,
Hydratace	epoxidhydroláza	epoxidy mastných kyselin

3.6.1. Cytochrom P450

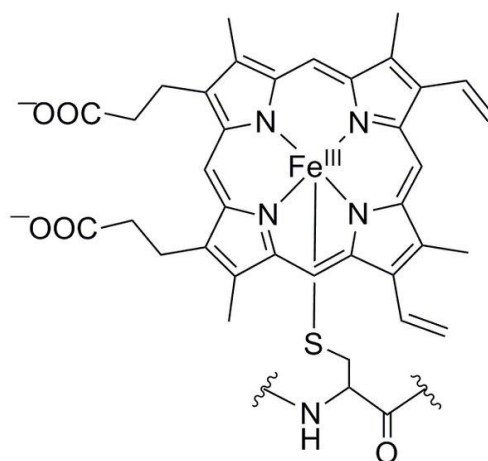
Mezi zásadní složky metabolismu endogenních látek a xenobiotik patří hemoproteiny ze superrodiny cytochromu P450 (CYP), jejichž název je odvozen z charakteristického absorpčního maxima při 450 nm (P450 znamená „pigment 450“), které je pozorovatelné při jejich vazbě s oxidem uhelnatým [56,57]. V současnosti se uvádí absorpční maximum v rozmezí 447-452 nm v závislosti na dané formě [58]. Evolučně se CYP řadí mezi poměrně konzervované enzymy, které jsou pravděpodobně staré okolo 3 miliard let [59] a vyskytují se téměř ve všech živých organismech, od bakterií a archeí až po vyšší rostliny a živočichy [60]. Lidský genom obsahuje 57 funkčních genů a 58 pseudogenů kódujících CYP, které jsou rozděleny dále do 18 rodin a 41 podrodin, kdy nomenklatura CYP

vychází z podobnosti aminokyselinových sekvencí [61,62]. V rámci rodiny musí enzymy u savců sdílet minimálně 40% shodu, v rámci podrodin pak minimálně 55% shodu aminokyselinové sekvence [61].

Enzymy CYP450 jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu buněk. Vyskytují se zejména v játrech, ale jeho formy jsou distribuovány i v dalších tkáních – tenkém střevě, ledvinách, plicích, mozku, kůži nebo srdci, kde katalyzují reakce první fáze metabolismu [56,59,60,63]. Více než polovina CYP je zapojena do metabolismu xenobiotik a endogenních látek [63]. Za klinicky nejvýznamnější rodiny CYP jsou považovány CYP1, CYP2 a především CYP3. Rodina CYP1 (např. CYP1A2 a CYP1A1) je zapojena do metabolismu polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) [64]. Rodina CYP2 zahrnuje nejvíce forem a má rozsáhlou substrátovou specifitu. Patří sem např. lidské enzymy CYP2B6, CYP2C6, CYP2C19 a CYP2D6, které jsou zodpovědné za metabolismus psychoaktivních látek a léků [65]. Rodina CYP3 je se svým lidským CYP3A4 prakticky nejvýznamnější, protože metabolizuje přibližně 30-50 % veškerých v praxi využívaných léčiv [66]. Je důležité zmínit, že enzymy CYP jsou indukovatelné ligandy (např. FF a FFA pro CYP3A4 [67]) a rovněž mají své inhibitory (např. furanokumariny obsažené v grapefruitové šťávě pro CYP3A4 [68]), což může mít zásadní dopad na farmakoterapii a lékové interakce. Počet léčiv, který je těmito enzymy metabolizován, jen podtrhuje jejich klinickou významnost [69]. Zbývající rodiny (CYP4-51 jsou převážně zapojeny do metabolismu endogenních látek, jako jsou steroidní hormony, žlučové kyseliny či prostaglandiny, ale poslední dobou se stávají předmětem studia v léčbě různých chorob, včetně kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny [70,71].

3.6.1.1. Struktura a funkce CYP

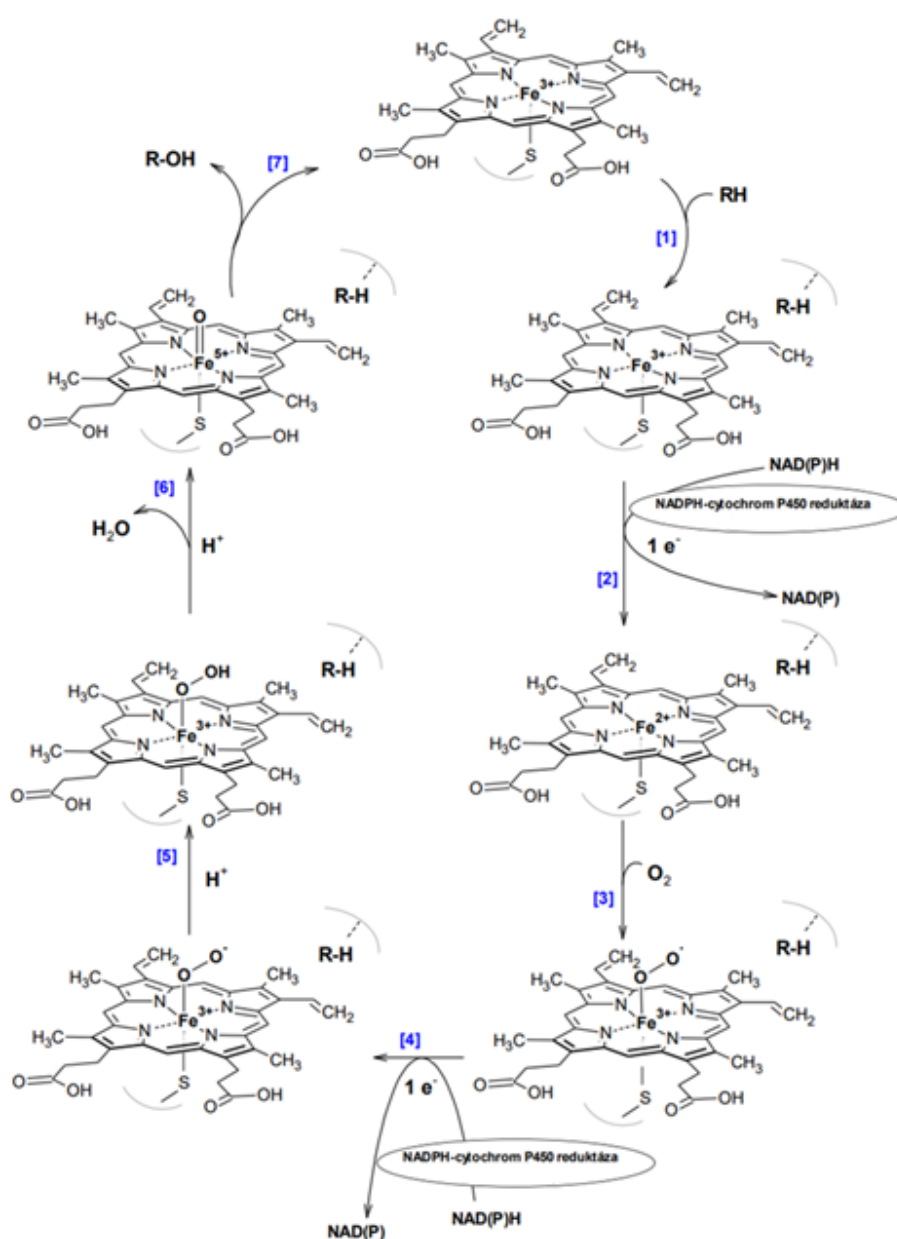
Formy CYP jsou hem-thiolátové proteiny sestaveny z 400-500 aminokyselin a mají molekulovou hmotnost přibližně 45–60 kDa [60]. V jejich struktuře je inkorporován porfyrinový kruh, hem b, obsahující centrální atom železa (v klidovém stavu typicky Fe^{3+} , ale *in vivo* se vyskytuje i Fe^{2+}) plnící funkci při elektronovém transportu a katalytických reakcích. K apoproteinu je tento hemový komplex navázán přes atom síry z cysteinového zbytku v jeho thiolátové formě, kdy je atom železa koordinován právě tímto thiolátovým ligandem [72].



Obr. 3: Strukturní vzorec hemu B navázaného na thiolátový zbytek cysteinu.

Enzymy CYP plní funkci monooxygenáz. Jejich funkcí je inkorporace atomu molekulárního kyslíku, zatímco druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Z lipofilního substrátu tak vzniká polárnější produkt, jehož exkrece je tím pro organismus usnadněna. Reakce katalyzované CYP jsou závislé na přítomnosti dalších enzymů, jako je redukováný nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) nebo nikotinamidadenindinukleotid (NADH), které slouží jako zdroje elektronů a flavoprotein NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktáza (CYPOR), přičemž některých dějů se může účastnit i cytochrom b₅ (CYB₅). Elektrony z NADPH jsou zprostředkovány CYPOR. Tento enzym obsahuje kofaktory flavin mononukleotid (FMN) a flavin adenin dinukleotid (FAD), které jsou klíčové pro transport elektronů. Katalytický cyklus využívající elektrony z těchto donorů se skládá z několika kroků. Cyklus začíná navázáním lipofilního substrátu (RH) na CYP za vzniku komplexu enzym-RH. Vazbu doprovází konformační změna proteinu a zároveň dochází ke změně spinového stavu centrálního atomu železa z nízkospinového na vysokospinový. Tato alterace zvyšuje jeho redoxní potenciál a usnadňuje jeho následnou redukci. Za účasti CYPOR, CYB₅ a donora elektronů NAD(P)H pak dochází k redukci Fe³⁺ na Fe²⁺. Železnatý kation je pak schopen reakce s tripletním molekulárním kyslíkem za vzniku komplexu Fe²⁺O₂, s jedním elektronem z redukováného atomu železa a druhý elektron z molekulárního kyslíku. Komplex má za určitých podmínek možnost disociovat zpět na Fe³⁺ a superoxidový anion, čímž dochází ke vzniku H₂O₂ a potenciálnímu vzniku ROS. Superoxidový anion navázaný na Fe³⁺ má na koncovém atomu kyslíku nepárový elektron, a kvůli této nestabilitě dochází k druhé redukci za účasti CYPOR, CYB₅ a donora elektronu NAD(P)H. Produktem této reakce je negativně nabitý železoperoxidový komplex,

který rychle podléhá protonizaci za vzniku železo-hydroperoxidového komplexu. V dalším kroku dochází k druhé protonaci, která způsobuje rozštěpení O-O vazby. Tím vzniká vysoce reaktivní komplex atomu kyslíku s Fe^{5+} a ke vzniku molekuly H_2O . Strukturu komplexu lze zapsat tak, jak je uvedeno v bodu 6, případně i ve formě kation-radikálu, kde je atom železa ve stavu Fe^{4+} . Posledním krokem cyklu je přesun atomu kyslíku z komplexu železa na RH za vzniku hydroxylovaného produktu (R-OH), jenž je oproti původnímu RH polárnější. R-OH se uvolní a atom železa v enzymu se vrátí do původního, nízkospinového stavu. Tím se CYP vrátí do nativního stavu a je schopen reakce s dalším RH [73]. Celý katalytický cyklus CYP je znázorněn na Obr. 4 [74].



Obr. 4. Schématické znázornění katalytického cyklu CYP [74].

3.6.1.2. Distribuce cytochromu P450 v tkáních

Enzymy CYP jsou nejvíce zastoupeny v membránách endoplazmatického retikula hepatocytů, kde tvoří 20–30 % mikrozomálního proteinu. Zde enzymy zajišťují klíčové reakce první fáze metabolismu látek. Ačkoliv játra představují primární centrum biotransformace, enzymy CYP se vyskytují téměř ve všech extrahepatálních tkáních, včetně tkání gastrointestinálního traktu, ledvin, plic, mozku, kůže či srdce, kde se podílejí na lokálním metabolismu xenobiotik i endogenních substrátů [75]. Studie na transgenních a knock-out myších modelech pro vybrané formy CYP ukázaly, že tkáňově specifická exprese těchto enzymů zásadně ovlivňuje systémovou i lokální expozici léčivům a přispívá k rozdílné účinnosti a toxicitě mezi jednotlivými orgány [76]. Zvláště výrazný efekt je pozorován u forem CYP3A, který je vysoce exprimován jak v játrech, tak v enterocytech tenkého střeva, kde se společně podílí na presystémové eliminaci řady perorálně podávaných léčiv [77].

Variabilita exprese CYP v různých tkáních je ovlivňována komplexem genetických, epigenetických, environmentálních a hormonálních faktorů. Rozdíly v tkáňové distribuci CYP ovlivňují celkovou biologickou dostupnost léčiv, a tím ovlivňují jejich terapeutický účinek a případné nežádoucí reakce což má v důsledku zásadní vliv na metabolismus xenobiotik a endogenních látek [78].

3.6.2. Játra a gastrointestinální trakt jako klíčová metabolická centra

Z kvantitativního hlediska představují játra nejdůležitější orgán pro metabolismus xenobiotik i endogenních látek. Hepatocyty obsahují velké množství enzymů I. a II. fáze biotransformace, což v kombinaci s anatomickým uspořádáním krevního zásobení tvoří vysoce efektivní filtrační systém. Většina látek absorbovaných z GIT je portální žilou přiváděna přímo do jater, kde podléhají tzv. efektu prvního průchodu játry (first-pass effect). Tento proces může vést k výraznému snížení biologické dostupnosti léčiv ještě předtím, než se dostanou do systémové cirkulace, což má zásadní dopad na dávkování a účinnost farmakoterapie [54,79].

Samotný gastrointestinální trakt, a zejména tenké střevo, však není pouhým místem absorpce, ale funguje jako významná presystémová metabolická bariéra. Ačkoliv je celkový obsah biotransformačních enzymů ve střevě nižší než v játrech, v enterocytech na vrcholcích střevních klků dosahují některé enzymy vysokých koncentrací [54]. U člověka i potkana dominuje v tenkém střevě rodina CYP3A, která je zodpovědná za

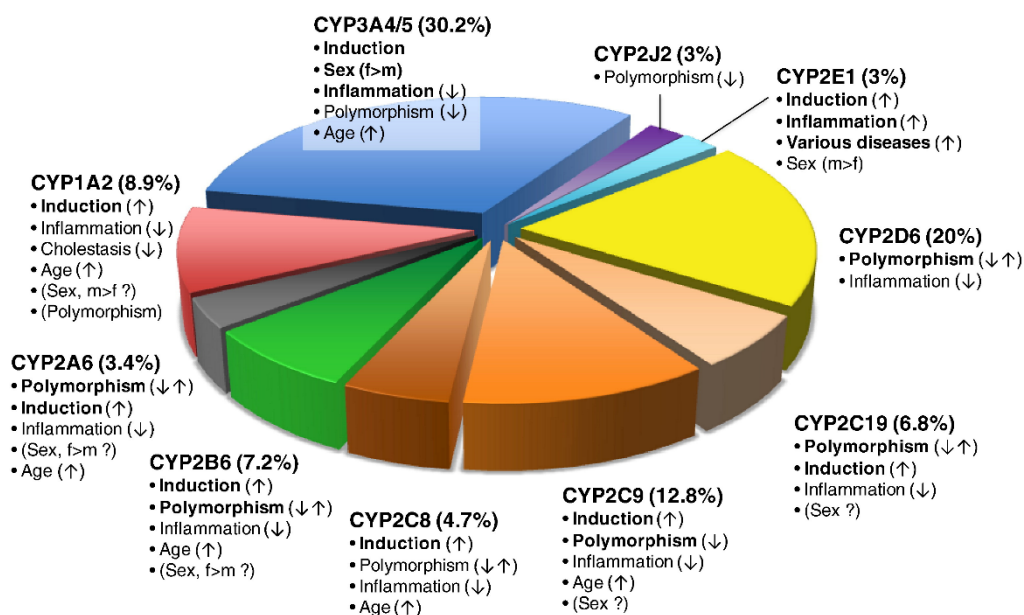
metabolismus širokého spektra klinicky užívaných léčiv [54,80]. Střevní metabolismus tak může u některých substrátů přispívat k celkovému first-pass efektu stejnou či dokonce vyšší měrou než metabolismus jaterní [81,82]. Klíčovým aspektem funkce této bariéry je úzká kooperace mezi biotransformačními enzymy (především CYP3A) a apikálními efluxními transportéry, jako je P-glykoprotein (P-gp/ABCB1) [83]. Tento mechanismus spočívá v efluxu léčiva absorbovaného enterocytem zpět do lumen střeva. Tím dochází k opakované expozici látky enzymům a k maximalizaci metabolické přeměny [83]. Změny v expresi těchto proteinů vlivem patologických stavů, jako je metabolický syndrom, nebo vlivem současně podávaných látek (např. fenofibrát, silymarin), mohou narušit tuto rovnováhu a vést k neočekávaným změnám v plazmatických hladinách léčiv [54,79,82].

3.6.2.1. Faktory ovlivňující expresi a aktivitu cytochromu P450

Expres a enzymová aktivita CYP jsou dynamicky regulovány mnoha vnitřními i vnějšími faktory, které mají zásadní význam pro biotransformaci endogenních i exogenních látek. Tyto faktory mohou zásadně regulovat množství enzymů a jejich funkční stav, což ovlivňuje farmakokinetiku léčiv, jejich toxicitu a účinnost farmakoterapie [84].

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.7.1., Enzymy CYP mohou být indukovány nebo inhibovány v reakci na různá xenobiotika či endogenní ligandy. Indukce exprese CYP je často zprostředkována transkripčními faktory, jako je například u fenofibrátu PPAR α [85,86]. Navázáním ligandu dochází ke stimulaci transkripce genů CYP. Inhibitory naopak působí přímo ve vazebném místě enzymu, čímž snižují jeho aktivitu [87].

Genetická variabilita je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících individuální expresi a aktivitu CYP. V současnosti se v rámci personalizované medicíny analyzují polymorfismy zejména CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP1A2, u kterých se tyto genetické variace vyskytují nejčastěji [84,88]. Nově se berou v úvahu i epigenetické mechanismy, které umožňují poměrně rychlou adaptační odpověď na měnící se prostředí, čímž mohou ovlivnit variabilitu exprese na úrovni transkripce [64].



Obr. 5. Schématické rozdělení hlavních forem CYP v lidských játrech a faktory ovlivňující jejich variabilitu v expresi [63].

3.6.2.2. Porovnání vlastností forem CYP u člověka a potkana

Lidský genom obsahuje 57 genů kódujících 18 rodin CYP, které jsou dále rozděleny do 41 podrodin. V současnosti literatura uvádí, že více než 35 isoenzymů je farmakologicky relevantních [89]. Ačkoliv se v literatuře často uvádí vysoká konzervativnost CYP, struktura a funkce enzymů se mezi druhy liší [90]. Tyto drobné mezidruhovité rozdíly mají dopad na preklinický výzkum a přenesení výsledků z potkana na člověka [90].

Strukturální podobnost CYP mezi člověkem a potkanem se obecně pohybuje mezi 70 % až 80 % [90].

Ačkoliv je superrodina CYP evolučně vysoce konzervovaná a základní mechanismy katalýzy jsou u savců shodné, mezi člověkem a potkanem existují významné rozdíly v expresi konkrétních forem, v jejich substrátové specifitě a v regulaci. Tyto mezidruhovité odlišnosti představují jeden z hlavních limitů při extrapolaci farmakokinetických a toxikologických dat z preklinických modelů na člověka [90].

Zatímco rodiny CYP1 a CYP2E vykazují vysokou míru homologie (např. potkaní CYP1A2 a CYP2E1 jsou funkčně i strukturně velmi podobné svým lidským protějškům), u rodin CYP2C, CYP2D a CYP3A došlo v průběhu evoluce k diverzifikaci, což vedlo ke vzniku druhově specifických forem [90].

Nejvýraznějším rozdílem mezi potkanem a člověkem je fenomén pohlavního dimorfismu. Zatímco u lidí jsou rozdíly v aktivitě CYP mezi muži a ženami spíše

kvantitativní. u potkanů je exprese některých enzymů striktně vázána na pohlaví, což je řízeno sekrečními profily růstového hormonu [91]. Typickým příkladem je podrodina CYP2C. U lidí jsou hlavními zástupci CYP2C9 a CYP2C19. Tyto enzymy metabolizují přibližně 20 % klinicky užívaných léčiv [92]. U potkanů je dominantní formou u samců CYP2C11 (funkční ortolog lidského CYP2C9/2C19), který je však u samic prakticky nepřítomný [93]. Naopak samice exprimují CYP2C12, který u samců chybí [94].

Z rodiny CYP3A je u člověka nejdůležitější formou CYP3A4. Potkani disponují formami CYP3A1 a CYP3A2. CYP3A1 je primárně indukovatelná forma, zatímco CYP3A2 je konstitutivní forma specifická pro samce [66,80,95,96]. Substrátová specifita se překrývá s lidským CYP3A4, ale není totožná (např. v rychlosti metabolismu testosteronu) [97].

Lidský polymorfní enzym CYP2D6, zodpovědný za metabolismus řady psychofarmak a beta-blokátorů, má u potkana ekvivalenty v podobě CYP2D1-CYP2D4. I zde existují rozdíly v stereoselektivitě metabolismu některých substrátů [98].

Pochopení těchto rozdílů, zejména v kontextu hormonální regulace exprese u rodiny CYP2C, je nezbytné pro správnou interpretaci experimentů využívajících potkaní modely metabolického syndromu, zvláště pokud jsou do studie zahrnuta obě pohlaví či zvířata po gonadektomii [99].

3.6.3. Druhá fáze biotransformace

Metabolismus xenobiotik nemusí být ukončen redoxními reakcemi či hydrolýzou katalyzovanou CYP, ale v mnohých případech dochází ke konjugaci molekul metabolitu s ionizovanými skupinami [100]. Druhá fáze, často nazývána jako konjugační nebo syntetická, způsobuje zvýšení hydrofility finálního metabolitu, což má za následek zjednodušení jeho exkrece z organismu [100].

Na rozdíl od první fáze, kde většinu reakcí katalyzují CYP, je v konjugační fázi zahrnuto více rodin enzymů, zejména sem patří skupina transferáz (UDP-glykosyltransferázy, sulfotransferázy, glutathion-S-transferázy, aj.) [100,101]. Tyto enzymy katalyzují aktivní přenos funkčních skupin, které zpravidla neutralizují toxicitu substrátu a zvyšují jeho hydrofilitu. Efektivita druhé fáze je zásadní pro limitaci farmakologicky aktivních nebo toxických metabolitů, přičemž variabilita v aktivitě těchto enzymů je ovlivněna jak genetickými polymorfismy, tak faktory prostředí a interakcemi s dalšími xenobiotiky

[54,100,101]. Přehled hlavních typů konjugačních reakcí, zúčastněných enzymů a substrátů je uveden v Tab. 4.

Tab. 4. Typy reakcí konjugační fáze metabolismu látek, enzymy katalyzující tyto reakce a příklady metabolizovaných substrátů [55].

Konjugační fáze (Fáze II.)		
Typ reakce	Enzym	Substrát
Glykosylace	UDP-glykosyltransferáza	kyselina fenofibrová, silibin, paracetamol, silirubin, morfin, testosteron, estradiol
Sulfatace	sulfotransferáza	bisfenol A, salicyláty, thyro- idní hormony
Konjugace s glutathionem	glutathion-S-transferáza	N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI),
Konjugace s aminokyselinou	acyl-CoA:aminokyselina N-acyl-transferáza (např. glycin-N-acyl-transferáza)	kyselina benzoová, kyselina salicylová, kyselina cholová
Acetylace	N-acetyltransferáza	aromatické aminy, isoniazid
Methylace	methyltransferáza	kofein, katecholaminy

3.6.3.1. Glykosyltransferázy

Mezi nejvýznamnější enzymy druhé fáze biotransformace patří uridin difosfát (UDP)-glykosyltransferázy (UGT), které katalyzují konjugaci glykosylových skupin (především glukuronidace) s endogenními látkami, xenobiotiky, či jejich metabolity, čímž dochází ke zvýšení jejich polarity a k usnadnění exkrece [102]. Jedná se o transmembránové glykoproteiny, které jsou ve většině případů ukotveny v membránách endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, kde, mimo biotransformace látek, dochází i k syntéze lipidových struktur [103]. Struktura UGT je definována specifickou sekvencí 44 aminokyselin zodpovědných za vazbu UDP skupiny navázané na donor glykosylové skupiny [102].

Podobně jako CYP, UGT jsou přítomné téměř ve všech živých organismech, od bakterií a hub, po vyšší rostliny a živočichy [104]. V lidském genomu bylo do dnešní doby objeveno 22 funkčních genů kódujících glykosyltransferázové enzymy, které jsou rozděleny do čtyř rodin, u člověka UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8 [101,102,104]. Většina

konjugací s UDP-glukuronovou kyselinou je katalyzována enzymy z rodin UGT1 a UGT2, přičemž rodiny UGT3 a UGT8 katalyzují, dle současné literatury, rovněž reakce, při kterých jsou přenášeny molekuly jiných sacharidů, jako je galaktóza, glukóza, a další [101,105]. Z tohoto důvodu je také v odborné literatuře postupně nahrazován původní název UGT enzymů, „UDP-glukuronosyltransferáz“, za správnější, již zmiňovaný termín „UDP-glykosyltransferázy“ [101].

Na rozdíl od CYP, enzymy UGT vykazují tzv. „substrátovou promiskuitu“, což znamená, že jeden substrát může být konjugován řadou různých UGT. Příkladem může být již zmiňovaná FFA, která je v lidském organismu substrátem pro UGT 1A1, 1A3, 1A9 a 2B7 [106], či silibin, jehož metabolismus je zprostředkován reakcemi katalyzovanými enzymy UGT1A1, 1A6, 1A7, 1A9, 2B7 a 2B15 [107].

Enzymy UGT vykazují genetický polymorfismus projevující se přítomností tzv. allozymů, které způsobují významné rozdíly v enzymové aktivitě a zvýšení variability metabolismu a clearance léčiv mezi jedinci a populacemi [108]. Za klinicky nejvýznamnější v dávkování léčiv se, na základě UGT genotypu, považuje UGT1A1. Například alela *UGT1A1**28 je spojena se zvýšenou toxicitou léků jako atazanavir, indinavir nebo irinotekan [108].

UGT představují klíčovou komponentu detoxikačních mechanismů organismu s významnými důsledky pro farmakoterapii. Znalost polymorfismů UGT je nezbytná pro optimalizaci dávkování léčiv a prevenci nežádoucích účinků, což přispívá k rozvoji personalizované medicíny [109]. V kontextu MetS mohou změny v expresi a aktivitě UGT enzymů ovlivnit farmakoterapii i regulační mechanismy endogenních substrátů, což má důsledky pro celkovou metabolickou homeostázu organismu [106,107].

3.6.3.2. Sulfotransferázy

Sulfotransferázy (SULT) jsou po UGT druhou nejvýznamnější superrodinou enzymů druhé fáze biotransformace. SULT katalyzují přenos sulfonylové skupiny (SO_3^-) z donorové molekuly, nejčastěji 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS), na hydroxylové, aminové, anebo jiné nukleofilní funkční skupiny substrátu [110]. Tímto procesem vznikají vysoce polární sulfátové konjugáty, které mohou být rychle vylučovány ledvinami či žlučí [101]. Sulfatace je pro metabolismus zásadním mechanismem k přeměně široké škály chemických látek, jako jsou fenoly, steroidy, katecholaminy, a další hydrofobní molekuly [101].

Narozdíl od transmembránových enzymů UGT jsou SULT lokalizovány volně v buněčném cytosolu. V lidském genomu bylo doposud identifikováno třináct funkčních genů kódujících SULT a pět pseudogenů. Funkční geny SULT jsou rozděleny do čtyř rodin podle primární struktury s podobností nejméně 45 % (SULT1, SULT2, SULT4 a SULT6). V rámci podrodin je pak podobnost struktury vyšší než 60 % [101].

Nejrozsáhlejší rodinou je SULT1, která obsahuje podrodiny SULT1A, SULT1B, SULT1C a SULT1E. Mezi klinicky nejvýznamnější formy patří SULT1A1, která je dominantně zastoupena v játrech. Podle současných poznatků je SULT1A1 klíčovou součástí nejen v metabolismu léčiv (např. paracetamolu), ale nejnovější studie poukazují na spojitost mezi SULT1A1 a regulací energetického metabolismu a homeostázy. V experimentální studii na myších s knock-outovaným genem *Sult1a1* bylo pozorováno, že snížení exprese nebo aktivity SULT1A1 vede ke štíhlejšímu fenotypu v důsledku sníženého množství inzulinu v plazmě nalačno a k nižšímu zanášení adipocytární tkáně. Tyto změny reflektují snížené riziko faktorů MetS [111].

Rodina SULT1A vykazuje relativně širokou substrátovou specifitu. Kromě SULT1A1, ze které vzešly ostatní formy 1A duplikací v průběhu evoluce, jsou významné i další formy [112]. SULT1A2 katalyzuje metabolické reakce polycyklických aromatických uhlovodíků či aromatických hydroxylaminů. SULT1A3, která je kódována geny *Sult1a3* a *Sult1a4*, katalyzuje sulfataci monoaminů (např. serotonin a melatonin) či katecholaminů (např. dopamin, adrenalin a noradrenalin) [112].

Regulaci exprese sulfotransferáz zprostředkovávají jaderné receptory, včetně konstitutivního androstanového receptoru (CAR) a pregnanového X receptoru (PXR) [113].

3.6.3.3. Katechol-O-methyltransferáza

Katechol-O-methyltransferáza (COMT) je enzym katalyzující přenos methylové skupiny z S-adenosylmethioninu (SAM) na hydroxylovou skupinu katecholových struktur. Tento enzym je zásadní v metabolismu katecholaminů, jako je dopamin, noradrenalin a adrenalin, katecholových estrogenů a xenobiotik s katecholovým skeletem [114,115].

Enzym existuje ve dvou hlavních formách: solubilní COMT (S-COMT), která je lokalizována v cytoplazmě a převažuje v játrech, ledvinách a dalších periferních tkáních, a membránově vázaná COMT (MB-COMT), která je přítomna v endoplazmatickém retikulu, a především v mozku, kde reguluje extracelulární koncentrace dopaminu [114]. Lidský COMT je kódován genem *Comt* a obě formy vznikají alternativním sestřihem jedné

pre-mRNA, přičemž MB-COMT je delší forma obsahující N-terminální hydrofobní sekvenci [114,116].

Z klinického hlediska je nejvýznamnější funkční polymorfismus Val158Met v kódovací sekvenci genu *Comt*, který vede k substituci valinu methioninem na pozici 158 proteinu. Tento polymorfismus snižuje termickou stabilitu enzymu a následně jeho aktivitu přibližně o 40% u homozygotů pro alelu Met, což má dopad na metabolismus katecholaminů, estrogenů a xenobiotik [116]. U nositelů alely Met je pozorována vyšší dostupnost dopaminu v prefrontální kůře mozku, což ovlivňuje kognitivní funkce, bolestivost a náchylnost k psychiatrickým poruchám [117].

V kontextu metabolického syndromu hraje COMT roli při inaktivaci katecholových estrogenů (např. 2-hydroxyestradiol), jejichž akumulace může přispívat k oxidačnímu stresu a endotelové dysfunkci [114]. Změny v expresi či aktivitě COMT rovněž mohou ovlivnit metabolismus katecholových struktur xenobiotik a endogenních látek v játrech a střevě, kde je enzym hojně exprimován [114]. Studie ukazují, že u zvířat s dyslipidemií je aktivita COMT v játrech snížena, což vede k prodloužené expozici katecholových intermediátů a potenciálnímu zhoršení oxidačního stavu.

Aktivita COMT je regulována posttranslačními modifikacemi, hladinami SAM a interakcemi s dalšími enzymy, nebo xenobiotiky, jako je inhibitor COMT entakapon, používaný v doplňkové terapii Parkinsonovy choroby k prodloužení účinků levodopy [118]. Vzhledem k lokalizaci COMT v játrech a střevě lze enzym považovat za potenciální nepřímý faktor ovlivňující expresi a aktivitu farmakokineticky významných enzymů, zejména CYP a UGT, jejichž regulace je citlivá na oxidační stres. V patologických stavech, jako je MetS, může tato nepřímá regulační vazba přispívat ke změnám farmakokinetiky léčiv [63,114].

3.6.3.4. Glutathion-S-transferáza

Glutathion-S-transferázy (GST) jsou superrodinou enzymů druhé fáze biotransformace katalyzujících konjugaci redukovaného glutathionu (GSH) s reaktivními elektrofilními centry široké škály endogenních a exogenních sloučenin [119]. Tím dochází k detoxikaci a výraznému zvýšení hydrofility výsledných produktů, což usnadňuje jejich další zpracování a exkreci žlučí či močí [120]. Tento mechanismus je klíčový zejména při neutralizaci elektrofilních látek vzniklých reakcemi první fáze biotransformace, např. metabolismem

paracetamolu a vzniku reaktivního metabolitu N-acetyl-p-benzochinoniminu (NAPQI) [120].

U savců se GST dělí do tří hlavních rodin podle jejich intracelulární lokalizace: cytosolické, mitochondriální a mikrozomální, přičemž každá z nich zahrnuje další třídy a formy s odlišnou substrátovou specifitou a tkáňovou distribucí [121]. Obsahem experimentální části této disertační práce byla analýza genu GST alfa 1 (*Gsta1*), který je jednou z hlavních jaterních forem cytosolické rodiny a významně se podílí na konjugaci glutathionu s reaktivními produkty lipidové peroxidace a dalšími elektrofilními metabolity, čímž přispívá k ochraně jaterní tkáně před oxidačním a toxickým poškozením [122].

Expres *Gsta1* je regulována na transkripční úrovni prostřednictvím redox-senzitivních jaderných receptorů, zejména Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), jenž je aktivován při zvýšené produkci ROS a elektrofilů [123]. V kontextu MetS lze očekávat změny v expresi a aktivitě GSTA1 jako odpověď na změny redoxního stavu a oxidační stres, což jsou faktory pro tuto patologii typické [123]. Aktivita různých forem GST může být snížena, což negativně ovlivňuje obranyschopnost vůči toxickým metabolitům [123].

3.6.4. ABC Transportéry

Metabolismus látek ovlivňuje v těle řada dalších mechanismů. Do jednoho podstatného, v souvislosti s efektivitou léčiv, patří přenašeče, konkrétně tzv. ATP-binding cassette (ABC) transportéry. Tyto transmembránové proteiny využívají energii z hydrolýzy ATP k přenosu látek typicky proti koncentračnímu gradientu [124,125]. Studium aktivního transportu bylo započato v 70. letech 20. století a v roce 1976 byl identifikován první z řady transportérů, P-glykoprotein (P-gp), kódovaný genem *Abcb1*, u nějž byl pozorován extenzivní eflux chemoterapeutik z nádorových buněk, čímž přispíval k lékové rezistenci [125,126].

V kontextu farmakologie a MetS jsou ABC transportéry zásadní v ovlivňování absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece léčiv (ADME), ale neméně důležitou funkci plní i v případě udržování lipidové homeostázy. Transportéry ABCA1 a heterodimerní ABCG5 s ABCG8 zajišťují transport cholesterolu z enterocytů a hepatocytů, čímž snižují absorpci sterolů a podporují jejich exkreci [127].

Regulace ABC transportérů je řízena komplexním mechanismem zahrnujícím jaderné receptory, například jaterním X receptorem (LXR) a retinoid X receptorem (RXR),

jejichž aktivací dochází k indukci exprese genů pro ABC transportéry a tím k vyššímu výdeji cholesterolu. U pacientů s MetS je často aktivita ABC transportérů snížena, což přispívá ke zhoršení lipidové homeostázy a také k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění a aterosklerózy. Mutace v genech *ABCG5* nebo *ABCG8* způsobují sitosterolemii, která je charakterizována abnormální akumulací rostlinných sterolů v organismu a předčasným rozvojem aterosklerózy [128].

3.6.5. Transkripční faktory

K zajištění regulace exprese enzymů zapojených do biotransformace jsou klíčovým prvkem transkripční faktory. V metabolismu léčiv plní transkripční faktory funkci receptorů, které zajišťují adaptivní odpověď tkání na přítomnost farmak, toxinů, či hormonů [129]. Aktivita těchto faktorů je tedy zásadní nejen pro metabolismus xenobiotik, ale také pro zajišťování homeostázy a prevenci jejich dysregulací, které jsou pro MetS typické [130].

Mezi nejvýznamnější transkripční faktory v regulaci biotransformace xenobiotik patří tzv. jaderné receptory, zejména Aryl Hydrokarbonový receptor (AhR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), pregnanový X receptor (PXR, kódovaný genem *Nr1i2*) a receptor alfa aktivovaný peroxizomovým proliferátorem (PPAR α) [131]. Tyto jaderné receptory jsou aktivovány odlišnými ligandy a řídí odlišná spektra genů. AhR je klíčovým v detekci polycyklických aromatických uhlovodíků a jeho aktivace vede k indukci exprese enzymů CYP1A, ale do jisté míry je zapojen i do regulace enzymů druhé fáze, např. různých forem UGT [132]. CAR a PXR jsou jaderné receptory širokého spektra léčiv a steroidních látek, které po navázání ligandu stimulují transkripci genů CYP3A, CYP2B6, UGT, SULT, a také ABC transportérů, jako je již výše zmíněný ABCB1. PPAR α , již zmiňovaný v kapitole 3.4.2., je spjatý s metabolismem lipidů a ovlivňuje expresi CYP a UGT, což je pro farmakoterapii fibráty zásadní [133].

3.7. Zvířecí modely metabolického syndromu

Zvířecí modely jsou v současnosti stále nedílnou součástí studia patofyziologických stavů a terapeutických přístupů k léčbě MetS. Ačkoliv se využití pokročilých *in vitro* metod a simulace pomocí výpočetní techniky zvyšuje, zejména v kontextu přísné regulace etickými a legislativními normami, živé modelové organismy poskytují nenahraditelné poznatky o komplexních procesech v celém organismu, čímž umožňují simulovat multifaktoriální povahu MetS [134].

Modely založené na laboratorních hlodavcích jsou často poměrně dobře charakterizované, geneticky definované a umožňují experimentální manipulace v kontrolovaných podmínkách, což je zásadní pro pochopení vzájemných interakcí mezi genetickými, environmentálními a metabolickými faktory. Dále jsou důležité pro hodnocení účinků farmakoterapií a dalších intervenčních postupů, které by bylo obtížné nebo neetické přímo zkoušet u lidí. Nicméně etické požadavky kladou důraz na omezení počtu zvířat ve výzkumu a maximální minimalizaci jejich utrpení, proto je nezbytné pečlivě zvažovat volbu a použití vhodného modelu s ohledem na přínos pro vědecké poznání a možné klinické aplikace [134].

3.7.1. Potkan Wistar

Potkan Wistar je outbrední kmen s bohatou historií sahající až k začátku 20. století a patří, společně se Sprague Dawley, mezi nejpopulárnější potkaní kmeny, a díky jejich versatilitě a dobře dokumentovaným charakteristikám, je tento kmen využíván v mnoha odvětvích výzkumu [135]. Kmen Wistar byl vyšlechtěn ve spojených státech společností Wistar Institute a jedná se o první model standardizovaný pro využití v buněčné biologii a klinickém výzkumu [136]. Jedinci jsou albíni s robustní středně velkou stavbou těla [137]. Ačkoliv jsou potkani Wistar označováni jako outbrední kmen, komerčně dostupné populace vykazují v důsledku genetického driftu a selekce v dlouhodobém chovu různé míry genetické homogenity, což může mít za následek vznik komplikací v reprodukovatelnosti studií [138]. Ve výzkumu MetS je kmen Wistar však často využíván jako referenční skupina, neboť mladí dospělí jedinci nevykazují spontánní patologické projevy MetS, pokud nejsou cíleně indukovány [139].

3.7.2. Potkaní model hereditární hypertriglyceridémie

Hereditárně hypertriglyceridemický potkan (HHTg) představuje vhodný zvířecí model pro studium geneticky podmíněné hyperlipidémie. Tento kmen byl vyvinut v Praze pod vedením Dr. Antonína Vrány jako model hypertriglyceridémie prostřednictvím inbreedingu potkanů Wistar a následnou selekcí jedinců vykazujících hypertriglyceridemii vyvolanou dietou o vysokém obsahu cukrů [140,141]. Během selekčního procesu byly vybírány tři páry s nejvyšší triglyceridemií, které byly posléze kříženy metodou bratr × sestra [140–142]. V 15. generaci potkanů HHTg již bylo naměřeno více než čtyřnásobně více triglyceridů v plazmě oproti kontrole, přičemž zvýšené množství bylo zapříčiněno

primárně jejich nadprodukcí než poruchou clearance [142]. Hypertriglyceridémie, zvýšený krevní tlak, snížená glukózová tolerance, hyperinzulinémie a s ní spojená inzulinová rezistence jsou faktory, které z HHTg dělají vhodný model pro studium metabolického syndromu [141]. Jedná se o neobézní model a tělesná hmotnost je často nižší než u jedinců Wistar stejného věku [141].

3.7.3. Potkan SHR

Spontánně hypertenzní potkan (SHR) patří mezi nejčteněji využívané zvířecí modely pro studium hypertenze. Za jeho vznikem stojí autoři Okamoto a Aoki, kteří měli zacíleno na vytvoření modelu pro výzkum esenciální hypertenze. Potkan SHR byl vyšlechtěn z outbrední kolonie potkanů Wistar-Kyoto selekcí jedinců s vysokým krevním tlakem [143] a následným inbreedingem a kontinuální selekcí jedinců se spontánní hypertenzí. Podobně jako u lidí trpících primární hypertenzí, zvýšený krevní tlak u SHR doprovází další faktory zvyšující riziko vzniku KVO [144]. Hypertenze se u potkanů SHR začíná vyvíjet brzy po narození a ustáleného stavu dosahuje přibližně ve stáří 60 dnů [145]. Mechanismus rozvoje hypertenze je u tohoto modelu geneticky podmíněný, příkladem může být delece v genu *Cd36* [144], což má za následek produkci zmutovaného proteinu CD36, a další faktory. Jedinci prokazují hypertrofii levé srdeční komory, zvýšený cévní odpor spojený s endoteliální dysfunkcí a zhoršenou funkcí ledvin zapříčiňující zvýšenou aktivitu osy renin-angiotensin-aldosteron (RAAS) [146,147]. Přestože jsou potkani SHR řazeni mezi neobézní, často je u nich pozorován rozvoj inzulinové rezistence a dyslipidémie, což z nich činí vhodný model pro studium MetS [148,149].

3.7.4. Potkan SHR-CRP

Transgenní model SHR-CRP vychází z výše zmíněného kmene SHR. Pomocí mikroinjekcí byl do oplodněných vajíček vysoce inbredních potkanů SHR vpraven konstrukt obsahující cDNA lidského C-reaktivního proteinu (hCRP) pod kontrolou apoE promotoru, což má za následek expresi hCRP v játrech [150,151]. Funkce endogenního, potkaního, CRP je rozdílná oproti transgennímu hCRP. Zatímco potkaní CRP se podílí na reakci akutní fáze s relativně omezenou schopností aktivace komplementu a vzniku zánětů, hCRP vykazuje vyšší biologickou aktivitu, prozánětlivé účinky a má výraznější vliv na patofyziologii MetS. V transgenním modelu SHR-CRP vede hCRP ke snížení aktivity syntázy oxidu dusnatého v endotelových buňkách (eNOS), což má za následek snížení

dostupnosti oxidu dusnatého (NO). hCRP má schopnost aktivovat NADPH oxidázu a tím způsobit zvýšení množství reaktivních forem kyslíku (ROS), které rovněž mohou zapříčínovat úbytek NO v buňkách endotelu [150]. Nedostatek NO, klíčového mediátoru cévní dilatace a funkce endotelu, způsobuje zvýšení krevního tlaku o 10-15 mmHg vůči potkanům SHR. Další faktory, jako hyperinzulinémie, zvýšená triglyceridémie, zvýšené množství interleukinu 6 (IL-6), snížené množství adiponektinu, a další prozánětlivé mediátory, dále podtrhují zánětlivý fenotyp a metabolické dysfunkce, které jsou typické pro tento transgenní model. Výrazné prozánětlivé a metabolické účinky hCRP v tomto modelu potvrzují jeho roli nejen jako biomarkeru zánětu, ale i jako aktivního faktoru v patogenezi komponent MetS, což odlišuje funkci hCRP od potkaního [150].

3.7.5. Potkaní model menopauzou indukovaného metabolického syndromu

Ovariectomie (OVX) je metodou simulace menopauzou indukovaného metabolického syndromu, kdy je provedeno chirurgické odstranění vaječníků. Tento postup, při kterém dochází k náhlému poklesu množství ženských pohlavních hormonů, zejména estrogenu, simuluje stav menopauzy u člověka. Narušení hormonální homeostázy vede k významným změnám inzulinové signalizace a metabolismu lipidů, včetně distribuce tělesného tuku [152]. V rámci hormonální dysbalance dochází k rozvoji řady patologických procesů, které výrazně zvyšují riziko rozvoje MetS, přičemž v modelu OVX bývají pozorovány typické projevy jako inzulinová rezistence, dyslipidémie, zvýšení krevního tlaku a přibývání na hmotnosti [153].

Nedostatek estrogenu narušuje inzulinovou signalizaci prostřednictvím snížené fosforylace inzulinoreceptorového substrátu-1 (IRS-1) na jeho tyrosinových reziduích a současným zvýšením inhibiční fosforylace na serinových reziduích [154]. Dysregulace vede k poklesu aktivity protein kinázy B (AKT/PKB) a následně k rozvoji inzulinové rezistence [155,156]. Tato patologie je navíc synergicky ovlivňována zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů, zejména TNF- α a IL-6 [157,158].

Estrogen v homeostatickém stavu reguluje energetický metabolismus pomocí adenosin monofosfát aktivované proteinkinázy (AMPK), jejíž aktivita je v průběhu menopauzy snižována. Následkem je porucha oxidace mastných kyselin a zvýšená lipogeneze [159]. Na úrovni transkripce pak dochází k upregulaci lipogenních genů, zejména sterol regulačního elementu vázacího proteinu-1c (SREBP-1c), syntázy mastných kyselin (FAS) a k downregulaci PPAR α [159,160].

Molekulární změny způsobené menopauzou, případně ovariectomií, se navzájem ovlivňují a dohromady charakterizují menopauzou indukovaný MetS [153]. Experimentální modely OVX jsou proto široce využívány pro testování terapeutických intervencí zaměřených na modulaci estrogenové signalizace, zánětlivých procesů a metabolických drah u postmenopauzálních žen [160]. V experimentálním designu jsou OVX samice obvykle porovnávány s kontrolními skupinami s prodělanou simulovanou operací (SHAM), což umožňuje izolovat vedlejší účinky hormonálního deficitu způsobené stresem z chirurgického zákroku. Model tak poskytuje důležité poznatky pro vývoj terapeutických strategií zaměřených na prevenci a léčbu komplikací MetS v postmenopauzálním období [160].

4. Experimentální část disertační práce

4.1. Zvířata a design experimentů

4.1.1. Experimentální zvířata

V rámci této disertační práce bylo pracováno se samci potkanů kmene Wistar ($n = 5$, získáni od společnosti AnLab, Praha, ČR) a několika kmeny neobézních potkaních modelů metabolického syndromu. Z Institutu pro klinickou a experimentální medicínu (IKEM, Praha, ČR) byli poskytnuti samci potkanů HHTg (kontrolní skupina, $n = 6$) a dále dvě skupiny samců HHTg určené pro sledování jaterní distribuce kyseliny fenofibrové: skupina s podáváním fenofibrátu ($n = 5$) a skupina s kombinovaným podáváním fenofibrátu a silymarinu ($n = 5$). Z IKEM byly rovněž získány samice potkanů kmene Wistar. Samci hypertenzních kmenů SHR ($n = 5$) a transgenních SHR-CRP ($n = 6-7$) byli získáni z Fyziologického ústavu Akademie věd ČR (Praha, Česká republika). Kmen SHR-CRP byl odvozen mikroinjekcí konstruktů obsahujícího cDNA pro lidský CRP pod kontrolou promotoru ApoE potkanům SHR [161].

Ve věku 8 týdnů byly samice potkanů Wistar anestetizovány intraperitoneálně podaným ketaminem (70 mg/kg) a xylazinem (10 mg/kg) a poté bilaterálně ovariektomovány středovou incizí (skupina W-OVX, $n = 5$). Simulovaně operovaná zvířata podstoupila celou operaci s výjimkou odstranění vaječníků (skupina W-SHAM, $n = 5$). Zvířata byla po celou dobu zákroku saturována kyslíkem, následovala subkutánní analgezie (meloxicam 1 mg/kg tělesné hmotnosti). Zdravotní stav zvířat byl po operaci sledován.

Zvířata byla po dovozu minimálně 2 týdny aklimatizována. Následně byla chována za standardních laboratorních podmínek (cyklus 12 hodin světlo / 12 hodin tma při laboratorní teplotě 22-25 °C) a krmena standardní laboratorní dietou s přístupem k vodě ad libitum. Zvířata ve studii zaměřené na sledování bazálního molekulárního profilu byla udržována v experimentu po dobu 4-6 měsíců a v době utracení dosahovala věku 7-9 měsíců. Zvířatům ve studii distribuce fenofibrátu bylo zahájeno podávání látek ve věku 4 měsíců, podávání probíhalo 4 týdny a zvířata byla utracena ve věku 5 měsíců. Ukončení studií bylo provedeno usmrcením všech zvířat v celkové anestezii (Zoletil 5 mg/kg tělesné hmotnosti) v postprandiálním stavu dekapitací. Odebrané orgány byly promyty fyziologickým roztokem. Části tkání byly přeneseny do stabilizačního roztoku RNAlater (Invitrogen, Litva) a lyzačního a extrakčního pufru RIPA (Santa Cruz, USA) a poté uloženy při teplotě -80 °C pro další analýzy. Veškeré experimenty na zvířatech byly provedeny v

souladu se zákonem České republiky 501/2020 o ochraně zvířat, který se řídí doporučeními Rady Evropské unie 86/609/ES pro používání laboratorních zvířat. Všechny postupy zahrnující laboratorní zvířata byly schváleny etickou komisí Ministerstva zdravotnictví České republiky.

4.1.2. Design experimentů

Odebraný biologický materiál byl využit pro sérii analytických experimentů, která probíhala ve dvou fázích. Úvodní etapa zahrnovala analýzu změn na úrovni transkripce, translace a enzymové aktivity. V navazujícím kroku byly zaznamenány změny distribuce kyseliny fenofibrové v jaterní tkáni při kombinaci podávání fenofibrátu se silymarinem.

4.1.3. Porovnání genové exprese vybraných enzymů, transportérů a transkripčních faktorů v játrech a tenkém střevě potkaních modelů metabolického syndromu

Záměr první části experimentu spočíval ve stanovení bazální exprese mRNA vybraných forem CYP, enzymů druhé fáze, transkripčních faktorů a transportérů v tkáních jater a tenkého střeva. Analýza probíhala ve všech výše popsáných experimentálních kmenech (HHTg, SHR, SHR-CRP, W-OVX). Jako kontrolní skupiny pro statistické porovnání sloužili intaktní samci kmene Wistar a simulovaně operované samice kmene W-SHAM, v případě transgenního kmene SHR-CRP proběhlo porovnání vůči kmenu SHR. Detailní popis izolace mRNA, syntézy cDNA a RT-qPCR je uveden v kapitolách 4.3.3. a 4.3.4.

4.1.4. Analýza relativního množství proteinu vybraných enzymů v játrech potkaních modelů metabolického syndromu

Tato analýza byla provedena za účelem posouzení míry korelace mezi daty získanými na úrovni genové exprese a reálným množstvím proteinu. Sledování probíhalo v jaterní tkáni u experimentálních kmenů HHTg, SHR, SHR-CRP a W-OVX vůči příslušným kontrolním skupinám Wistar a W-SHAM. Analýza byla realizována pomocí SDS-PAGE a Western blotu v izolovaných jaterních mikrozomech s využitím poolovaných vzorků, což umožnilo identifikovat trendové změny v proteinovém profilu jednotlivých modelů. Pozorování množství proteinu v tkáních tenkého střeva nebylo v rámci této práce realizováno vzhledem k technickým limitacím souvisejícím s nízkým výtěžkem mikrozomální frakce.

4.1.5. Analýza relativní enzymové aktivity vybraných forem cytochromu P450 v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg, SHR a SHR-CRP

Třetí část první fáze byla zaměřena na funkční zhodnocení biotransformačního systému prostřednictvím měření katalytické aktivity klíčových forem cytochromu P450. Sledována byla aktivita forem rodin CYP1A, CYP2C, CYP2D a CYP3A. Analýza byla provedena v jaterních mikrozomech samčích kmenů Wistar, HHTg, SHR a SHR-CRP. Použité metody jsou uvedeny v kapitolách 4.3.6. a 4.3.9. Stanovení enzymové aktivity v mikrozomech izolovaných z tenkého střeva nebylo realizováno vzhledem k nedostatečnému výtěžku mikrozomální frakce.

4.1.6. Zavedení LC-MS metody pro stanovení kyseliny fenofibrové v jaterním homogenátu potkanů HHTg

Pro posouzení vlivu silymarinu na jaterní distribuci a eflux kyseliny fenofibrové byla zavedena a validována specifická LC-MS metoda pro její kvantifikaci. Vzhledem k tomu, že silymarin působí jako inhibitor P-gp [162], byla provedena analýza jaterních homogenátů ze zvířat kmene HHTg po čtyřtýdenním podávání samotného fenofibrátu (25 mg/kg) a v kombinaci se silymarinem (1 % v dietě). Cílem tohoto uspořádání bylo zjistit, zda toto kombinované podávání nevede v důsledku inhibice P-gp ke změnám v tkáňové distribuci a ke sníženému efluxu tohoto aktivního metabolitu v jaterní tkáni. Podrobný popis chromatografického systému, přípravy vzorků, validačních parametrů a způsobu kvantifikace je uveden v kapitolách 4.3.10 a 4.3.10.5.

4.2. Materiál a přístrojové vybavení

4.2.1. Přístrojové vybavení

- Třepačka OS-10 (Biosan, Lotyšsko)
- Analytická váha XP205 Delta Range (Mettler Toledo, USA)
- Chlazená centrifuga Z323K (Hermle LaborTechnik, Německo)
- Chlazená centrifuga BR4i (Jouan, Francie)
- Centrifuga Centrifuge 5804R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga Multi-spin (Biosan, Lotyšsko)
- Ultracentrifuga Optima XPN-90 (Beckman Coulter, USA)

- DNA/RNA UV-cleaner box, UVC/T-AR (Biosan, Lotyšsko)
- Homogenizátor Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA)
- Kapalinový manipulátor Echo 550 (Labcyte, USA)
- Termocykler Epgradient S (Eppendorf, Německo)
- Termocykler LightCycler 1536 Instrument (Roche Praha, ČR)
- Laminární box biohazard (Merci, ČR)
- pH metr (Mettler Toledo, USA)
- Spektrofotometr NanoPhotometer® N60 (Implen, Německo)
- Spektrofotometr INFINITE M200 (TECAN, Rakousko)
- Spektrofotometr Varian Cary UV VIS 4000 (Varian, Austrálie)
- Vortex IKA MS3 Basic (Sigma-Aldrich, Německo)
- Vodní lázeň WB 14 (Memmert, Německo)
- Magnetická míchačka MR 1000 (Heidolph, Německo)
- Inkubátor DRY BATH INCUBATOR (Major Science, USA)
- Aparatury Miniprotean II a Mini Trans-Blot Cell (Bio-rad Laboratories, USA)
- Zdroj napětí PowerPac™ HC 250 V, 3.0 A, 300 W (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Trans Blot Turbo (Bio-rad Laboratories, USA)
- Třepačka Sunflower mini shaker PS-3D (P-lab a.s., Česká republika)
- Temná komora s ccd kamerou G:BOX (Syngene, Velká Británie)
- Blokový termostat Stuart SBH200D/3 (Cole-Parmer, Velká Británie)
- Koncentrátor vzorků Stuart SBHCONC/1 (Cole-Parmer, Velká Británie)
- HPLC Shimadzu LC-20A Prominence (Shimadzu, Japonsko)
- Hmotnostní spektrometr LCMS-8045 (Shimadzu, Japonsko)
- Generátor dusíku Genius 1051 (Peak Scientific, Velká Británie)
- Vývěva Edwards 28 s olejovým filtrem EMF 20 (Edwards, Velká Británie)

4.2.2. Kity

- Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA)
- QIAshredder (Qiagen, USA)
- EvoScript Universal cDNA Master (Roche, Německo)
- LightCycler® 1536 DNA Probes Master (Roche, Německo)
- Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, USA)

- BCA Protein Assay Reagent Kit Lot. EI63659 (ThermoFischer Scientific, USA)
- Promega P450-Glo™ CYP1A2 Assay Lot. 0000663241 (Promega, USA)
- Promega P450-Glo™ CYP2C9 Assay Lot. 0000656680 (Promega, USA)
- Promega P450-Glo™ CYP2D6 Assay Lot. 0000644335 (Promega, USA)
- Promega P450-Glo™ CYP3A4 Assay Lot. 0000671368 (Promega, USA)

4.2.3. Primery

- *Cyp1a2* Lot. Rn00561082_m1
- *Cyp3a23* Lot. Rn03062228_m1
- *Cyp2d1* Lot. Rn01775090_mH
- *Cyp2c11* Lot. Rn01502203_m1
- *Cyp2c6* Lot. Rn03417171_gH
- *Cyp2e1* Lot. Rn00580624
- *Cyp7a1* Lot. Rn00564065_m1
- *Cyp2b1* Lot. Rn01457880_m1
- *Abcg5* Lot. Rn01499073_m1
- *Abcg8* Lot. Rn00590367_m1
- *Abcb1* Lot. Rn01639253_m1
- *Nr1i3* Lot. Rn04339043_m1
- *Nr1i2* Lot. Rn00583887_m1
- *Ahr* Lot. Rn00565750_m1
- *Gsta1* Lot. Rn04223027_m1
- *Comt* Lot. Rn00561037_m1
- *Ugt1a1* Lot. Rn00754947_m1
- *Ugt2b7* Lot. Rn00821928_m1
- *Ugt1a6* Lot. Rn00561171_m1
- *Ugt1a9* Lot. Rn06299012_g1
- *Ugt1a8* Lot. Rn01764956_m1
- *Ugt2b2* Lot. Rn02349652_m1
- *Sult1a1* Lot. Rn01510633_m1
- *Sult1b1* Lot. Rn00673872_m1
- *Sult1e1* Lot. Rn00820646_g1

- *Sult2a1* Lot. Rn06220013_m1
- *Hprt1* Lot. Rn01527840_m1

4.2.4. Chemikálie

- Deionizovaná voda
- RNase free voda (Qiagen, USA)
- RIPA Lysis Buffer System VIAL 1 (Santa Cruz, USA)
- RIPA Lysis Buffer System VIAL 2 (Santa Cruz, USA)
- Tris Base Solution (TBS) (Santa Cruz, USA)
- Tris Base Solution + Tween (TBS+T) (Santa Cruz, USA)
- 2-merkптоethanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner, Česká republika)
- Dodecylsíran sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dithioničitan sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycerol (TAMDA, Česká republika)
- RNAlater (Invitrogen, Litva)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Německo)
- Protease inhibitor cocktail tablety (Roche, Německo)
- 99,8% ethanol pro UV spektroskopii
- Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (Bio-Rad laboratories, USA)
- Acetonitril LC-MS grade (VWR, Česká republika)
- Methanol LC-MS grade (VWR, Česká republika)
- ≥99% Kyselina mravenčí LC-MS grade (VWR International, Česká republika)
- ≥99,8% Kyselina octová LC-MS grade (VWR International, Česká republika)
- Voda LC-MS grade (VWR International, Česká republika)
- Referenční standard kyseliny fenofibrové (Merck, Německo), Id: 00Tdd3
- Referenční standard bezafibrátu (Merck, Německo), Id: 002xsZ
- Mikronizovaný fenofibrát Fenofix® (Teva Pharmaceuticals, Česká republika)
- Mikronizovaný silymarin (Favea, Česká republika)
- Oxid uhelnatý (Linde Gas, Německo)
- Dusík (Siad, Itálie)
- Nikotinamidadenindinukleotid (Merck, Německo)

- Isocitrátdehydrogenáza (Merck, Německo)
- Hydrát DL-isocitrátu trisodného (Merck, Německo)

4.2.5. Příslušenství

- Mikrozkušavky Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Kónické zkumavky 12 ml a 50 ml VWR® (VWR International, ČR)
- Špičky Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Polykarbonátové ultracentrifugační zkumavky (Beckman Coulter, USA)
- Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Bílé 96jamkové mikrotitrační destičky (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Transparentní 96jamkové mikrotitrační destičky (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Plastové LC-MS vialky s insertem (VWR International, ČR)
- Analytická kolona Luna Omega C18(2) (Phenomenex, USA)
- Předkolony SecurityGuard C18 4 mm × 2 mm (Phenomenex, USA)

4.2.6. Software

Při měření, vyhodnocování a sepisování disertační práce byly použity následující softwarové programy: Microsoft 365: Word, Excel (Microsoft, Praha, Česká republika), LC Solution ver. 5.93 (Shimadzu, Japonsko), ACD/ChemSketch (ACD/Labs, Kanada) a Statistica (DataBon, Praha, ČR, verze 14.0.0.15).

4.3. Metody

4.3.1. Odběr potkaních orgánů

Enzymy, které byly předmětem studia této disertační práce, jsou exprimovány především v játrech, v nižším množství se však nacházejí i v ostatních tkáních. Vzhledem ke způsobu podání léčiv při léčbě metabolického syndromu, tedy *per os*, byly tkáně tenkého střeva, společně s játry, vybrány jako vhodné orgány pro sledování změn v expresi enzymů zapojených do metabolismu xenobiotik.

Zvířata byla usmrcena podle schválených etických postupů, načež jejich orgány byly odebrány. Pro zajištění stability vzorků pro následné analýzy byla játra důkladně

opláchnuta ve vychlazeném fyziologickém roztoku a rozdělena na několik částí. Tenké střevo bylo očištěno ve vychlazeném fyziologickém roztoku s rozpuštěnými tabletami obsahujícími směs inhibitorů proteáz (cOmplete, Roche). Kvůli nerovnoměrné distribuci enzymů ve střevní tkáni byla provedena homogenizace vzorku. Po jejím provedení byla část odebrána pro analýzu genové exprese, zbytek suspenze byl použit pro extrakci mikrozomálních frakcí. Homogenáty byly uskladněny při -80 °C pro další analýzy.

4.3.2. Biochemická analýza

Množství TAG, HDL, glukózy, ALT, AST a celkového a HDL cholesterolu v séru bylo měřeno pomocí komerčně dostupných kitů (Erba Lachema, Brno, Česká republika a Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Analýza potkaního a lidského CRP v séru byla provedena imunochemické metody ELISA (Alpha Diagnostics International, USA). Vzorky jaterní tkáně byly extrahovány ve směsi chloroformu a methanolu pro určení množství TAG a cholesterolu. Výsledná peleta byla rozpuštěna v isopropylalkoholu, načež obsah TAG byl stanoven enzymatickou metodou (Erba Lachema, Česká republika).

4.3.3. Izolace, kvantifikace mRNA a syntéza cDNA

K izolaci mRNA bylo použito přibližně 30-50 mg homogenátu. Proces izolace byl proveden s využitím kitu Rneasy Plus Mini (Qiagen, USA) dle protokolu výrobce. Čistota a koncentrace mRNA byla posléze změřena pomocí spektrofotometru NanoPhotometer N60 (Implen, Německo). Reverzní transkripce byla provedena pomocí EvoScript Universal cDNA Master kitu (Roche, Německo), kdy bylo použito množství 1 µg mRNA. Bezprostředně po syntéze cDNA byly vzorky zamrazeny při -80 °C, aby se zabránilo denaturaci.

4.3.4. Stanovení exprese genů na úrovni mRNA

Stanovení relativní exprese mRNA v potkaních játrech a tenkém střevě bylo provedeno metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) za využití přístroje LightCycler 1536 (Roche, Švýcarsko) s kapalinovým manipulátorem Echo 550 (LabCyte, Irsko). K analýze byly využity komerčně dostupné TaqMan Gene Expression Assays sondy (Life Technologies, USA) obsahující cílové primery a oproti jiným sondám (například SYBR Green) mají vyšší specifitu a poskytují přesnější data [163]. Surová data byla zpracována pomocí software Microsoft Excel, kde byla pro výpočet

rozdílů v expresi mRNA použita metoda $\Delta\Delta\text{Ct}$ [164]. Relativní exprese genů byla normalizována vůči internímu kontrolnímu genu, hypoxanthin fosforibosyltransferáze 1 (*Hprt1*). *Hprt1* byl vybrán jako housekeeping gen na základě jeho vlastností, jako je vysoká stabilita napříč potkaními tkáněmi [165].

4.3.5. Izolace potkaních mikrozomů z jaterní a střevní tkáně

Mikrozomální frakce je souborem malých vesikul vznikajících homogenizací buněk a fragmentací jejich membrán, zejména endoplazmatického retikula. V živých tkáních se mikrozomy ze své podstaty nevyskytují a jsou z homogenátu izolovány ultracentrifugací. K sedimentaci mikrozomální frakce je potřeba dosažení vysoké odstředivé síly, přibližně až 100 000 g. Intaktní buňky a orgány, jako jsou mitochondrie nebo jádro, naopak sedimentují při nižších odstředivých silách.

Játra, která byla použita pro izolaci mikrozomální frakce, byla rozmrazena na ledu, osušena, zvážena a následně přenesena do vychlazeného homogenizačního pufru, kde byly orgány rozstříhány a následně homogenizovány pomocí homogenizátoru Precellys Evolution (Bertin Technologies, USA). Homogenizovaná suspenze byla odstředěna v centrifuze Z 323 K (Hermle labortechnik, Německo) a v ultracentrifuze Optima XPN-90 (Beckman Coulter, USA).

Vzniklá mikrozomální frakce byla pročištěna promývacím pufrem obsahujícím 0,5 mM Tris a 0,14 M KCl při pH 7,4 a následně ultracentrifugována po dobu 1 hodiny při 125000 g s teplotou nastavenou na 4 °C. Čistá mikrozomální frakce byla pak rozpipetována do alikvot a skladována při -80 °C pro další analýzy.

4.3.6. Stanovení proteinu

Obsah celkového proteinu ve vzorcích byl stanoven metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA assay) [166]. Mikrozomální suspenze i homogenáty byly 100x zředěny fosfátovým pufrem a samotná analýza probíhala na transparentních 96jamkových mikrotitračních destičkách v duplikátech. Do jamky bylo pipetováno 12,5 μl zředěného vzorku a 100 μl činidel BCA Protein Assay Reagent Kit (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Destičky se vzorky byly vloženy na 30 minut do inkubátoru při teplotě 37 °C a následně byla stanovena absorbance pomocí spektrofotometru INFINITE M200 (TECAN, Rakousko). Koncentrace proteinu byla odečítána z kalibrační křivky sestavené ze standardu bovinního sérového albuminu (BSA).

4.3.7. Kvantifikace proteinu metodou SDS-PAGE a Western Blot

Stanovení relativního množství jednotlivých proteinů mezi skupinami bylo provedeno metodou elektroforézy založené na principu separace stejnsměrným elektrickým proudem. Poolované vzorky z jaterních tkání byly zředěny 100mM roztokem fosfátového pufru (KH_2PO_4 ; pH 7,4) a takto připravený roztok byl dále smíchán se vzorkovacím pufrem (62,5 mM Tris, 10% glycerol, 4% merkaptoethanol, 2% SDS, 10% bromfenolová modř, pH 6,8). Pomocí merkaptoethanolu bylo dosaženo rozštěpení disulfidových můstků mezi proteinovými řetězci, čímž jsou narušeny terciární a kvartérní struktury proteinů, což umožňuje jejich rozbalení. Pomocí SDS dochází ke změně pH separovaných proteinů, které tak získají záporný náboj. Tím je zajištěn stejnsměrný transfer směrem ke kladné elektrodě. Bromfenolová modř pak slouží k obarvení vzorku. Takto připravený vzorek byl v případě stanovení CYP inkubován ve vodní lázni při 95 °C po dobu pěti minut, centrifugován 5 minut při 600 g a poté byl aplikován do jamek polyakrylamidového gelu (Bio-rad Laboratories, USA). Rychlost pohybu proteinů ke kladné elektrodě je závislá na jejich elektroforetické mobilitě v gelové matici, což zahrnuje velikost a stupeň denaturace daného proteinu. Rychlost lze ovlivnit také volbou optimální hustoty použitého separačního gelu. Samotná SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE) probíhala v aparatuře Miniprotean II se zdrojem Power Pac 200 (Bio-rad Laboratories, USA), kde byly gely ponořeny v running pufru složeným z 25 mM Tris, 192 mM glycinu a 0,1% SDS. Elektroforéza probíhala po dobu 10-15 minut při 110 V. Po uplynutí této doby bylo napětí navýšeno na 150-180 V, při kterém proces separace probíhal až 1,5 hodiny. Napětí bylo modulováno, aby nedošlo k překročení elektrického proudu přes 0,1 A. Zároveň se dbalo zvýšené opatrnosti a elektroforéza byla ukončena v okamžiku, kdy migrační čelo barviva dosáhlo asi 0,5 cm od dolní hrany gelu. Tím se zabránilo úniku separovaných proteinů z gelové matrice.

Po ukončení separace v gelu byly proteiny přeneseny na komerčně dostupnou polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu (Bio-rad Laboratories, USA). K přenosu byl využit přístroj Trans Blot Turbo (Bio-rad Laboratories, USA). Po dokončení přenosu byly z přístroje membrány vyjmuty, rozstříhány do požadované velikosti a následně promyty v TBS pufru. Promývání probíhalo na třepačce PS-3D (P-lab a.s., ČR).

4.3.8. Stanovení koncentrace CYP v jaterních mikrozomech

Pro stanovení koncentrace CYP byla využita spektrofotometrická metoda s dithioničtím sodným podle [167]. Přidáním této sloučeniny do mikrozomální frakce dojde k redukci hemového železa v porfyrinovém kruhu molekuly CYP. Následným probubláním plynným oxidem uhelnatým dojde k tvorbě komplexů Fe^{2+} -CO s charakteristickým absorpčním maximem při vlnové délce 450 nm. Diferenční spektra byla měřena pomocí spektrofotometru Cary UV-VIS 4000 (Varian, Austrálie). Koncentrace CYP byla vypočítána z diferenčního spektra mezi redukovanou formou CYP a CYP-CO komplexem [167]. Specifický obsah CYP byl vyjádřen jako poměr koncentrace CYP k objemu mikrozomální frakce (pmol CYP/ μl suspenze). V rámci této disertační práce byla koncentrace CYP úspěšně stanovena pouze v mikrozomální frakci získané z jaterní tkáně, neboť výtěžek z tkání tenkého střeva byl nedostatečný a v konečném důsledku neměřitelný. Z tohoto důvodu byly i následné analýzy aktivit vybraných forem CYP prováděny pouze s jaterními mikrozomy.

4.3.9. Stanovení aktivity vybraných forem CYP v jaterních mikrozomech

Katalytická aktivita vybraných forem cytochromu P450 (CYP1A, CYP2C, CYP2D a CYP3A) byla v izolovaných jaterních mikrozomech stanovena pomocí luminiscenčních kitů řady P450-Glo™ (Promega, USA). Princip metody je založen na využití specifických derivátů luciferinu jako luminogenních substrátů pro jednotlivé formy CYP.

Vlastní stanovení bylo provedeno v bílých 96jamkových mikrotitračních deskách. Reakční směs obsahovala izolované jaterní mikrozomy o stanovené koncentraci proteinu, příslušný luminogenní substrát a regenerační systém pro NADPH. Inkubace vzorků probíhala při teplotě 37 °C po dobu definovanou v optimalizovaném protokolu výrobce [168]. Enzymová reakce byla následně ukončena přidáním detekčního činidla, které současně iniciuje stabilní světelný signál. Intenzita vzniklé luminiscence, která je přímo úměrná aktivitě sledované formy CYP, byla změřena pomocí multidetekčního mikrodetektorového spektrofotometru INFINITE M200 (TECAN, Rakousko). Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako relativní procentuální změna vůči kontrolní skupině Wistar, která byla normalizována na 100 %.

4.3.10. Zavedení metody stanovení kyseliny fenofibrové pomocí LC-MS

Pro kvantitativní analýzu kyseliny fenofibrové v jaterní tkáni potkanů HHTg byla zavedena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Jako vnitřní standard (IS) byl zvolen bezafibrát, který vykazuje podobné fyzikálně-chemické vlastnosti a eluční charakteristiky. Příprava vzorků homogenátu spočívala v přímé precipitaci organickým rozpouštědlem, které zajistilo rychlou deproteinizaci a uvolnění analytu z vazby na tkáňové proteiny. K analýze bylo použito 50 μ l jaterního homogenátu ve fosfátovém pufru, ke kterému bylo přidáno 25 μ l IS rozpuštěného v ACN okyseleném kyselinou mravenčí (0,1% v/v). Precipitace byla provedena přidáním 425 μ l ACN okyseleného kyselinou mravenčí (0,1% v/v). Směs byla poté intenzivně vortexována po dobu půl minuty pro zajištění úplné denaturace proteinů a uvolnění analytů z tkáňové matrice. Zvortexované vzorky byly centrifugovány při $18407 \times g$ po dobu 10 minut v centrifuze BR4i vychlazené na 4 °C. Po centrifugaci bylo odebráno 200 μ l supernatantu, který byl přenesen do čisté skleněné zkumavky a odpařen pomocí koncentrátoru Stuart SBHCONC/1 připojeného k digitálnímu blokovému termostatu Stuart SBH200D/3. Odpařování probíhalo pod mírným proudem dusíku při konstantní teplotě 37 °C. Získaný odparek byl rekonstituován ve 100 μ l okyseleného ACN (0,1% v/v kyselina mravenčí), čímž bylo dosaženo dvojnásobného zakoncentrování vzorku.

Vlastní instrumentální analýza probíhala na kapalinovém chromatografu LC-20A Prominence (Shimadzu, Japonsko) ve spojení s hmotnostním spektrometrem LCMS-8045 (Shimadzu, Japonsko). Separace byla prováděna na koloně Luna Omega C18(2) (Phenomenex, USA) o rozměrech 100 $\times$ 2 mm i.d., s velikostí částic 3 μ m. Analýza probíhala za isokratických podmínek při průtoku 0,4 ml/min. Mobilní fáze sestávala ze směsi ACN a vody, obojí s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí (v/v), v objemovém poměru 80:20. Detekce probíhala s využitím ionizace elektrosprejem v režimu monitorování vybraných reakcí (MRM), přičemž parametry byly individuálně optimalizovány pro každý analyt. Kyselina fenofibrová byla kvantifikována v režimu záporné ionizace (ESI-) při sledování MRM přechodů m/z 317,05 $\rightarrow$ 231,00; 317,05 $\rightarrow$ 195,20; 317,05 $\rightarrow$ 167,00; přičemž první ion byl použit pro kvantifikaci. Vnitřní standard byl detekován v režimu kladném (ESI+) pomocí sledování vybraných iontů (SIM) při m/z 361,90. Souhrn podmínek je zobrazen v tabulce 5.

4.3.10.5. Kalibrace a validace metody

Kvantifikace kyseliny fenofibrové byla prováděna pomocí metody vnitřního standardu za využití vícebodové kalibrační křivky. Kalibrační standardy byly připraveny obohacením slepého jaterního homogenátu o známé množství standardu kyseliny fenofibrové v koncentračním rozsahu 500–5000 ng/ml. Standardy byly následně podrobeny shodnému procesu extrakce a úpravy jako neznámé vzorky, čímž bylo zajištěno vykompenzování vlivu tkáňové matrice a případných ztrát během přípravy vzorku. Linearita metody byla hodnocena v daném koncentračním rozmezí metodou nejmenších čtverců. Kalibrační křivka byla získána vykreslením poměrů výšek signálu analytu a IS v závislosti na poměrech koncentrací analytu a IS. Koeficient determinace (R^2) dosahoval ve všech měřených sériích hodnoty vyšší než 0,997. Pro ověření spolehlivosti metody byly sledovány parametry preciznosti, pravdivosti a přesnosti měření, které v rámci validace nepřesáhly $\pm 15\%$. Dolní mez kvantifikace (LLOQ) byla stanovena jako nejnižší bod na kalibrační křivce (500 ng/ml), který stále splňoval parametry validace. Stabilita analytu v jaterním homogenátu byla ověřena během přípravy vzorků při laboratorní teplotě, i během krátkodobého uchovávání v autosampleru přístroje. Celý proces od detekce analytů, až po konečné vyhodnocení výsledků byl realizován pomocí softwaru LC Solution (Shimadzu, Japonsko).

Tabulka 5. Souhrn podmínek LC-MS analýzy pro měření kyseliny fenofibrové

Parametry	Hodnoty	
Stacionární fáze	Luna C18(2); 100x2 mm; 3 μ m částice	
MF A	0,1% kyselina mravenčí ve vodě	(20:80, v/v)
MF B	0,1% kyselina mravenčí v ACN	
IS	bezafibrát	
Průtok	0,4 ml/min	
Teplota kolony	37 °C	
Nástřik	1 μ l	
Doba analýzy	5 min	
MS/MS detekce		CE [V]
Ionizační mód	ESI negativní	
m/z přechody	kyselina fenofibrová	
	317,05→231,00	15,0
	317,05→195,20	35,0
	317,05→167,00	40,0

Seznam zkratk: ACN – acetonitril; MF A – mobilní fáze A; MF B – mobilní fáze B; IS – interní standard; m/z – poměr hmotnosti a náboje fragmentu; CE – kolizní energie.

4.4. Statistická analýza

Statistická analýza získaných dat byla provedena v programu Statistica (DataBon, Praha, ČR, verze 14.0.0.15). V rámci dílčích úkolů byla využita jednofaktorová analýza rozptylu s *post-hoc* Bonferroniho korekcí a Studentův *t*-test. Statistická signifikance byla definována jako $p < 0,05$.

5. Výsledky

Část výsledků prezentovaných v této disertační práci byla publikována v mezinárodních recenzovaných odborných časopisech, viz kapitola 10. Další část výsledků pochází z experimentů realizovaných v průběhu doktorského studia a dosud nebyla publikována; tyto výsledky jsou však kompletní, statisticky vyhodnocené a tvoří integrální součást disertační práce. Nepublikovaná data jsou současně součástí rukopisů připravovaných k odeslání do mezinárodních recenzovaných časopisů. Všechna prezentovaná data byla získána autorem práce nebo za jeho přímé účasti a byla zpracována v souladu s běžně přijímanými metodickými a statistickými postupy.

5.1. Metabolická charakterizace potkaních modelů

V tabulce 6 a grafu 1 jsou vyjádřeny hodnoty charakterizující metabolismus potkaních modelů MetS. Skupina HHTg je spojována s výrazně zvýšeným množstvím jaterních triglyceridů. Mimo jiné bylo ve skupině HHTg pozorováno zvýšené množství glukózy nalačno a také mírné zvýšení potkaního vysoce citlivého CRP (hsCRP). Ačkoliv potkani HHTg nebyli obézní, byl u nich pozorován signifikantně zvýšený index adipozity. Potkani SHR-CRP s transgenně exprimovaným lidským CRP vykazovali zvýšené množství sérových TAG a cholesterolu. Akumulace TAG v játrech však nebyla oproti kontrole výrazně navýšena. U samic Wistar s prodělanou bilaterální ovariektomií byl pozorován statisticky významný nárůst hmotnosti, indexu adipozity, hmotnosti jater, a také elevace sérového cholesterolu. Ačkoliv sérové TAG nebyly u skupiny W-OVX významně změněny oproti kontrolní skupině W-SHAM, akumulace TAG v játrech byla výrazně zvýšena, viz graf 1.

Tabulka 6. Metabolické charakteristiky potkaních modelů metabolického syndromu [169].

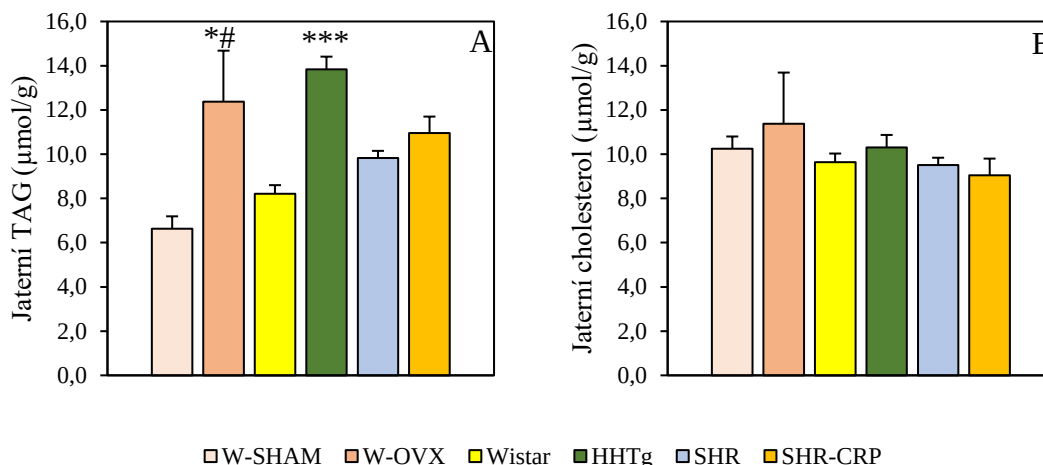
	W-SHAM	W-OVX	Wistar	HHTg	SHR	SHR-CRP
Věk (měsíce)	7	7	7	7	9	9
Hmotnost (BW) [g]	341 ± 19	422 ± 13	488 ± 23	448 ± 3	410 ± 7	415 ± 7
		**				
Index adipozity [g/100 g BW]	1,78 ± 0,20	3,12 ± 0,38	1,34 ± 0,01	2,09 ± 0,11	0,86 ± 0,06	0,90 ± 0,05
		*		***		
Hmotnost jater [g/100 g BW]	3,25 ± 0,09	2,37 ± 0,13	2,74 ± 0,10	3,09 ± 0,03	3,18 ± 0,04	3,30 ± 0,07

Sérové triglyceridy [mmol/L]	1,82 ± 0,57	1,70 ± 0,37	1,54 ± 0,22	5,01 ± 0,24	0,51 ± 0,02	0,77 ± 0,12
				***		*
Sérový cholesterol [mmol/L]	2,35 ± 0,19	3,20 ± 0,26	2,32 ± 0,10	2,04 ± 0,06	1,43 ± 0,04	1,67 ± 0,13
		*				***
HDL-C [mmol/L]	1,71 ± 0,16	2,26 ± 0,14	1,27 ± 0,08	0,81 ± 0,06	1,15 ± 0,02	1,21 ± 0,06
		*		**		
Glukóza nalačno [mmol/L]	7,64 ± 0,38	7,66 ± 0,20	6,56 ± 0,19	9,30 ± 0,38	6,54 ± 0,06	6,30 ± 0,06

hsCRP lidský [μg/mL]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,25 ± 0,12	240,00 ± 4,78

hsCRP potkaní [μg/mL]	1,30 ± 0,13	1,02 ± 0,06	1,25 ± 0,07	1,53 ± 0,06	1,08 ± 0,10	0,55 ± 0,03
				*		**
ALT [μkat/L]	2,23 ± 1,21	2,89 ± 0,78	1,36 ± 0,38	1,24 ± 0,06	1,88 ± 0,03	2,43 ± 0,19
						*
AST [μkat/L]	3,85 ± 1,20	4,12 ± 0,64	3,21 ± 0,40	3,13 ± 0,28	3,74 ± 0,16	4,16 ± 0,20

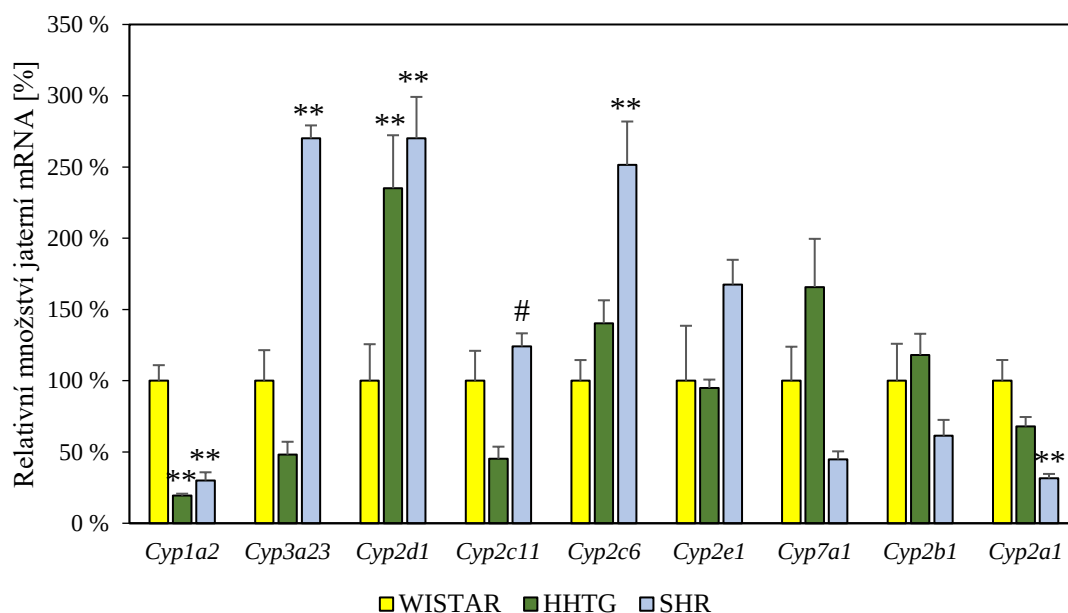
Data jsou prezentována jako průměr ± SEM. Statistická významnost byla určena pomocí nepárového Studentova t-testu. * značí $p < 0,05$; *** značí $p < 0,001$ v porovnání s kontrolní skupinou podle barvy textu; modrý text představuje samice W-SHAM; černý text představuje samce Wistar; červený text značí samce SHR; n = 5–7 [169].



Graf 1A a 1B: Porovnání akumulace TAG a cholesterolu v játrech potkaních modelů metabolického syndromu. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5-7$. * vyjadřuje $p < 0,05$ v porovnání se skupinou Wistar; *** vyjadřuje $p < 0,001$ v porovnání vůči skupině Wistar; # vyjadřuje $p < 0,05$ v porovnání se skupinou W-SHAM [169].

5.2. Rozdíly v genové expresi vybraných enzymů CYP v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR

Srovnání relativní exprese mRNA vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkaních kmenů Wistar, HHTg a SHR je znázorněno v grafu 2. Hodnoty relativní exprese byly vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině Wistar, jejíž exprese byla normalizována na 100 %. Ve srovnání s kontrolní skupinou bylo u obou experimentálních modelů MetS pozorováno několik statisticky významných změn. Exprese genu *Cyp1a2* byla u HHTg snížena o 81 % ($p < 0,01$) a u SHR o 70 % ($p < 0,01$). U skupiny SHR bylo navíc pozorováno statisticky významné snížení exprese *Cyp2a1* o 68 % v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,01$). Naopak exprese *Cyp3a23* byla u skupiny SHR signifikantně upregulována o 170 % ($p < 0,01$). Zvýšená exprese genu *Cyp2d1* byla pozorována jak u skupiny HHTg (135 %; $p < 0,01$), tak SHR (170 %; $p < 0,01$). U SHR byla dále pozorována signifikantní upregulace *Cyp2c6* o 151 % ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,01$).

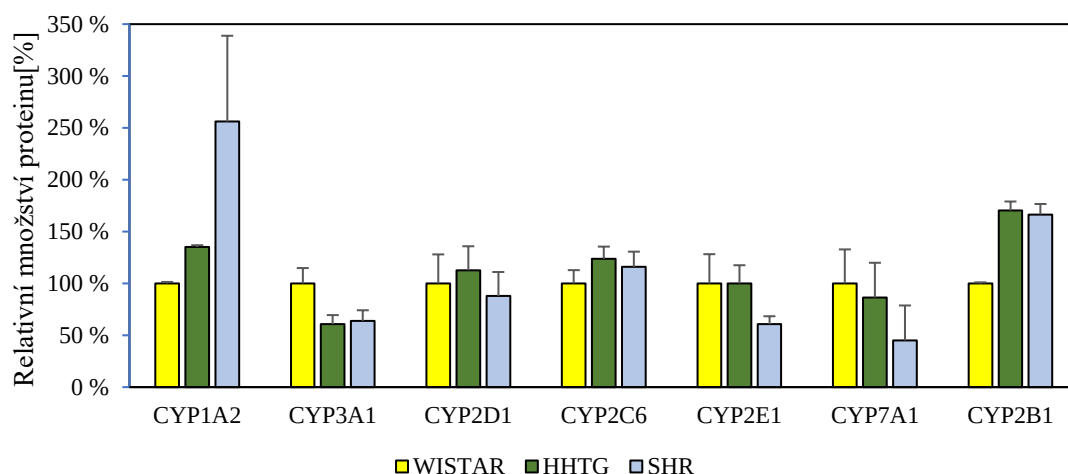


Graf 2. Rozdíly v relativní expresi vybraných forem CYP v jaterních tkáních samců HHTg a SHR porovnané vůči kontrolní skupině samců potkana Wistar s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM. $n = 5-7$. ** vyjadřuje $p < 0,01$ v porovnání vůči skupině Wistar. # vyjadřuje $p < 0,05$ v porovnání se skupinou HHTg [169].

5.2.1. Proteinová exprese vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR

Relativní množství vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkanů kmenů Wistar, HHTg a SHR jsou zobrazena v grafu 3. Analýza relativní proteinové exprese byla provedena z poolovaných vzorků mikrozomálních frakcí jednotlivých experimentálních skupin a měření bylo provedeno v technickém duplikátu. Z tohoto důvodu nebylo provedeno statistické vyhodnocení a výsledky slouží k orientačnímu posouzení trendů proteinové exprese ve srovnání s výsledky získanými na úrovni mRNA a enzymové aktivity. Získaná data odhalila u sledovaných kmenů několik shodných i specifických změn. Ve srovnání s kontrolní skupinou bylo u obou patologických modelů HHTg i SHR zaznamenáno zvýšené relativní množství proteinu u forem CYP1A2, CYP2B1 a mírný nárůst byl patrný také u CYP2C6. Naopak exprese proteinu CYP3A1 byla u obou experimentálních kmenů zřetelně snížena. Odlišný profil mezi kmeny byl pozorován u formy CYP2D1, kde se u kmene HHTg projevil mírný nárůst, zatímco u kmene SHR její množství naopak kleslo. U hypertenzního kmene SHR byl navíc detekován úbytek proteinu u forem CYP2E1 a

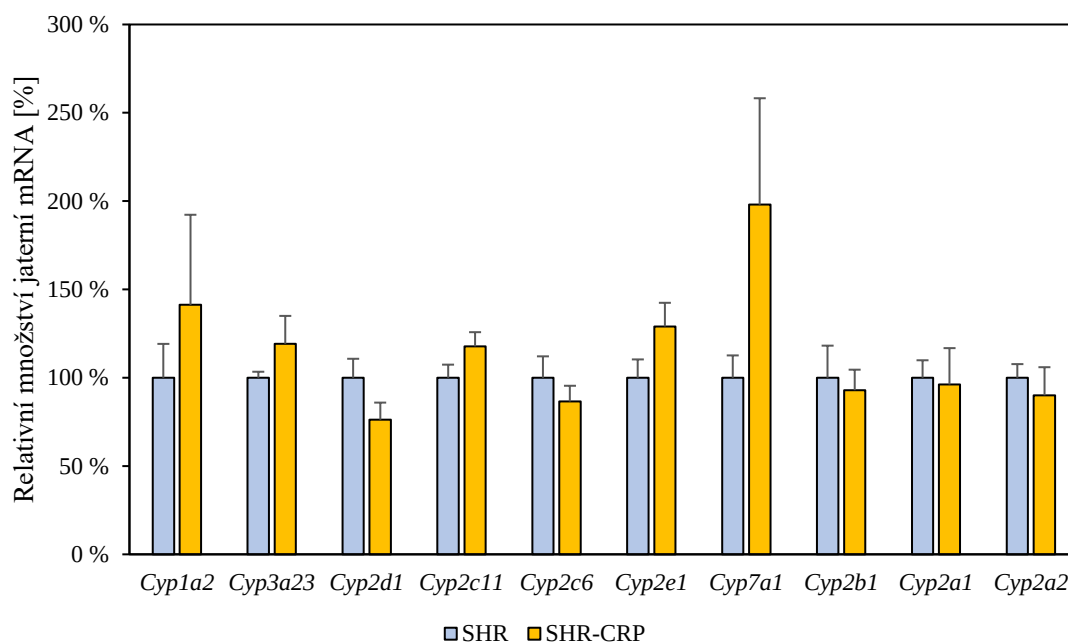
CYP7A1, přičemž u kmene HHTg zůstala hladina CYP2E1 na úrovni srovnatelné s kontrolou.



Graf 3. Rozdíly v relativním množství vybraných forem CYP v poolovaných jaterních mikrozomech kmenů HHTg a SHR porovnávaných vůči kmenu Wistar s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 2$.

5.3. Vliv lidského C-reaktivního proteinu na genovou expresi CYP mRNA u potkanů SHR

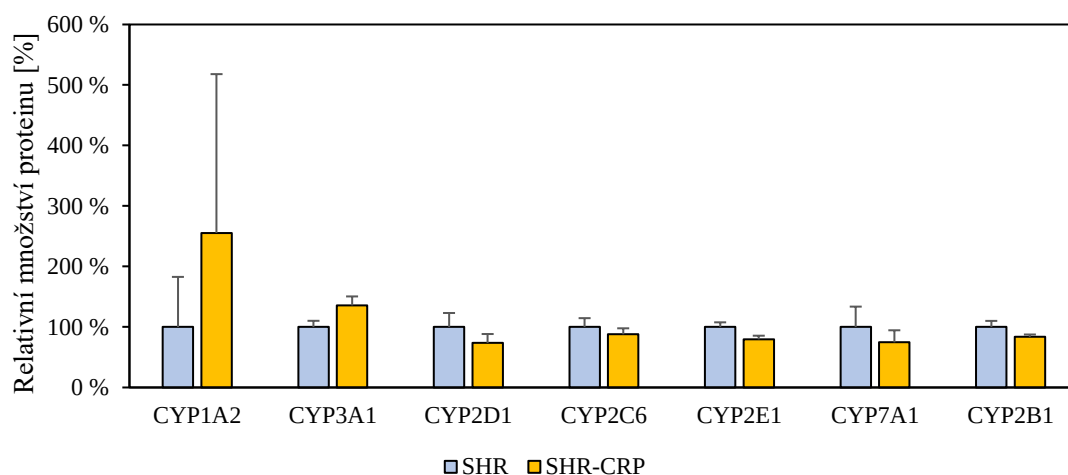
Srovnání jaterní genové exprese forem CYP mezi potkany SHR a SHR-CRP bylo provedeno s cílem posoudit vliv chronicky zvýšené exprese lidského hsCRP na expresi mRNA enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik a endogenních látek. Výsledky relativní exprese mRNA jsou znázorněny v grafu 4 a jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči skupině SHR, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. U většiny sledovaných forem CYP nebyly mezi skupinami pozorovány statisticky významné rozdíly v množství exprimované mRNA. Ve formě *Cyp7a1* byl pozorován mírný trend ke zvýšení exprese mRNA vůči skupině SHR, ale vzhledem k vysoké biovariabilitě tyto změny nedosáhly statistické významnosti. Výsledky naznačují, že samotná přítomnost lidského CRP nemá zásadní vliv na expresi hlavních forem CYP v tomto experimentálním uspořádání.



Graf 4. Rozdíly v relativní expresi mRNA CYP v jaterní tkáni potkanů SHR-CRP v porovnání s potkany SHR s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5-7$ [169].

5.3.1. Proteinová exprese vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkanů SHR a SHR-CRP

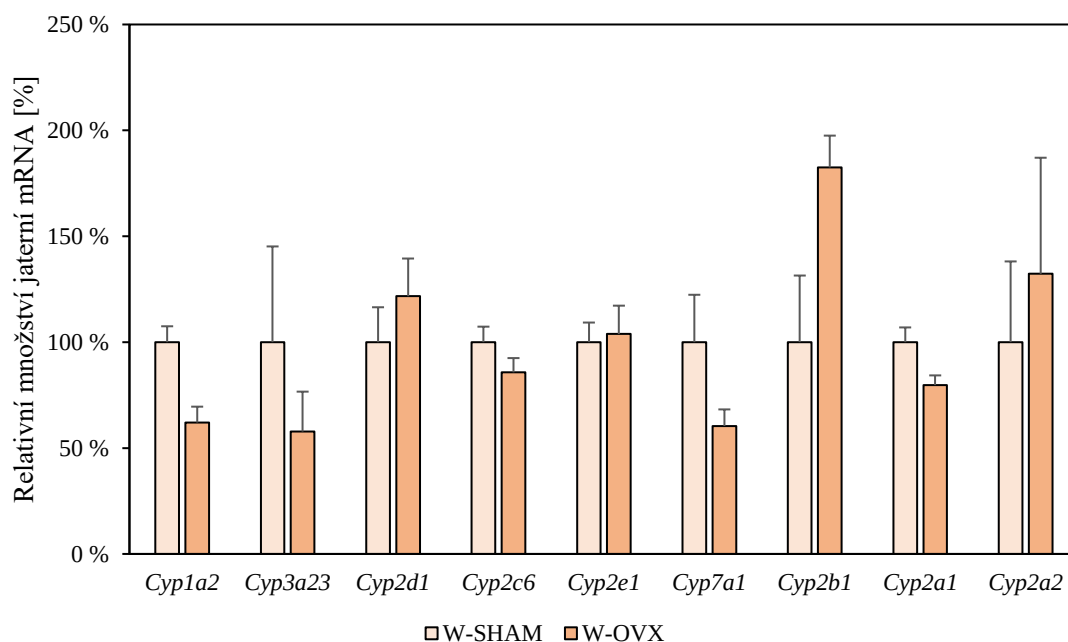
Relativní množství vybraných forem CYP bylo dále stanoveno v jaterní tkáni potkanů kmene SHR a transgenních potkanů SHR-CRP s chronickou expresí lidského C-reaktivního proteinu. Analýza byla provedena z poolovaných vzorků a měření bylo provedeno v technickém duplikátu, proto výsledky nebyly statisticky vyhodnoceny a slouží k orientačnímu porovnání mezi jednotlivými skupinami. Ve skupině SHR-CRP bylo ve srovnání s kontrolní skupinou SHR zaznamenáno mírně zvýšené relativní množství proteinu CYP3A1. U ostatních sledovaných forem nebyly pozorovány výrazné rozdíly v relativním množství proteinu mezi skupinami SHR a SHR-CRP a zjištěné hodnoty se pohybovaly v rámci trendových změn.



Graf 5. Rozdíly v relativním množství proteinu vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkanů SHR-CRP porovnávaných vůči kontrolní skupině SHR s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM.

5.4. Vliv ovariektomie na genovou expresi vybraných forem CYP v jaterní tkáni samic Wistar

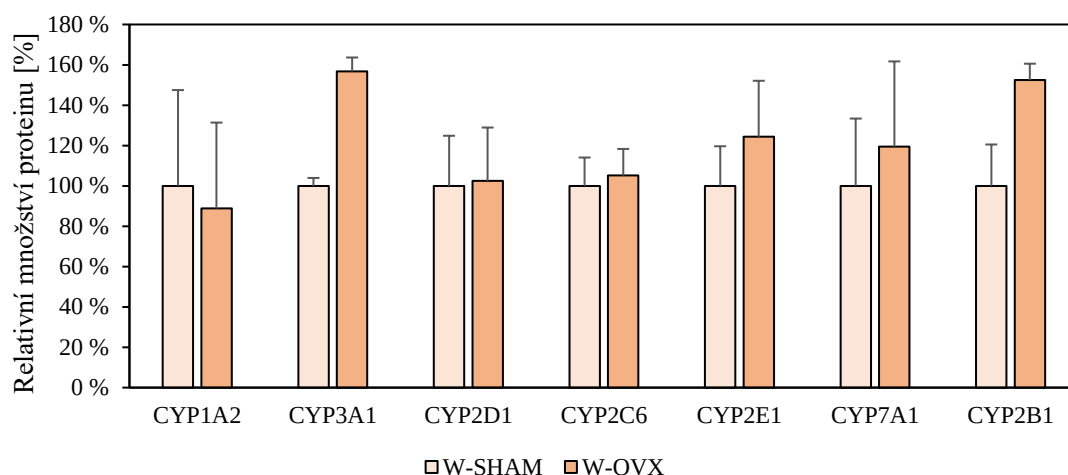
Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných forem CYP v jaterní tkáni ovariektomizovaných samic Wistar jsou znázorněny v grafu 6. Relativní množství exprimované mRNA bylo porovnáváno vůči skupině W-SHAM, přičemž hodnoty kontrolní skupiny byly normalizovány na 100 %. Mezi skupinami W-OVX a W-SHAM nebyly u žádné ze sledovaných forem CYP zjištěny statisticky významné rozdíly. Forma *Cyp2b1* u W-OVX vykazovala trend ke zvýšení exprese genu ve srovnání s kontrolní skupinou, avšak tento rozdíl nedosáhl statistické signifikance. Naopak formy *Cyp1a2*, *Cyp3a23* a *Cyp7a1* vykazovaly trend ke snížení relativního množství exprimované mRNA vůči kontrole.



Graf 6. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkaních samic W-OVX porovnávaných vůči kontrolní skupině W-SHAM s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n=5$ [169].

5.4.1. Vliv ovariektomie na množství proteinu vybraných forem CYP v jaterní tkáni samic Wistar

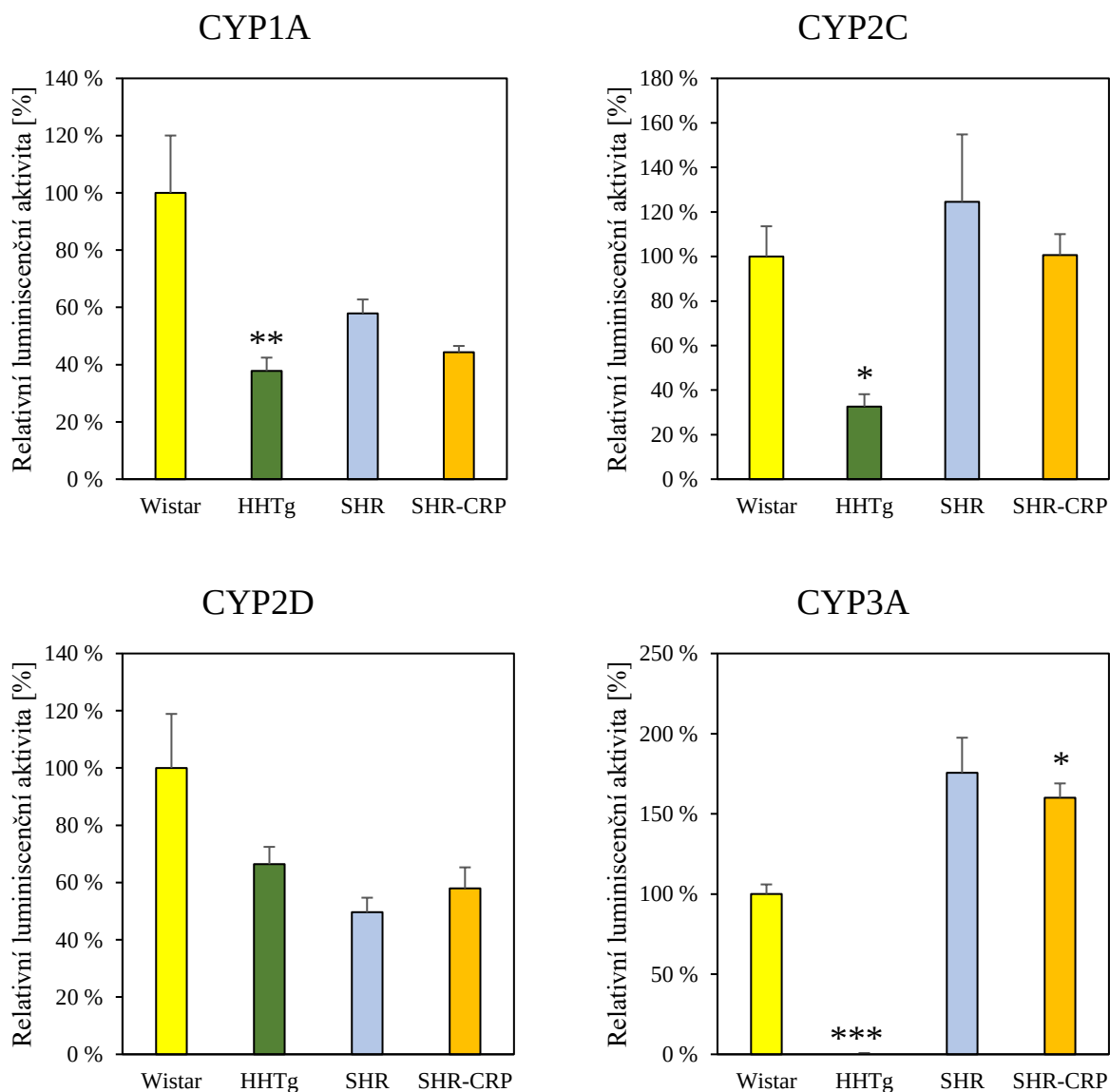
Relativní množství vybraných forem CYP bylo stanoveno rovněž v jaterní tkáni ovariektomizovaných samic potkana kmene Wistar (W-OVX) a kontrolních samic po falešném chirurgickém zákroku (W-SHAM). Analýza byla provedena z poolovaných vzorků a měření bylo provedeno v technickém duplikátu, přičemž výsledky nebyly podrobeny statistickému vyhodnocení. Ve skupině W-OVX bylo ve srovnání s kontrolní skupinou W-SHAM pozorováno vyšší relativní množství proteinu u některých sledovaných forem, zejména CYP3A1 a CYP2B1. U ostatních forem byly rozdíly v relativním množství proteinu méně výrazné a nepřesahovaly rámec trendových změn.



Graf 7. Rozdíly v relativním množství proteinu vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkaních samic W-OVX porovnávaných vůči kontrolní skupině W-SHAM s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM

5.5. Rozdíly v aktivitě enzymů CYP1A2, CYP2C, CYP2D1 a CYP3A v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR

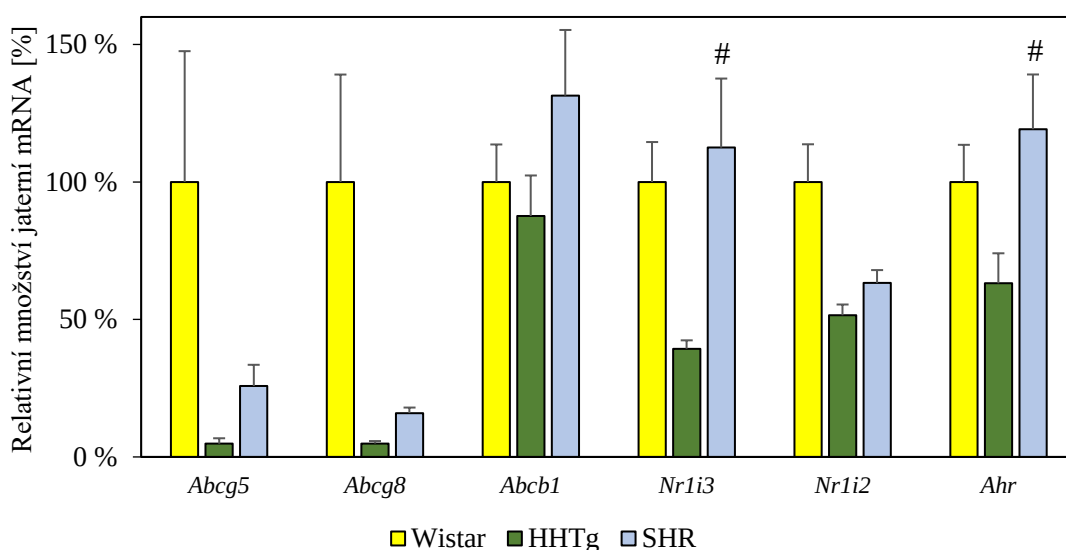
Enzymová aktivita vybraných forem CYP byla stanovena v jaterních mikrozomech pomocí luminiscenčního kitu P450-Glo Assay (Promega Corporation, USA). Relativní aktivita vyjádřena jako procentuální změna vůči kontrolní skupině Wistar, jejíž hodnota byla normalizována na 100 %. Výsledky jsou znázorněny v grafu 8. Výsledky analýz odhalily významné rozdíly v aktivitě jednotlivých CYP forem mezi srovnávanými kmeny. CYP1A2 vykazoval ve všech srovnávaných modelech MetS trend ke snížení enzymové aktivity a u kmene HHTg došlo k signifikantnímu poklesu o 62 % vůči kontrolní skupině ($p < 0,01$). Aktivita formy CYP2C byla rovněž ve skupině HHTg statisticky významně snížena o 67 % ($p < 0,05$). Rozdíl nastal u skupiny SHR, kde byl pozorován trend v mírném nárůstu aktivity CYP2C, ale vzhledem k vysoké biovariabilitě nebylo dosaženo statistické významnosti. U enzymu CYP2D1 byl pozorován trend ve snížení aktivity ve všech pozorovaných kmenech, ale statistická analýza nevykazovala významné změny. Analýza formy CYP3A vykazovala anomální profil ve skupině HHTG, kde byla detekována nulová aktivita ($p < 0,001$). Naproti tomu kmen SHR-CRP vykazoval signifikantní zvýšení aktivity o 60 % vůči kontrole ($p < 0,05$) a u skupiny SHR byl pozorován trend ve zvýšení o 75 % bez statistické významnosti.



Graf 8. Rozdíly v relativní aktivitě vybraných forem CYP v jaterní tkáni potkaních samců HHTg, SHR a SHR-CRP v porovnání s kontrolní skupinou samců Wistar s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5-7$. * vyjadřuje $p < 0,05$; ** vyjadřuje $p < 0,01$; *** vyjadřuje $p < 0,001$ v porovnání vůči skupině Wistar.

5.6. Rozdíly v expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR

Graf 9 znázorňuje rozdíly v expresi mRNA vybraných ABC transportérů, transkripčních faktorů v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR. Relativní množství mRNA bylo vyjádřeno jako procentuální změna vůči kontrolní skupině Wistar, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Nejvýraznější změny byly pozorovány v *Abcg5* a *Abcg8*, kde byl zaznamenán silný trend k úbytku mRNA jak u HHTg (zhruba 95 %), tak SHR (u *Abcg5* 75 % a u *Abcg8* 85 %). Hodnoty však nevykazovaly statistickou významnost, pravděpodobně v důsledku vysoké interindividuální variability kontrolní skupiny. Ve skupině HHTg byl podobný trend snížení exprese mRNA pozorován v genu jaderného receptoru *Nr1i3* kódujícího konstitutivní androstanový receptor (CAR) (60 %), *Nr1i2*, který kóduje ligandy aktivovaný transkripční faktor pregnanový x receptor (PXR) (48 %), a rovněž byl pozorován úbytek mRNA v *Ahr* (47 %). Kmen SHR s výjimkou mírného úbytku *Nr1i2* nevykazoval významné změny oproti kontrolní skupině Wistar a naopak byly pozorovány mírné nárůsty exprese mRNA.



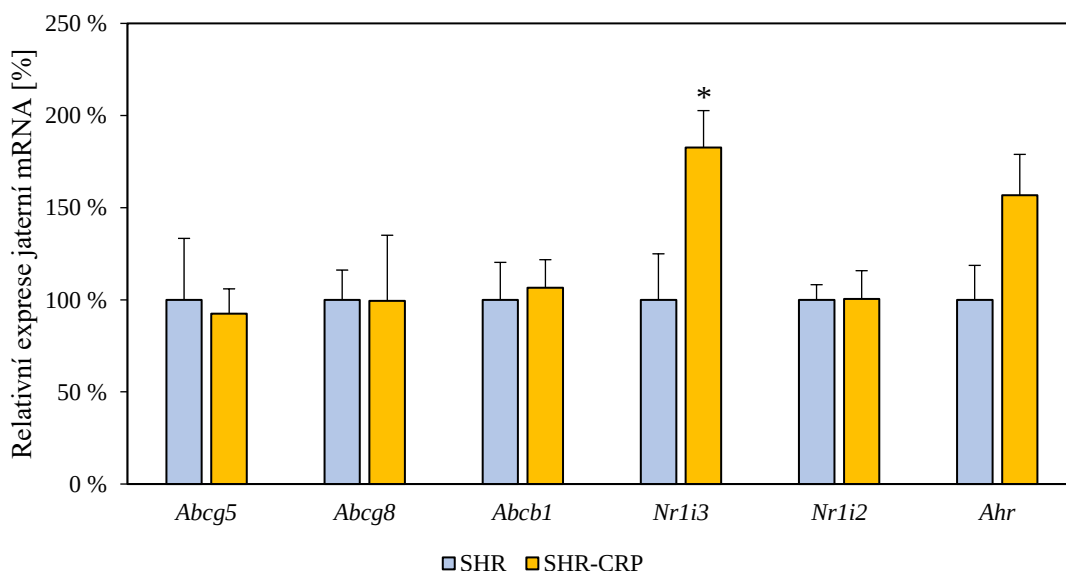
Graf 9. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů v jaterních tkáních samců HHTg a SHR porovnané vůči kontrolní skupině samců potkana Wistar s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM. $n = 5 - 6$. # vyjadřuje $p < 0,05$ v porovnání se skupinou HHTg [169].

5.7. Vliv lidského C-reaktivního proteinu na genovou expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů u potkana SHR

Srovnání relativní exprese mRNA vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů v jaterní tkáni bylo provedeno mezi potkany kmene SHR a transgenními potkany SHR-CRP s cílem posoudit vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi genů zapojených do metabolismu xenobiotik. Výsledky relativní exprese mRNA jsou znázorněny v grafu 10 a jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči skupině SHR, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %.

Mezi skupinami SHR a SHR-CRP nebyly u většiny sledovaných ABC transportérů a transkripčních faktorů pozorovány statisticky významné rozdíly v relativní expresi mRNA. Výjimku tvořil gen *Nr1i3*, kódující konstitutivní androstánový receptor (CAR), u něhož byla u potkanů SHR-CRP zaznamenána statisticky významná změna exprese mRNA ve srovnání se skupinou SHR ($p < 0,05$). Exprese ostatních pozorovaných genů vykazovala pouze mírné odchylky, které se pohybovaly v rámci interindividuální variability a nedosáhly statistické významnosti.

V genu *Ahr* byl u potkanů SHR-CRP zaznamenán trend ke zvýšení exprese mRNA ve srovnání se skupinou SHR, ale tato změna však nebyla statisticky významná.

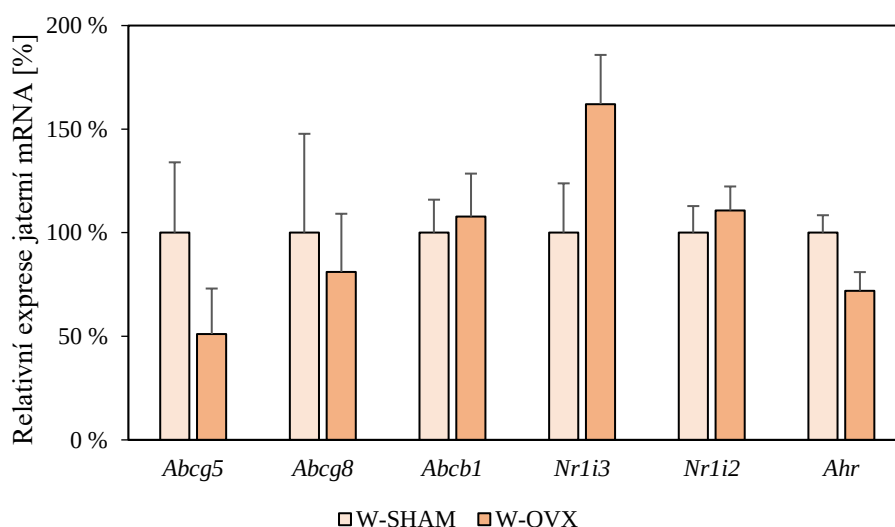


Graf 10. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů v jaterní tkáni potkanů SHR-CRP v porovnání s potkany SHR s hodnotami

normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5-7$. * vyjadřuje $p < 0,05$ v porovnání s kontrolní skupinou SHR [169].

5.8. Vliv ovariektomie na genovou expresi vybraných transportérů a transkripčních faktorů v jaterní tkáni potkaních samic Wistar

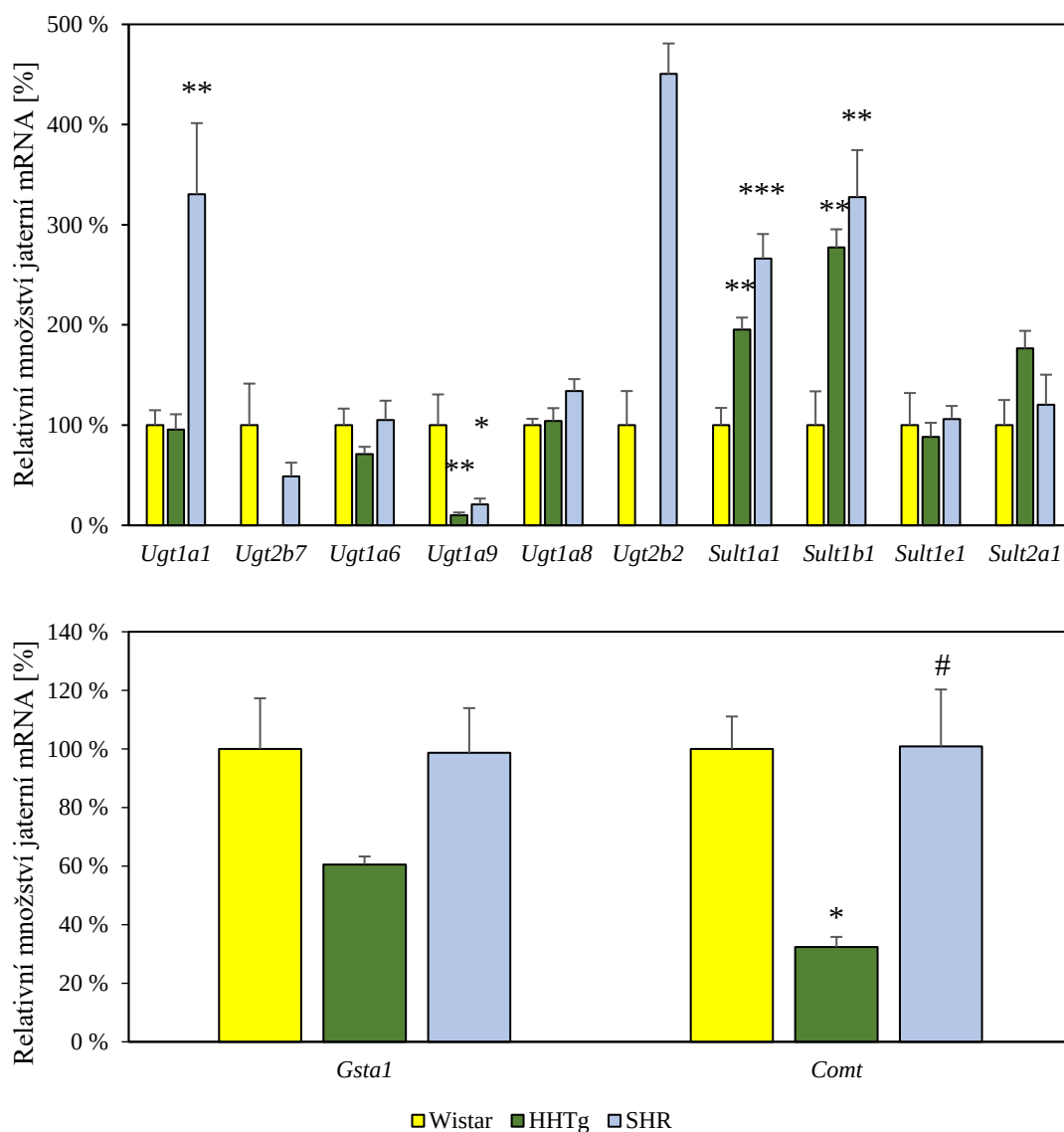
Srovnání relativní exprese mRNA vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů v jaterní tkáni samic potkana kmene Wistar bylo provedeno mezi samicemi W-OVX a kontrolními samicemi W-SHAM. Výsledky relativní exprese mRNA jsou znázorněny v grafu 11 a jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči skupině W-SHAM, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Mezi skupinami W-OVX a W-SHAM nebyly u žádného ze sledovaných ABC transportérů ani transkripčních faktorů zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní expresi mRNA. U jednotlivých genů byly pozorovány pouze mírné změny exprese, které se pohybovaly v rámci interindividuální variability a nebyly konzistentní napříč sledovaným souborem.



Graf 11. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů v jaterní tkáni potkaních samic W-OVX porovnávaných vůči kontrolní skupině W-SHAM s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5$ [169].

5.9. Rozdíly v genové expresi vybraných enzymů druhé fáze v jaterní tkáni potkanů Wistar, HHTg a SHR

Relativní exprese mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace byla stanovena v jaterní tkáni potkanů kmenů Wistar, HHTg a SHR. Výsledky relativní genové exprese jsou znázorněny v grafu 12 a jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině Wistar, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Nejvýraznější změna v expresi mRNA byla zaznamenána u enzymu *Comt*. U potkanů kmene HHTg byla exprese genu *Comt* statisticky významně snížena o 68 % ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar ($p < 0,05$). Tento efekt nebyl pozorován u potkanů kmene SHR, u nichž se exprese mRNA *Comt* nelišila od kontrolní skupiny. Exprese mRNA glutathion-S-transferázy alfa 1 (*Gsta1*) byla u potkanů kmene HHTg mírně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou, avšak tato změna nedosáhla statistické významnosti. Podobně byl u HHTg potkanů zaznamenán mírný pokles exprese mRNA dalších sledovaných enzymů druhé fáze, který však vykazoval vyšší interindividuální variabilitu. U potkanů kmene SHR nebyly ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar pozorovány statisticky významné změny v expresi mRNA žádného ze sledovaných enzymů druhé fáze biotransformace.

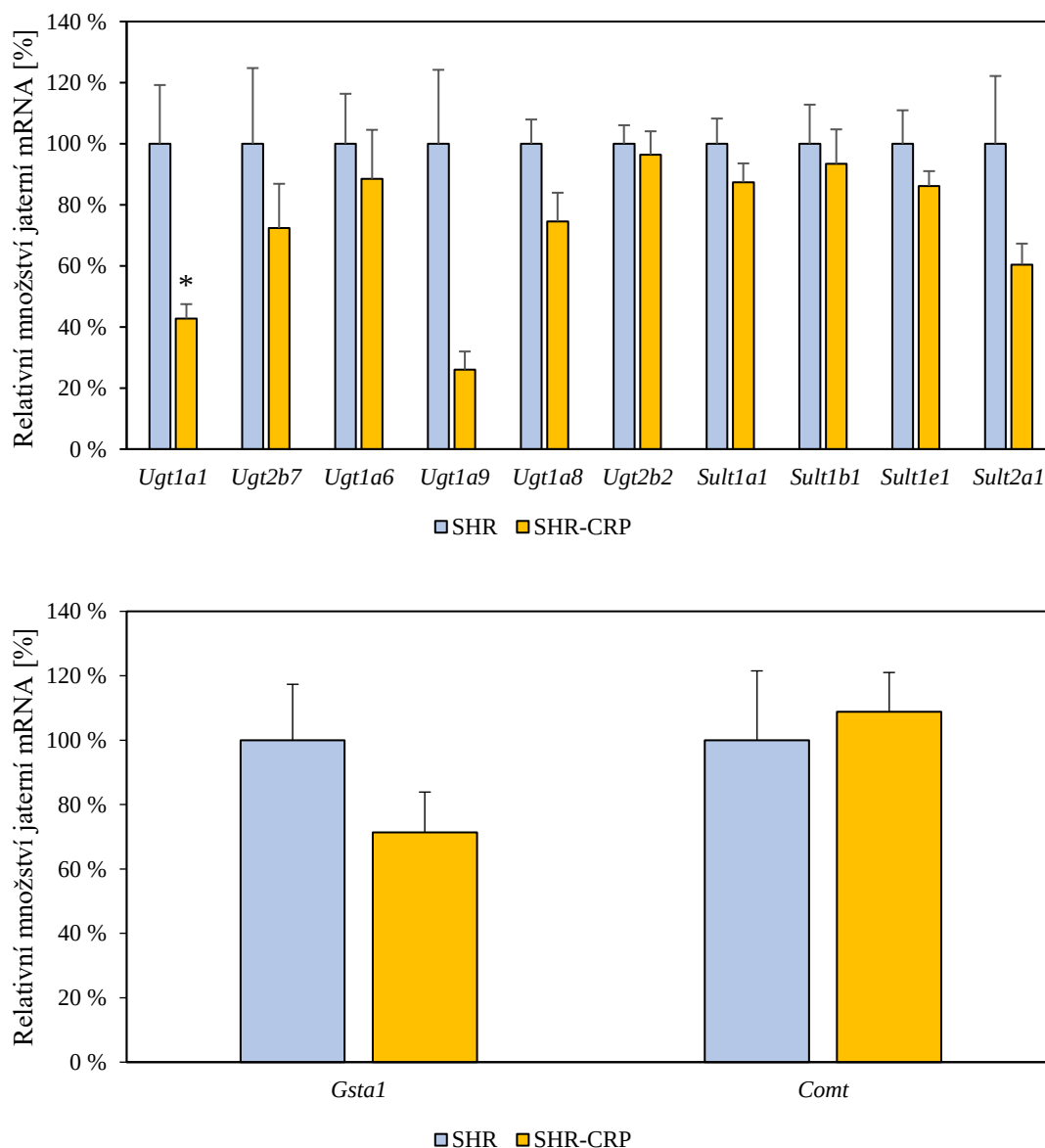


Graf 12. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v jaterních tkáních samců HHTg a SHR porovnané vůči kontrolní skupině samců potkana Wistar s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM. n = 5 – 6. * vyjadřuje $p < 0,05$; ** vyjadřuje $p < 0,01$; *** vyjadřuje $p < 0,001$ v porovnání se skupinou HHTg [169].

5.10. Vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi enzymů druhé fáze v jaterní tkáni potkanů SHR

Relativní exprese mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace byla stanovena v jaterní tkáni potkanů kmene SHR a transgenických potkanů SHR-CRP s cílem posoudit vliv chronicky zvýšené exprese lidského C-reaktivního proteinu na expresi těchto enzymů. Výsledky relativní genové exprese jsou znázorněny v grafu 13 a jsou vyjádřeny

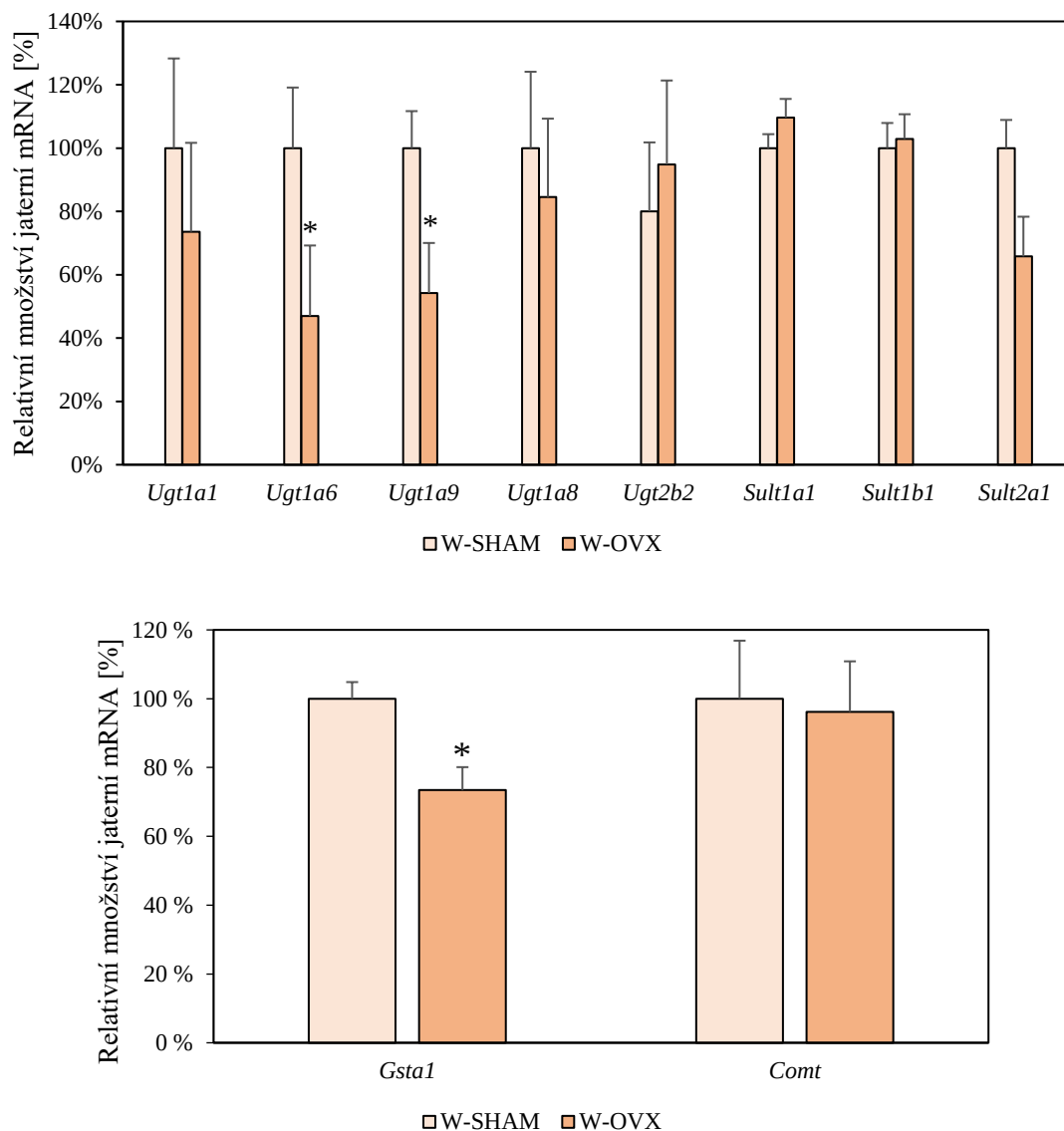
jako procentuální změna vůči skupině SHR, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Mezi skupinami SHR a SHR-CRP nebyly u většiny sledovaných enzymů druhé fáze biotransformace pozorovány statisticky významné rozdíly v relativní expresi mRNA. Výjimku tvořil gen *Ugt1a1*, u něhož byla u potkanů SHR-CRP zaznamenána statisticky významná snížená exprese mRNA ve srovnání se skupinou SHR ($p < 0,05$). U ostatních sledovaných genů byly zaznamenány pouze mírné změny v expresi mRNA, které se pohybovaly v rámci interindividuální variability a nedosáhly statistické významnosti.



Graf 13. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v jaterní tkáni potkanů SHR-CRP v porovnání s potkany SHR s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5-7$. * vyjadřuje $p < 0,05$ v porovnání s kontrolní skupinou SHR [169].

5.11. Vliv ovariektomie na genovou expresi enzymů druhé fáze v jaterní tkáni potkaních samic Wistar

Relativní exprese mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace byla stanovena v jaterní tkáni samic potkana kmene Wistar po ovariektomii. Srovnání genové exprese bylo provedeno mezi ovariektomizovanými samicemi (W-OVX) a kontrolními samicemi po falešném chirurgickém zákroku (W-SHAM). Výsledky relativní exprese mRNA jsou znázorněny v grafu 14 a vyjádřeny jako procentuální změna vůči skupině W-SHAM, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Mezi skupinami W-OVX a W-SHAM byly u vybraných enzymů druhé fáze biotransformace zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní expresi mRNA. Statisticky významná změna exprese mRNA byla zaznamenána u genů *Ugt1a6*, *Ugt1a9* a *Gsta1* ($p < 0,05$). U ostatních sledovaných enzymů byly pozorovány pouze mírné změny exprese mRNA, které se pohybovaly v rámci interindividuální variability a nedosáhly statistické významnosti.

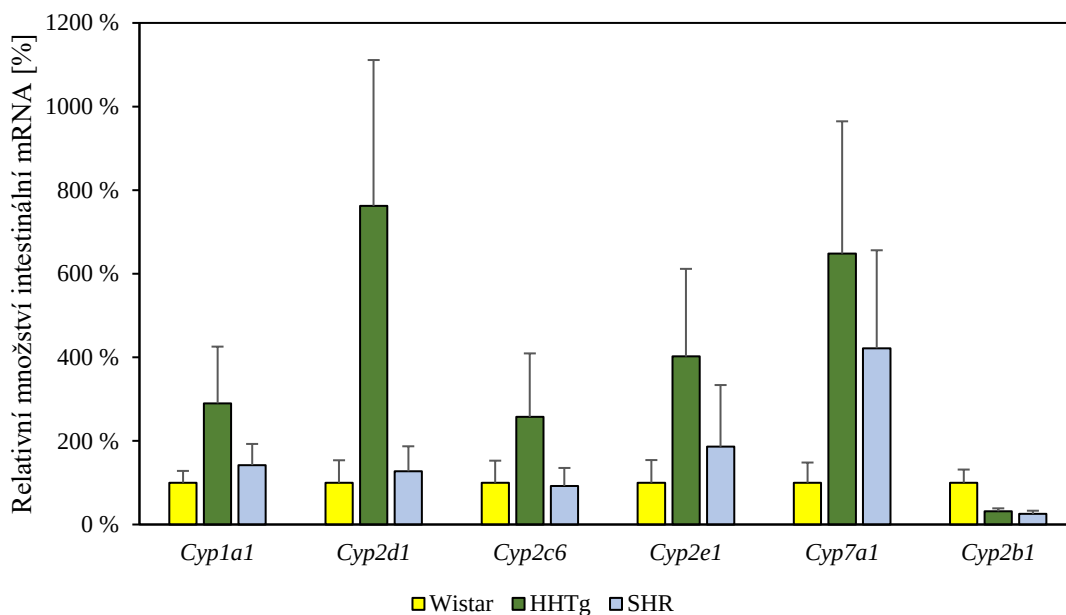


Graf 14. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v jaterní tkáni potkaních samic W-OVX porovnávaných vůči kontrolní skupině W-SHAM s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5$. * vyjadřuje $p < 0,05$ vůči kontrolní skupině W-SHAM [169].

5.12. Rozdíly v expresi mRNA vybraných forem CYP v tkáních tenkého střeva mezi kmeny Wistar, HHTg a SHR

Rozdíly v expresi genů CYP v tenkém střevě mezi jednotlivými experimentálními modely jsou znázorněny v Grafu 15. Množství exprimované mRNA v intestinální tkáni bylo ve srovnání s jaterní tkání výrazně nižší, což se projevilo vyšší variabilitou naměřených hodnot. Pravděpodobně z tohoto důvodu nebyly zaznamenány statisticky významné změny. S výjimkou *Cyp2b1* vykazovaly všechny sledované formy u potkanů HHTg

tendence ke zvýšené expresi mRNA ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar. U potkanů kmene SHR byl zaznamenán trend ke zvýšení exprese mRNA genu *Cyp7a1*.

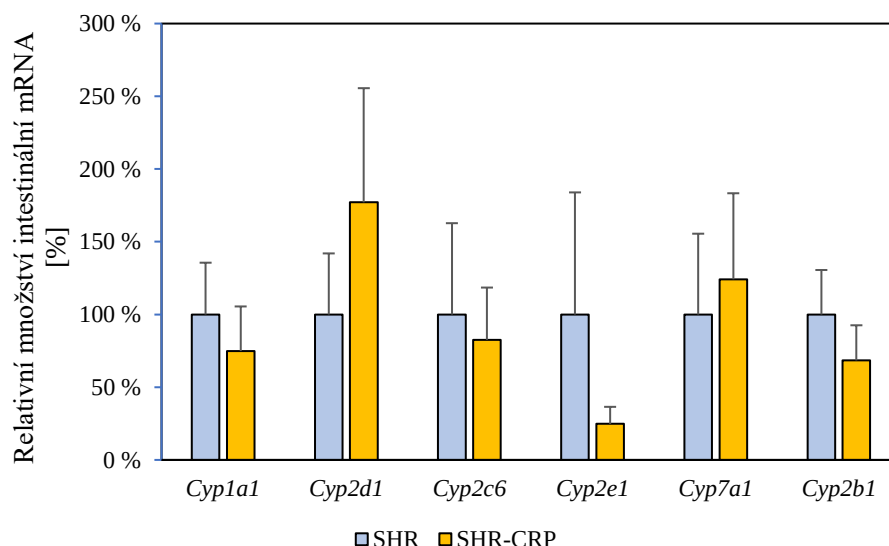


Graf 15. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných forem CYP v tkáních tenkého střeva mezi potkany HHTg a SHR porovnávaných vůči kontrolní skupině Wistar s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5 - 6$ [169].

5.13. Vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi CYP v tkáních tenkého střeva potkana SHR

Relativní exprese mRNA vybraných forem cytochromu P450 v tkáních tenkého střeva byla porovnávána mezi potkany SHR a transgenními SHR-CRP s chronickou expresí lidského CRP. Výsledky relativní genové exprese jsou znázorněny v grafu 16 a vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině SHR, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Ve skupině SHR-CRP byl u většiny sledovaných forem CYP pozorován trend ke snížení relativní exprese mRNA ve srovnání s kontrolní skupinou SHR. Nejvýraznější pokles byl zaznamenán u formy *Cyp2e1*, u níž byla relativní exprese mRNA snížena přibližně o 65 %. Současně byl pozorován trend ke snížení exprese mRNA také u forem *Cyp1a1*, *Cyp2c6* a *Cyp2b1*. Tyto změny však vzhledem k vysoké interindividuální variabilitě nedosáhly statistické významnosti.

Naopak u formy *Cyp2d1* byl ve skupině SHR-CRP zaznamenán trend ke zvýšení relativní exprese mRNA ve srovnání s kontrolní skupinou, avšak tato změna byla provázena výraznou variabilitou a absencí statistické významnosti. Mírný trend ke zvýšení exprese mRNA byl pozorován rovněž u formy *Cyp7a1*.

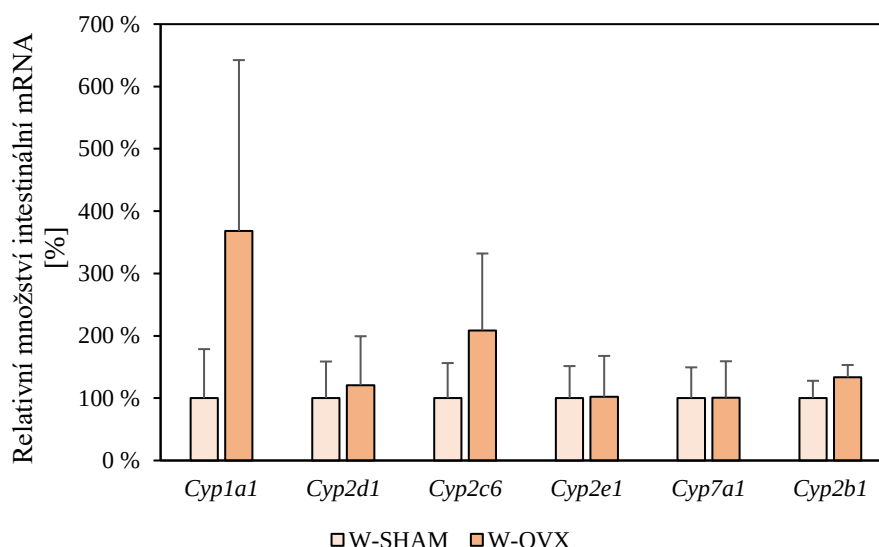


Graf 16. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných forem CYP tkáních tenkého střeva potkanů SHR-CRP v porovnání s potkany SHR s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5-7$ [169].

5.14. Vliv ovariektomie na genovou expresi CYP v tkáních tenkého střeva

Relativní exprese mRNA vybraných forem CYP v tkáních tenkého střeva byla porovnáována mezi skupinami W-SHAM a W-OVX. Výsledky relativní genové exprese jsou znázorněny v grafu 17 a jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině W-SHAM, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Mezi skupinami W-OVX a W-SHAM nebyly u sledovaných forem CYP pozorovány statisticky významné rozdíly v relativní expresi mRNA. Největší rozdíl byl pozorován u *Cyp1a1*, kde došlo k nárůstu exprese přibližně o 260 %. Hodnotu zároveň doprovázela vysoká chybová úsečka a změna nebyla statisticky významná. U ostatních sledovaných forem nebyly pozorovány významné změny. Výsledky naznačují, že ovariektomie nemá na expresi sledovaných forem CYP na úrovni mRNA v tenkém střevě výrazný vliv. Ve srovnání s jaterní tkání se

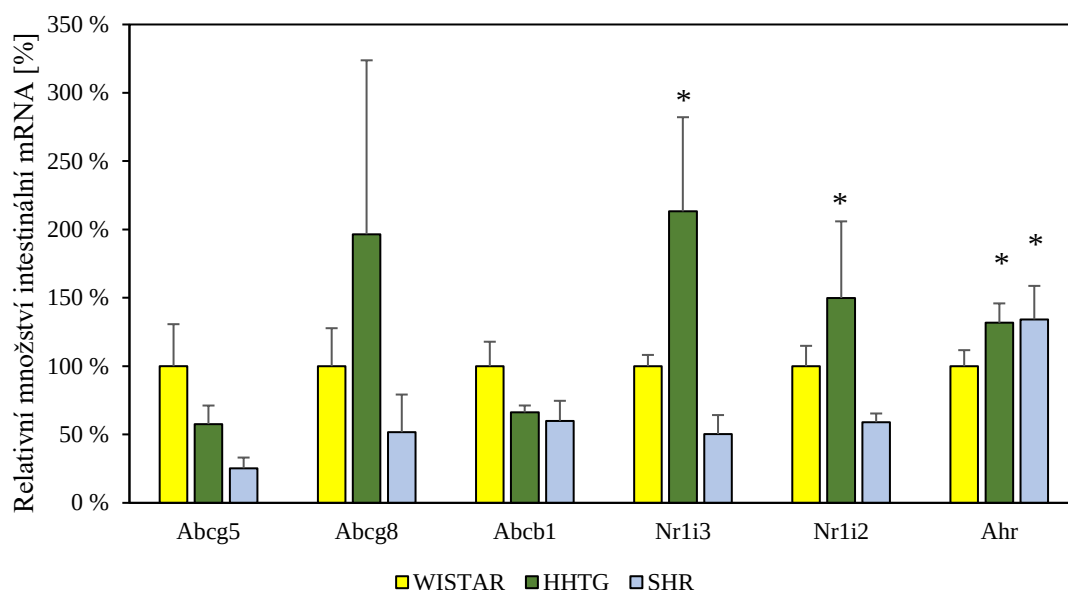
střevní exprese CYP jeví jako méně citlivá na změny hormonálního prostředí, což podporuje předpoklad tkáňově specifické regulace CYP.



Graf 17. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných forem CYP tkáních tenkého střeva potkaních samic W-OVX porovnávaných vůči kontrolní skupině W-SHAM s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5$ [169].

5.15. Rozdíly v expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů v tkáních tenkého střeva

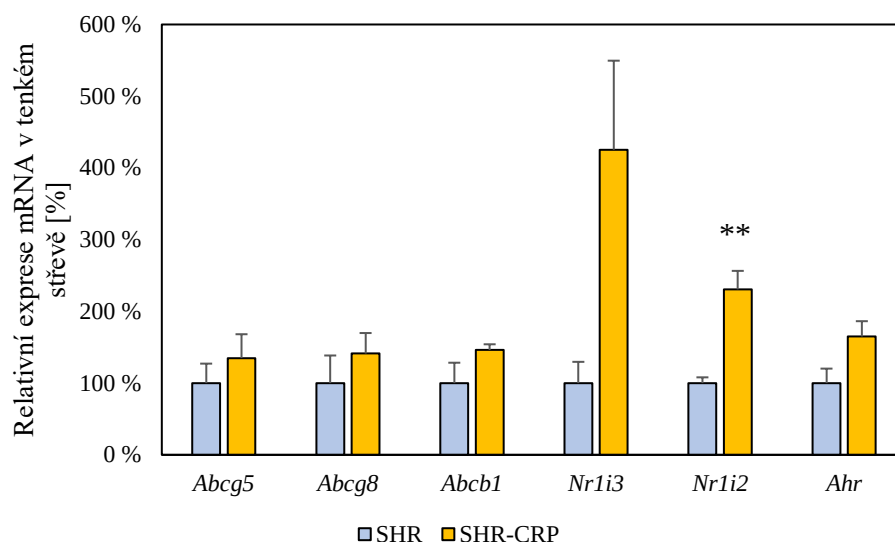
V grafu 18 jsou znázorněny rozdíly v expresi mRNA vybraných transportérů a transkripčních faktorů v tenkém střevě. Patologické stavy charakterizované hypertriglyceridemií a hypertenzí zde měly významný vliv na expresi transkripčních faktorů. Ve skupině HHTg byla ve srovnání s kontrolními potkany kmene Wistar zaznamenána významná zvýšená exprese mRNA genu *Nr1i3* (o 113 %; $p < 0,05$), *Nr1i2* (o 50 %; $p < 0,05$) a *Ahr* (o 32 %; $p < 0,05$). Exprese mRNA *Ahr* byla rovněž významně zvýšena u potkanů kmene SHR (o 34 %; $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar. U ostatních sledovaných genů byly pozorovány pouze trendy ve změně exprese mRNA, tyto rozdíly však nedosáhly statistické významnosti.



Graf 18. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů v tkáních tenkého střeva u samců HHTg a SHR porovnané vůči kontrolní skupině samců potkana Wistar s hodnotami normalizovanými na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM. $n = 5 - 6$. * značí $p < 0,05$ v porovnání se skupinou Wistar [169].

5.16. Vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi mRNA transportérů a transkripčních faktorů v tkáních tenkého střeva potkana SHR

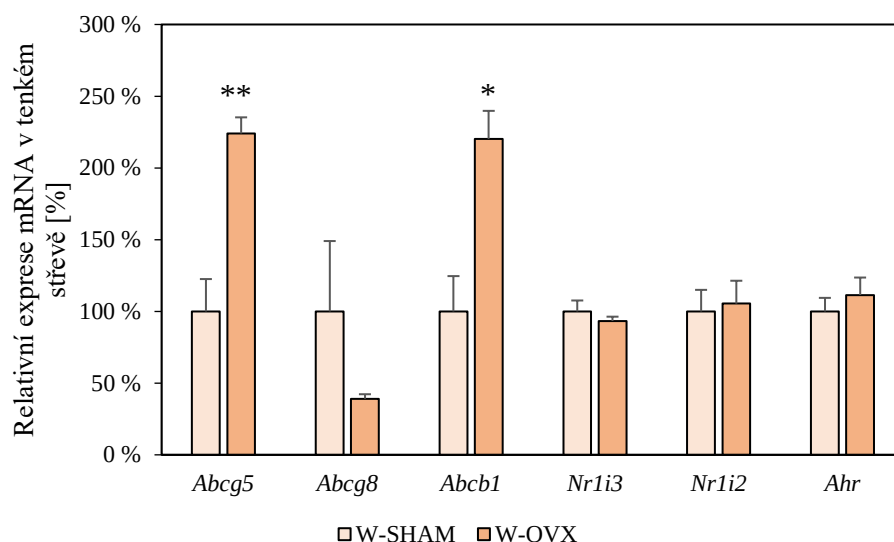
Graf 19 znázorňuje rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných ABC transportérů a jaderných receptorů v tkáních tenkého střeva mezi transgenním potkanem SHR-CRP vůči kontrolní skupině SHR s hodnotami normalizovanými na 100 %. Ve skupině SHR-CRP došlo k nejvýraznější změně u jaderných receptorů *Nr1i2* (PXR), u něhož došlo k nárůstu 130 % ($p < 0,01$). Zvýšení exprese mRNA bylo pozorováno rovněž u genu *Nr1i3* (CAR), kde byl pozorován nárůst přibližně 325 % oproti kontrolní skupině. V této pozorované změně, pravděpodobně kvůli vysoké biovariabilitě, nebylo dosaženo statistické významnosti. Ostatní sledované geny se pohybovaly v rámci interindividuální variability a nebyly u nich pozorovány významné změny.



Graf 19. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů v tkáních tenkého střeva potkanů SHR-CRP v porovnání s kontrolní skupinou potkanů SHR. Hodnoty relativní exprese mRNA jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině SHR, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5-7$. ** vyjadřuje $p < 0,01$ ve srovnání s kontrolní skupinou SHR [169].

5.17. Vliv ovariektomie na genovou expresi vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů

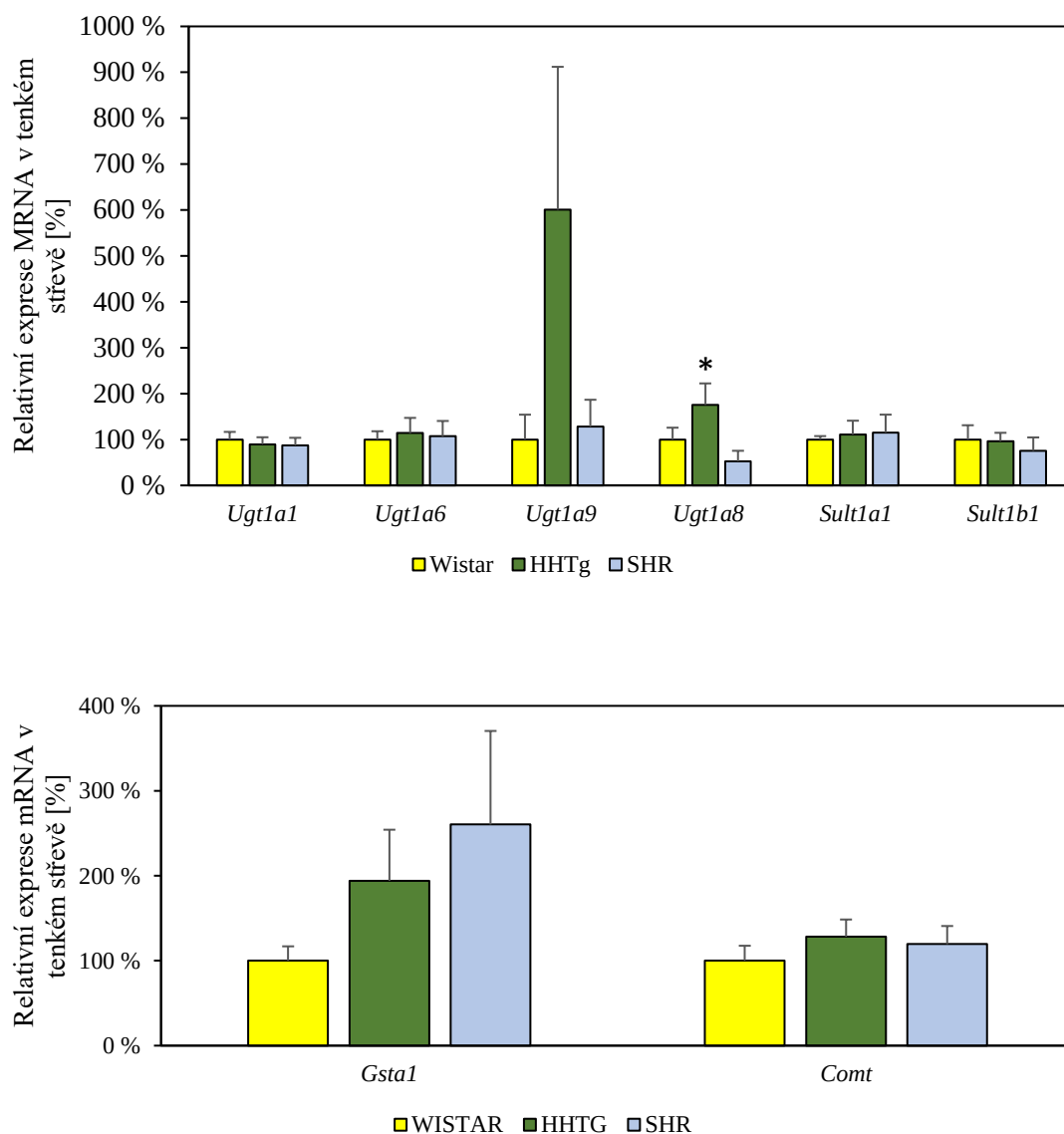
Relativní exprese mRNA vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů v tkáních tenkého střeva byla porovnávána u skupiny W-OVX vůči kontrolní W-SHAM. Výsledky relativní genové exprese jsou znázorněny v grafu 20 a jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině W-SHAM, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Ve skupině W-OVX bylo pozorováno statisticky významné zvýšení relativní exprese genu *Abcg5* o 124 % ($p < 0,01$) a současně byl zaznamenán signifikantní nárůst *Abcb1* o 120 % ($p < 0,05$). Dále byl pozorován nesignifikantní pokles exprese *Abcg8*. Exprese mRNA sledovaných transkripčních faktorů zůstávala mezi skupinami W-OVX a W-SHAM srovnatelná a nevykazovala statisticky významné rozdíly.



Graf 20. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných ABC transportérů a transkripčních faktorů v tkáních tenkého střeva ovariectomizovaných samic potkana Wistar ve srovnání s kontrolní W-SHAM skupinou. Hodnoty relativní exprese mRNA jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině W-SHAM, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5$. * značí $p < 0,05$; ** označuje $p < 0,01$ ve srovnání s kontrolní skupinou W-SHAM [169].

5.18. Rozdíly v expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkanů Wistar, HHTg a SHR

Graf 21 znázorňuje relativní expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva. Výsledky relativní genové exprese jsou znázorněny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině Wistar, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. U skupiny HHTg byl zaznamenán signifikantní nárůst exprese genu *Ugt1a8* přibližně o 76 % ($p < 0,05$), ale nejvýraznější byl nesignifikantní nárůst *Ugt1a9* o 501 %. Absence statistické významnosti je dána pravděpodobně vysokou biovariabilitou v rámci skupiny. Ve skupině SHR byl pozorován trend ke snížení *Ugt1a8* a trend ke zvýšení *Gsta1*. Tyto změny však nedosáhly statistické signifikance. Expres ostatních enzymů druhé fáze biotransformace se mezi jednotlivými kmeny pohybovala v rozmezí interindividuální variability bez statisticky významných rozdílů.

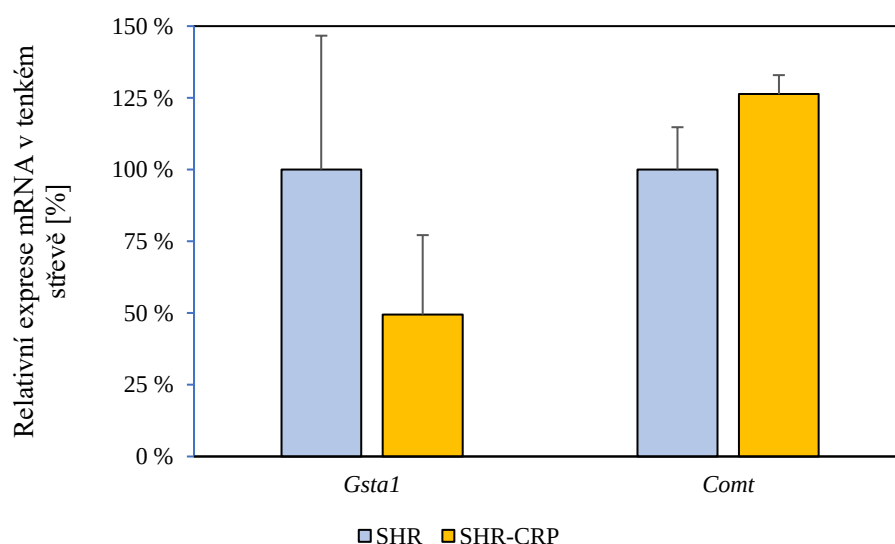
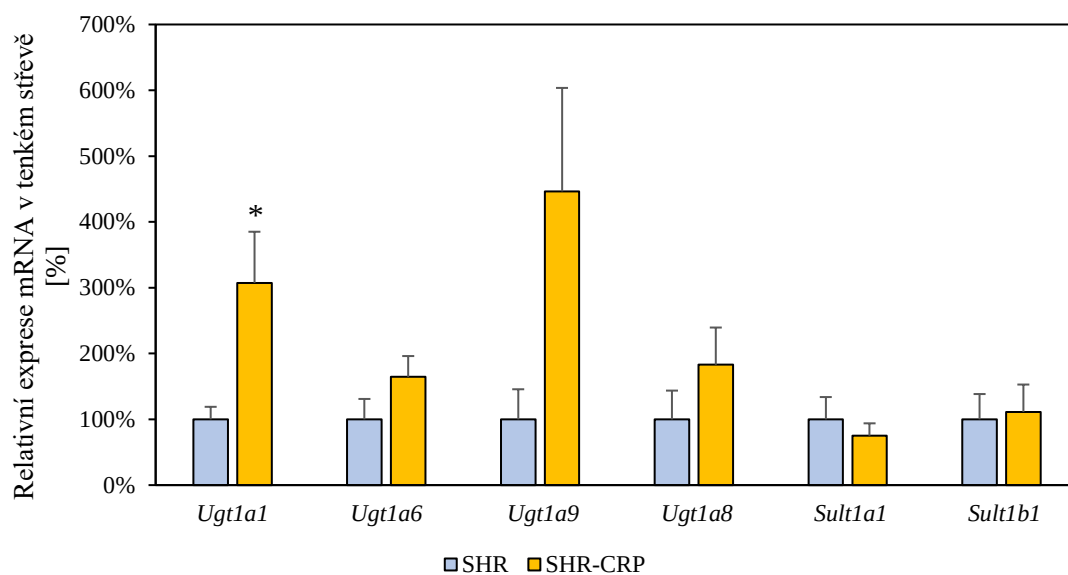


Graf 21. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkanů Wistar, HHTg a SHR. Hodnoty relativní exprese mRNA jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině Wistar, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5 - 6$. * označuje $p < 0,05$ ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar [169].

5.19. Vliv chronicky exprimovaného lidského C-reaktivního proteinu na expresi mRNA enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkana SHR

V grafu 22 jsou znázorněny změny v relativní expresi mRNA u vybraných forem enzymů druhé fáze v tkáních tenkého střeva transgenního potkana SHR-CRP vůči kontrolnímu kmeni SHR. Výsledky analýzy jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině SHR, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Ve skupině SHR-CRP bylo

pozorováno signifikantní zvýšení relativní exprese *Ugt1a1* o 207 % ($p < 0,05$) vůči kontrolní skupině. U enzymu *Ugt1a9*, podobně jako u HHTg, byl pozorován nárůst exprese o 301 %, ale tato změna nedosahovala statistické významnosti. U většiny z ostatních sledovaných genů rodin UGT a SULT byl ve skupině SHR-CRP pozorován pouze mírný trend ke zvýšení genové exprese bez dosažení statistické významnosti. Naopak u genů *Sult1a1* a *Gsta1* byl zaznamenán mírný trend ke snížení exprese mRNA. Celkově výsledky naznačují, že chronicky zvýšená exprese lidského CRP může ve střevní tkáni ovlivňovat expresi některých enzymů druhé fáze biotransformace. S výjimkou *Ugt1a1* se však jedná převážně o změny trendového charakteru, které se pohybují v rámci interindividuální variability.

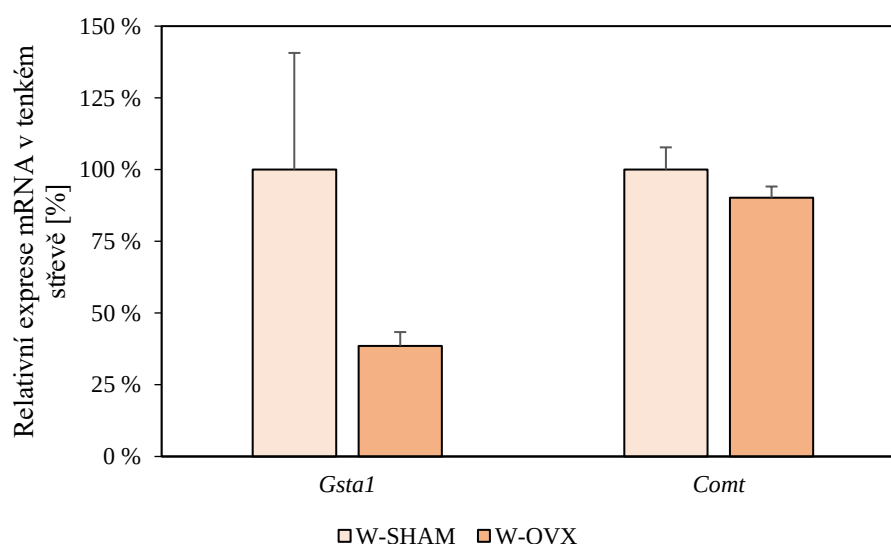
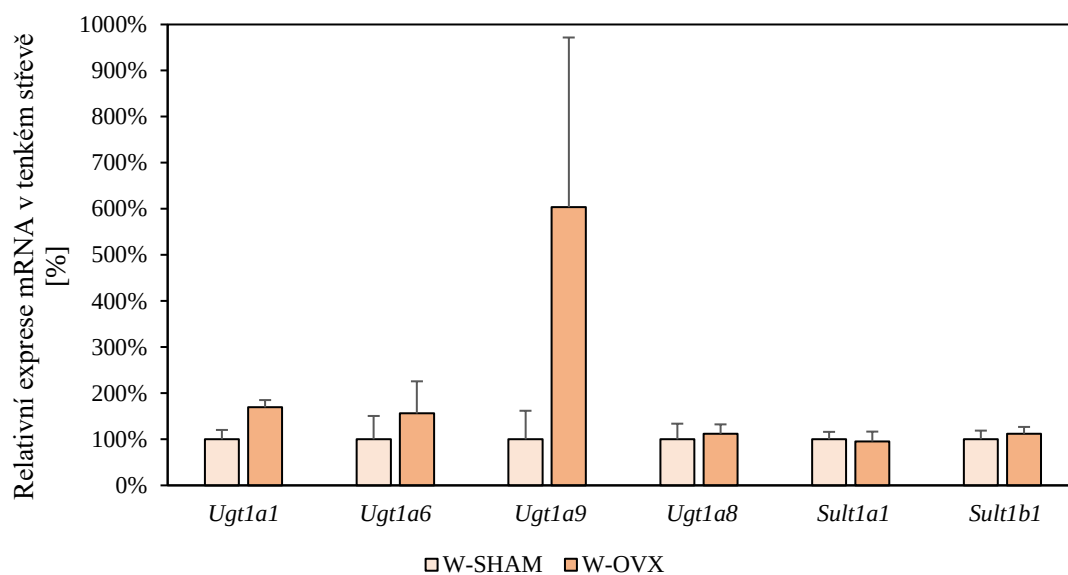


Graf 22. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkanů SHR-CRP ve srovnání s kontrolní skupinou SHR. Hodnoty relativní exprese mRNA jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině SHR, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5 - 6$. * označuje $p < 0,05$ ve srovnání s kontrolní skupinou SHR [169].

5.20. Vliv ovariektomie na expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkana Wistar

V grafu 23 jsou znázorněny změny v relativní genové expresi mezi skupinami W-OVX a W-SHAM. Výsledky jsou uvedeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině W-SHAM, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %.

Ve skupině W-OVX byl zaznamenán trend ke zvýšení relativní exprese mRNA enzymů *Ugt1a1* a *Ugt1a6*, ale podobně, jako u předchozích skupin, došlo, ačkoli bez statistické významnosti, k výraznému nárůstu *Ugt1a9* o 504 %. Tyto hodnoty opět doprovázela vysoká biovariabilita a nebylo dosaženo statistické signifikance. Gen *Gsta1* vykazoval trend ke snížení o přibližně 61,5 % vůči W-SHAM. Ostatní sledované geny nevykazovaly výrazné změny a pohybovaly se v rámci interindividuální variability.

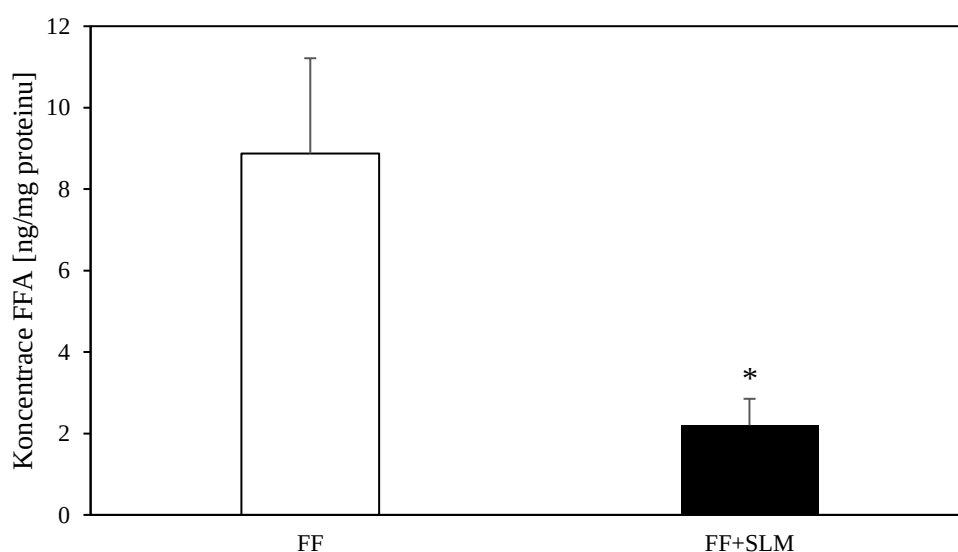


Graf 23. Rozdíly v relativní expresi mRNA vybraných enzymů druhé fáze biotransformace v tkáních tenkého střeva potkaních samic W-OVX ve srovnání s kontrolní skupinou W-SHAM. Hodnoty relativní exprese mRNA jsou vyjádřeny jako procentuální změna vůči kontrolní skupině W-SHAM, jejíž hodnoty byly normalizovány na 100 %. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5$. * označuje $p < 0,05$ ve srovnání s kontrolní skupinou W-SHAM [169].

5.21. Vliv suplementace silymarinem na jaterní distribuci kyseliny fenofibrové u potkanů HHTg

Srovnání koncentrace kyseliny fenofibrové v jaterní tkáni potkanů HHTg po podávání fenofibrátu v monoterapii a v kombinaci se silymarinem (FF+SLM) je znázorněno

v grafu 24. Získané absolutní hodnoty z LC-MS analýzy byly normalizovány na celkové množství jaterního proteinu. Výsledky odhalily statisticky významný rozdíl v tkáňové distribuci FFA. U zvířat léčených fenofibrátem v monoterapii dosahovala tkáňová expozice volné FFA průměrných hodnot $8,87 \pm 2,62$ ng/mg proteinu. Ve skupině s kombinovanou terapií (FF+SLM) byl naopak zaznamenán signifikantní pokles koncentrace na $2,20 \pm 0,73$ ng/mg proteinu ($p < 0,05$). Suplementace silymarinem tak vedla ke snížení tkáňové kumulace tohoto léčiva v játrech.



Graf 24. Rozdíly v koncentraci kyseliny fenofibrové v jaterním homogenátu potkanů HHTg. Hodnoty jsou vztaženy na celkové množství jaterního proteinu. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM, $n = 5$. * značí $p < 0,05$ ve srovnání se skupinou FF.

6. Diskuze

Metabolický syndrom představuje v současnosti jeden z nejkompexnějších patofyziologických stavů, který zahrnuje řadu faktorů vedoucích k rozvoji KVO a T2DM. Ačkoliv je MetS tradičně spojován s obezitou, klinická praxe i experimentální data stále častěji poukazují na existenci MetS rozvíjejícího se u jedinců s normální tělesnou hmotností [10]. LMS představuje diagnostickou i terapeutickou výzvu, neboť absence viditelné obezity může maskovat závažné metabolické dysregulace probíhající na buněčné a molekulární úrovni [170,171]. Patofyziologické mechanismy zahrnují poruchy inzulinové signalizace, změny v lipidovém metabolismu, hypertenzi a chronický systémový zánět [172].

Klíčovým aspektem, který dosud nebyl v kontextu LMS dostatečně prozkoumán, je dopad metabolických změn na schopnost organismu metabolizovat xenobiotika a endogenní látky. Játra a tenké střevo, jakožto primární orgány biotransformace, jsou vystaveny vysokým koncentracím lipidů, zánětlivých mediátorů a oxidačnímu stresu, což může zásadně modifikovat expresi a funkci enzymů první i druhé fáze biotransformace a rovněž transportérů. Tyto změny mají přímý dopad na farmakokinetiku podávaných léčiv, jejich účinnost a bezpečnost [173]. Předkládaná disertační práce se proto zaměřuje na komplexní analýzu molekulárního profilu klíčových biotransformačních systémů, CYP, konjugčních enzymů, ABC transportérů a transkripčních faktorů u unikátních neobézních potkaních modelů, které simulují jednotlivé komponenty MetS u člověka.

Cílem této práce je poskytnutí obrazu o tom, jak specifické patologické stavy, jako je dyslipidémie, arteriální hypertenze, chronický zánět či hormonální dysregulace po menopauze, ovlivňují transkripci a funkční kapacitu jater a tenkého střeva. Detailní chápání těchto mechanismů je nezbytné pro personalizaci farmakoterapie u pacientů trpících MetS, kteří často užívají kombinace hypolipidemik, antihypertenziv a dalších léčiv, a jsou tak vystaveni zvýšenému riziku lékových interakcí.

6.1. Molekulární profil proteinů zapojených do biotransformace v hypertriglyceridemickém stavu

Hypertriglyceridémie je celosvětově vysoce prevalentní porucha, která může postihovat až 25 % dospělé populace [174]. Jde o jeden z hlavních patogenetických faktorů MetS, který může vést k ektopické depozici lipidů v neadipózních tkáních. Lipotoxicita a lipoproteiny bohaté na TAG mohou být z hlediska aterogeneze dokonce významnější než LDL částice [175]. Potkaní kmen HHTg byl vyšlechtěn selektivním inbreedingem potkanů Wistar. Hlavní charakteristikou tohoto kmene je zvýšená hepatální produkce TAG. V rámci experimentální části této disertační práce byla u potkanů HHTg pozorována a potvrzena signifikantně zvýšená sérová koncentrace TAG ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar, viz tabulka 6 [169]. Tento model je v současnosti považován za dobře zavedený nástroj pro studium patogeneze a terapie MetS [141,142,176,177]. Oproti tomu, kmen SHR, další z modelů využívaných pro studium MetS, vykazoval nižší koncentrace TAG, celkového cholesterolu a HDL, a rovněž snížený index adipozity vůči kontrolní skupině Wistar. Důvodem může být deficeience v genu *Cd36*, který kóduje translokázu mastných kyselin [178]. Glykoprotein CD36 se vyskytuje v mnoha typech buněk, ale

nejvíce je exprimován v řasinkovém epitelu na membránách enterocytů, zejména pak v proximální části tenkého střeva. Jednou z funkcí je zprostředkování absorpce mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA) z potravy a jejich směřování k tvorbě chylomikronů. Snížení aktivity tohoto glykoproteinu může přispívat k nižším hodnotám lipidových částic u potkanů SHR. Aktuálně dostupná literatura však uvádí, že deficit CD36 nevede u lidí ani zvířat ke snížení, ale naopak může docházet ke zvýšení sérových TAG. V rámci kompenzačních mechanismů je možné, že dochází ke zvýšení aktivity jiných střevních transportérů, jako je protein transportující mastné kyseliny (FATP) a protein vázající mastné kyseliny (FABP), čímž je zastoupena absorpce LCFA při absenci CD36 [179–181].

CD36 se rovněž podílí na intestinální vstřebávání cholesterolu ze stravy. Bylo prokázáno, že absence proteinu CD36 snižuje absorpci cholesterolu v proximální části tenkého střeva až o 60 %, ale v distální části je tato absence kompenzována mnoha faktory, včetně pomalejšího vyprazdňování gastrointestinálního traktu, prodloužení tenkého střeva a přítomnosti dalších transportérů cholesterolu, jako je Niemann-Pick C1-like1 (NPC1L1) [182]. Tyto mechanismy pravděpodobně vysvětlují, proč lidé nebo zvířata s deficitem CD36 mají normální nebo zvýšenou sérovou koncentraci TAG a cholesterolu ve srovnání s jedinci s normální funkcí CD36. Nevysvětluje to však, proč potkanům SHR v experimentální části této disertační práce byla naměřena snížená koncentrace TAG, HDL a celkového cholesterolu v séru. Dalším možným vysvětlením by mohly být změny ve složení střevní mikroflóry. Literatura uvádí, že množství bakterií rodu *Bacteroides* je ve střevech potkanů SHR sníženo, zatímco bakterie z rodu *Bifidobacterium*, *Prevotella* a *Firmicutes* (*Bacillota*), jsou ve střevech téhož modelu potkanů abundantnější [183,184]. Siais a kol. zjistili, že mezi množstvím *Bacteroides* a TAG existuje ve vzorcích krve získaných od žen mírná pozitivní korelace. Také byla pozorována mírná negativní korelace mezi množstvím *Firmicutes* a poměrem *Firmicutes* / *Bacteroides* (poměr F/B) s koncentrací TAG u žen, kterým byla krev odebírána [185]. Za předpokladu, že potkani SHR měli zvýšený poměr F/B, tedy snížené množství *Bacteroides* a zvýšené množství *Firmicutes* v tenkém střevě, mohly být nižší koncentrace sérových lipidových částic způsobeny právě změnou ve střevní mikroflóře. Další rod střevních bakterií, *Lactobacillus*, je zodpovědný za produkci sloučenin spojovaných s downregulací exprese střevního NPC1L1 na úrovni mRNA a proteinu, a tím snižovat absorpci cholesterolu [184,186]. V rámci disertační práce však nebyla mRNA *Npc1l1* měřena, ale na základě údajů

z literatury lze předpokládat, že změny ve složení střevní mikroflóry mohou také vést ke snížení sérových koncentrací cholesterolu.

Výsledky experimentální části disertační práce také odhalily významné mezikmenové rozdíly v expresi enzymů biotransformace, transportérů a transkripčních faktorů na úrovni mRNA v jaterní tkáni, zejména snížení *Cyp1a2*, který je exprimován primárně v játrech a je zapojen do metabolismu přibližně 10 % klinicky využívaných léčiv, jako jsou β -blokátory, antidepresiva či kofein, a také se podílí na přeměně endogenních steroidních hormonů [187]. U této formy bylo pozorováno signifikantní snížení exprese mRNA o více než 80 % ($p < 0,01$). Tento trend se plně promítl i do funkční roviny, neboť relativní aktivita CYP1A2 v jaterních mikrozomech kmene HHTg vykazovala signifikantní snížení o více než 60 % vůči kontrole ($p < 0,01$). Doplnková analýza relativního množství proteinu však se snížením exprese mRNA nekorelovala a byl pozorován mírný trend ke zvýšení množství CYP1A2. Vztah mezi mRNA a proteinem není lineární a korelace mezi těmito strukturami je často nízká. Studie ukazují, že množství syntetizovaného proteinu nekopíruje změny v genové expresi, protože výsledné množství sledovaných proteinů významně ovlivňují posttranskripční procesy, jako je translace, translokace, posttranslační modifikace a proteolýza [188]. V případě kmene HHTg může být pozorované zvýšené množství proteinu způsobeno akumulací nefunkčního proteinu v důsledku zvýšeného oxidačního stresu spojeného s chronickou hypertriglyceridemií. Lipidová peroxidace může vést ke strukturním změnám apoproteinu enzymu, což snižuje jeho afinitu k substrátu nebo efektivitu přenosu elektronů z NADPH-CYPOR, přičemž imunoreaktivita proteinu zůstává zachována [189–191].

Výrazný pokles exprese a aktivity CYP1A2 lze dále dávat do souvislosti se změnami v regulaci na úrovni jaderných receptorů [192,193]. Ačkoliv u transkripčních faktorů *Ahr* (pokles o 37 %) a *Nr1i2* (pokles o 49 %) nebylo dosaženo statistické významnosti, snížená exprese těchto genů naznačuje narušení stability jaderných receptorů v patologickém prostředí jaterní tkáně [193,194]. AhR, jenž je dominantním regulátorem *Cyp1a2*, může, i při nesignifikantním trendu ke snížení exprese, vést ke změnám cílového genu [194]. Vztah mezi transkripčním faktorem AhR a výslednou expresí *Cyp1a2* není striktně lineární. Disproporce mezi mírným trendem k poklesu mRNA receptoru a signifikantním úbytkem v mRNA *Cyp1a2* pravděpodobně odráží sníženou vazebnou aktivitu AhR na specifické sekvence DNA, tzv. xenobiotic response elements, v důsledku lipotoxicity a oxidačního stresu [194]. Do tohoto procesu může zasahovat i jaderný receptor

PXR kódovaný genem *Nr1i2*. Přestože je PXR primárně spojován s rodinou CYP3A, jeho pokles mRNA může skrze vzájemné interference, tzv. crosstalk, s AhR a dalšími xeno-senzorovými jadernými receptory (CAR, PPAR α) dále přispívat k celkové poruše transkripční regulace jaterních CYP, a tím i k neschopnosti udržet bazální expresi *Cyp1a2* [195]. Hlavním faktorem způsobujícím zmíněné změny je pravděpodobně steatóza jater a s ní spojené metabolické změny, které narušují transkripční kapacitu pro *Cyp1a2* i jeho výslednou enzymovou aktivitu [193,196].

Další statisticky významná změna byla pozorována u genu *Cyp2d1*, který kóduje jeden z potkaních forem rodiny CYP2D [98]. Tyto enzymy dohromady představují funkční ortology lidského CYP2D6, který se podílí na metabolismu řady klinicky využívaných léčiv, zejména psychofarmak, β -blokátorů [197], a také metabolizuje endogenní neurosteroidy a monoaminové neurotransmitery, včetně dopaminu a serotoninu [198]. V jaterní tkáni kmene HHTg došlo k signifikantnímu nárůstu exprese mRNA o 135 % ($p < 0,01$) a také byl pozorován nesignifikanční trend ke snížení enzymové aktivity cca o 34 % vůči kontrolní skupině Wistar. Relativní enzymová aktivita byla stanovena pomocí Luminiscenčního kitu P450 GloTM optimalizovaného pro lidský CYP2D6. Kit byl v tomto případě využit pro stanovení souhrnné aktivity všech potkaních forem CYP2D. Tento přístup je metodologicky validní díky vysoké homologii aktivního místa napříč druhy a analogické afinitě luminiscenčního substrátu k potkaním ortologům [199]. Ning a Jeong pozorovali u myši s transgenním lidským CYP2D6 krmených dietou s vysokým obsahem tuků mírnou downregulaci jaterní mRNA CYP2D6 bez významných změn v množství proteinu či enzymové aktivitě [200]. Výsledky uvedené v disertační práci pak poukazují pravděpodobně na výskyt posttranslačních regulací [201]. Příkladem mohou být oxidační modifikace hemu či apoproteinu [202], nebo inhibice přítomnými endogenními metabolity, které se u hypertriglyceridemických potkanů akumulují a soutěží o aktivní místo enzymu [203].

Kromě forem *Cyp1a2* a *Cyp2d1* byl vliv hypertriglyceridemického stavu pozorován i u enzymové aktivity dalších proteinů. U kmene HHTg byl zaznamenán pokles aktivity enzymů z rodiny CYP2C o 67 % ve srovnání s kontrolou ($p < 0,05$). Rodina CYP2C představuje u savců jednu z nejdůležitějších skupin enzymů podílejících se na biotransformaci přibližně 20 % všech klinicky používaných léčiv, včetně perorálních antidiabetik, nesteroidních antiflogistik či antikoagulancií [92]. Dramatický pokles její aktivity tak představuje vysoké riziko pro toxickou kumulaci farmak a rozvoj nežádoucích účinků u

jedinců trpících dyslipidemií. Rodina CYP2C se také významně podílí na endogenním metabolismu kyseliny arachidonové a snížená aktivita těchto enzymů omezuje produkci epoxyeikosatrienových kyselin, jež mají prokazatelné vazodilatační, protizánětlivé a kardioprotektivní účinky [65]. Výrazný útlum aktivity CYP2C tak může u kmene HHTg přispívat nejen k alteraci farmakokinetiky, ale i k celkové progresi kardiovaskulárního poškození.

Výrazná alterace byla zaznamenána také u formy CYP3A. Při analýze luminiscenční metodou byla u kmene HHTg zjištěna relativní enzymová aktivita nacházející se mimo mez detekce. Tento hluboký propad však plně neodpovídal změnám detekovaným na translační úrovni, kde byl u CYP3A1 zaznamenán pouze mírný trend k poklesu relativního množství proteinu. Výrazné snížení katalytické aktivity CYP3A u kmene HHTg je nicméně v souladu s nezávislými měřeními provedenými alternativními analytickými přístupy, jako je HPLC [204], což potvrzuje, že se jedná o skutečný funkční útlum. Skutečnost, že u CYP3A klesl luminiscenční signál pod mez detekce, zatímco u ostatních analyzovaných forem (CYP1A2, CYP2C, CYP2D) byla aktivita měřitelná, lze odůvodnit kombinací biologických a fyzikálně-chemických faktorů. Prvním z nich je vlastnost samotného enzymu CYP3A1. Literatura uvádí, že lidský CYP3A4 prochází při vazbě na ligand drastickými konformačními změnami a vazebné místo se může zvětšit o více než 80 % [205]. Zároveň bylo prokázáno, že nad jeho aktivním místem se vyskytuje vysoce hydrofobní jádro složené z fenylyalaninových reziduí [205]. Tato strukturální plasticita v kombinaci s výraznou lipofilitou nad aktivním místem předurčuje potkaní enzymy rodiny CYP3A k vysoké afinitě vůči objemným lipofilním strukturám [206]. Ty představují nejen široké spektrum xenobiotik, ale především endogenní lipidy, žlučové kyseliny a steroidní hormony, jako je například testosteron nebo progesteron [207,208]. V prostředí těžké jaterní steatózy tak pravděpodobně může docházet k silnější kompetitivní inhibici nahromaděnými lipidy než u ostatních forem [196]. Druhým a zásadním faktorem je substrátově specifická analytická interference. Luminogenní proluciferinové substráty určené k detekci lidského CYP3A4, jako je Luciferin-IPA, jsou strukturně navrženy tak, aby odpovídaly nadprůměrné flexibilitě a hydrofobní povaze aktivního místa tohoto enzymu [209]. Ačkoliv jsou makroskopické tukové kapénky během izolace mikrozomů odstraněny, samotné membrány endoplazmatického retikula procházejí v podmínkách steatózy výraznou strukturální a lipidovou remodelací [210,211]. Změněné složení mikrozomálních membrán, obohacené o hydrofobnější lipidy a lipotoxické intermediáty, výrazně

zvyšuje jejich afinitu k lipofilním látkám. Může tak docházet k nesespecifickému vyvazování a retenci vysoce lipofilního substrátu přímo v těchto membránových strukturách. Extrémní snížení volné frakce substrátu ve vodné fázi následně vede k jeho faktickému znepřístupnění pro enzym [212]. U substrátů pro ostatní formy, které jsou relativně méně lipofilní, zůstává zachována alespoň částečná dostupnost. Tento jev představuje významný metodologický limit při testování vysoce lipofilních látek v *in vitro* modelech simulujících těžkou formou steatózy.

Významné změny byly rovněž pozorovány i v genové expresi enzymů druhé fáze biotransformace. Vybrané enzymy (UGT, SULT, GSTA1, COMT) katalyzují konjugaci funkčních skupin k metabolitům či xenobiotikům, čímž zvyšují hydrofilitu produktu reakce a usnadňují tím renální nebo hepatobiliární exkreci [100]. V případě MASLD a MetS vykazují tzv. bifázickou odpověď. V rané steatóze dochází k upregulaci těchto enzymů v rámci kompenzace, v pokročilé fibróze a nealkoholické steatohepatitidě (NASH) pak dochází k poklesu z důvodu lipotoxicity, hypoxie a dysregulace transkripčních faktorů [213]. V jaterní tkáni potkanů HHTg byl pozorován pokles mRNA *Ugt1a9* o 90 % ($p < 0,01$) vůči kontrolní skupině Wistar. Enzym UGT1A9 patří mezi jednu z hlavních potkaních forem podílejících se na glykosylaci širokého spektra endogenních i xenobiotických substrátů, čímž představuje významnou součást druhé fáze biotransformace [105,213]. V klinickém kontextu MASLD byla literaturou opakovaně popsána alterace exprese UGT forem, včetně downregulace UGT1A9 v pokročilých stádiích onemocnění [213]. Pozorovaný pokles mRNA *Ugt1a9* u HHTg potkanů lze interpretovat jako součást remodelace biotransformačních mechanismů v podmínkách hypertriglyceridémie [193,213]. Snížená exprese *Ugt1a9* může odrážet adaptivní odpověď hepatocytů na chronickou metabolickou zátěž, která potenciálně modifikuje konjuganční kapacity ještě před plným projevem NASH [213–215]. Dalším signifikantním snížením exprese o 68 % byl postižen gen *Comt* ($p < 0,05$). COMT katalyzuje reakce degradující zejména katecholaminy a estrogeny [114]. Tento enzym může hrát v patofyziologii MetS významnou roli jako enzym, který je zapojen do konverze methioninu na homocystein [114,216] a participuje tak nepřímo v metabolismu kyseliny listové [216]. Zvýšené množství homocysteinu je spojováno se zvýšeným rizikem rozvoje KVO [216], poruchami kognice a demence [217]. Downregulace *Comt* v jaterní tkáni potkanů HHTg může být jednou z příčin snížené glukózové tolerance, která je jednou z charakteristických vlastností modelu HHTg, což bylo pozorováno i v rámci této disertační práce, viz tabulka 6.

V kontrastu s downregulací *Ugt1a9* a *Comt* byl v jaterní tkáni potkanů HHTg zaznamenán výrazný nárůst exprese *Sult1a1* (96 %; $p < 0,01$) a *Sult1b1* (177 %; $p < 0,01$). Formy rodiny SULT1 katalyzují sulfataci širokého spektra endogenních substrátů, včetně steroidních a thyroïdních hormonů, a současně se podílejí na biotransformaci řady xenobiotik [218]. V kontextu s modelem hypertriglyceridémie lze nárůst exprese mRNA form *Sult1a1* a *Sult1b1* spojovat se selektivní remodelací druhé fáze biotransformace, kdy jsou tyto geny, dle Hardwick a kol. v rané steatóze upregulovány a v pokročilejších stádiích NASH downregulovány [213]. Xie a Xie však upozorňují na možnost, že rozdíly v expresi forem SULT mohou být závislé na mnoha faktorech, jako je věk, fáze steatózy, pohlaví, aj [219].

V rámci experimentální části této disertační práce byly pozorovány nesignifikanční trendy v regulaci genů zapojených do regulace cholesterolové homeostázy. V analýze byl pozorován trend k upregulaci *Cyp7a1* a k downregulaci *Abcg5* a *Abcg8*. Tyto nálezy korelují se studií Orolina a kol., kde byl kmen HHTg porovnáván s kmenem Wistar-Kyoto. Dle jejich studie spočívá mechanismus v downregulaci heterodimerního ABCG5/8 a snížení transportu sterolů. Tím je zvýšeno množství cholesterolu v játrech, které stimuluje expresi CYP7A1 [176]. V disertační práci tato pozorování korelují s naměřenými biochemickými parametry, kdy hladiny cholesterolu v séru i v jaterní tkáni potkanů HHTg zůstaly srovnatelné s kontrolou. Absence statistické významnosti u exprese mRNA těchto genů je pravděpodobně důsledkem vysoké interindividuální variability v rámci modelu HHTg.

V tenkém střevě, které představuje klíčovou presystémovou metabolickou bariéru, byl zaznamenán, oproti jaterní tkáni, odlišný profil exprese. Je známo, že distribuce biotransformačních enzymů CYP podél celého tenkého střeva není rovnoměrná a plynule se mění [81]. Z tohoto důvodu byl odběr tkáně prováděn vždy konzistentně ve střední části tenkého střeva. I přesto vykazovaly výsledky v rámci skupiny vysokou variabilitu, což je pravděpodobně způsobeno analýzou relativně malého úseku intestinální tkáně.

U potkanů kmene HHTg byl pozorován trend ke zvýšení exprese mRNA u genů *Cyp1a1*, *Cyp2d1*, *Cyp2c6*, *Cyp2e1* a *Cyp7a1* ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar i s kmenem SHR. Toto zvýšení nedosáhlo statistické významnosti, což lze vysvětlit právě zmíněnou variabilitou vzorkování. Analýza genové exprese v tenkém střevě však odhalila signifikantní nárůst exprese u klíčových transkripčních faktorů, jmenovitě *Ahr* (regulující např. CYP1A2), *PXR* (*Nr1i2*; regulátor CYP1A2 či CYP2C6) a *CAR* (*Nr1i3*, regulující

CYP1A2) ve srovnání s kontrolní skupinou [220]. Aktivace xenosenzorů se rovněž promítla do druhé fáze biotransformace, kde byl zaznamenán signifikantní nárůst *Ugt1a8* a masivní, ačkoliv nesignifikantní, nárůst *Ugt1a9*. Tyto změny v expresi mRNA biotransformačních enzymů a transkripčních faktorů mohou být úzce spjaty s odlišným složením střevní mikroflóry u hypertriglyceridemického modelu. Vliv intestinálního mikrobiomu na expresi CYP na úrovni mRNA i proteinu byl již popsán v předchozích studiích (např. Zemanová a kol., Wang a kol.) [220–222]. Zvýšené hladiny mRNA intestinálních enzymů naměřené u potkanů HHTg naznačují, že by tento model mohl být velmi užitečný pro budoucí studium lékových interakcí v tenkém střevě, ať už v přímé souvislosti se střevní mikroflórou, nebo samotným metabolickým syndromem, jelikož exprese mRNA CYP byla v této tkáni u HHTg potkanů lépe detekovatelná a měřitelná. Pro definitivní potvrzení vhodnosti tohoto modelu pro zmíněné studie bude však nezbytné tyto výsledky z úrovně transkripce doplnit o měření na úrovni exprese proteinů.

6.2. Molekulární profil proteinů zapojených do metabolismu léčiv ve stavu hypertenze

V rámci disertační práce byl pozorován vliv hypertenze na biotransformační systémy u vybraných modelů MetS. Přestože jsou pro studium tohoto komplexního onemocnění vhodné všechny tři analyzované kmeny, v parametrech krevního tlaku vykazují značné rozdíly [178,223]. Zatímco u potkanů HHTg bylo zaznamenáno pouze mírné zvýšení krevního tlaku, kmen SHR vykazoval signifikantně vyšší hodnoty. Lemmer a kol. uvádí hodnoty krevního tlaku až 176/123 mmHg u kmene SHR, což je ve srovnání s normotenzním kmenem Wistar-Kyoto, 116/79 mmHg, zásadní rozdíl, činící kmen SHR vhodným modelem pro studium izolovaného vlivu hypertenze [223].

K rozvoji hypertenze přispívá oxidační stres indukovaný ROS. Na produkci těchto radikálů se podílí CYP1B1, který je v játrech ve velmi nízkých koncentracích [224], a proto v rámci experimentální části nebyl analyzován. Pozornost byla přesměrována na formu CYP2E1, která rovněž generuje ROS a jejíž exprese mRNA vykazovala u kmene SHR v jaterní tkáni trend k nárůstu oproti kontrolní skupině Wistar. Zvýšená aktivita CYP2E1 je typická pro stavy spojené s obezitou a IR [225], avšak její silná prooxidační povaha může i u neobézních hypertoniků prohlubovat endoteliální dysfunkci a cévní rezistenci, a tím fixovat hypertenzní stav [226,227]. U kmene HHTg nebyla v genu *Cyp2e1* oproti kontrolní skupině Wistar pozorována výrazná změna.

Z hlediska farmakokinetiky jsou zásadní zjištění týkající se enzymů podílejících se na metabolismu léčiv kardiovaskulárního systému. Významná asociace s esenciální hypertenzí byla popsána u lidských enzymů CYP3A4 a CYP2D6. V souladu s tím byla v jaterní tkáni potkanů SHR v rámci této práce zaznamenána signifikantní upregulace mRNA *Cyp3a23* a rovněž *Cyp2d1*. Zvýšená exprese *Cyp2d1* byla detekována i u kmene HHTg. Tyto změny na úrovni transkripce mohou úzce souviset s patofyziologií hypertenze. Současně byla u potkanů SHR v játrech zaznamenána statisticky významná upregulace genu *Cyp2c6*. Jedním z možných fyziologických vysvětlení tohoto nárůstu může být zapojení enzymů rodiny CYP2C do endogenního metabolismu kyseliny arachidonové, ze které vznikají epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs). Tyto molekuly jsou v odborné literatuře široce popisovány jako silné endotel-dependentní vazodilatátory s kardioprotektivními a protizánětlivými účinky [65]. Zvýšená exprese genů podrodiny *Cyp2c* u hypertenzních modelů bývá dávána do souvislosti s kompenzační odpovědí organismu na vysokou cévní rezistenci, což podporují i studie prokazující podíl potkaních forem CYP2C na regulaci krevního tlaku [93]. Lze tedy uvažovat, že upregulace *Cyp2c6* u kmene SHR může úzce souviset s touto adaptivní fyziologickou reakcí na probíhající hypertenzní stav.

Zajímavým nálezem u kmene SHR je nesoulad mezi transkripční a translační úrovní u vybraných forem. Ačkoliv u genů *Cyp3a23* a *Cyp2d1* došlo k nárůstu mRNA, na úrovni relativního množství proteinu byl zaznamenán opačný trend. Absence korelace mezi těmito buněčnými produkty není v biologických systémech neobvyklá. Vztah mezi mRNA a proteinem není lineární a výsledné množství sledovaných enzymů významně ovlivňují posttranskripční procesy, jako je regulace translace či stabilita proteinu [188]. Podobně i naměřená enzymová aktivita (např. trend k nárůstu u CYP3A vs. pokles u CYP2D) reflektuje komplexní povahu posttranslačních modifikací a možnou interferenci endogenních metabolitů v patologickém prostředí jater v prostředí chronické hypertenze. Ke zkreslení finální aktivity mohou navíc přispívat i protein-proteinové interakce, známé například mezi ortology CYP3A a CYP2C, které modulují stabilitu a katalytickou aktivitu zúčastněných enzymů [228].

V regulaci genové exprese zmíněných biotransformačních enzymů hrají klíčovou roli transkripční faktory. U obou experimentálních kmenů (SHR i HHTg) byl v jaterní tkáni zaznamenán trend k poklesu mRNA proteinu PXR, *Nr1i2*. Snížená produkce transkripčních faktorů může být jedním z mechanismů vedoucích k redukci exprese

některých cílových genů, což bylo v jaterní tkáni potkanů SHR pozorováno u signifikantní downregulace *Cyp1a2* (pokles o 70 %) a *Cyp2a1*. Na rozdíl od hypertriglyceridemického modelu se však hypertenze potkanů SHR nepromítla do výrazných změn u enzymů druhé fáze biotransformace. To může znamenat, že adaptace jaterní tkáně na chronickou hypertenzi probíhá selektivněji a zasahuje spíše enzymy první fáze biotransformace.

Specifickou adaptaci u kmene SHR bylo možné pozorovat také v regulaci cholesterolové homeostázy. U tohoto kmene byly v rámci experimentu zaznamenány signifikantně nižší hladiny sérového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar (viz tabulka 6). Tento systémový deficit může představovat signál, na který jaterní tkáň reaguje snahou o retenci sterolů. To by vysvětlovalo, ačkoliv vlivem biologické variability nesignifikantní, trend k poklesu exprese mRNA efluxních transportérů *Abcg5* (o 75 %) a *Abcg8* (o 85 %). Tyto transportéry za fyziologických podmínek tvoří heterodimer zodpovědný za exkreci jaterního cholesterolu do žluče [229]. Tato snaha o konzervaci intracelulárního cholesterolu je dále podpořena pozorovaným úbytkem proteinu formy CYP7A1. Vzhledem k tomu, že CYP7A1 představuje limitující enzym pro metabolismus cholesterolu na žlučové kyseliny [230], jeho downregulace pravděpodobně přispívá k omezení ztrát cholesterolu a doplňuje tak celkový obraz adaptace kmene SHR na hypocholesterolemii.

Změny v množství biotransformačních proteinů mají přímý klinický dopad na farmakoterapii hypertenze, kterou trpí až 80 % pacientů s MetS a u nichž je běžně aplikována kombinovaná léčba zvyšující riziko lékových interakcí [172]. Alterace exprese a aktivity enzymů u kmene SHR, zejména upregulace *Cyp3a23* a *Cyp2d1*, může zásadně modifikovat účinek podávaných antiarytmik či β -blokátorů, zatímco změny v *Cyp2c6* mohou ovlivnit účinnost klopidoogrelu [63,231].

Odlišný profil byl, podobně jako u kmene HHTg, detekován v tkáních tenkého střeva. U kmene SHR zde byla naměřena významně zvýšená exprese transkripčního faktoru *Ahr* (o 34 %). Na rozdíl od jater však intestinální tkáň u většiny sledovaných forem CYP nevykazovala statisticky významné změny. Tento nesoulad mezi orgány naznačuje existenci tkáňově specifické regulace biotransformace v podmínkách chronické hypertenze a zdůrazňuje roli intestinální bariéry v presystémovém metabolismu [77,83].

6.3. Molekulární profil proteinů zapojených do biotransformace ve stavu chronického zánětu

Metabolický syndrom je doprovázen charakteristickým nízkostupňovým systémovým zánětem. Jedním z nejlépe popsanych biomarkerů tohoto stavu je CRP, který se aktivně podílí na rozvoji mnoha patologických rysů MetS [150]. Vzhledem k tomu, že lidský CRP, na rozdíl od potkaního, dokáže u potkanů aktivovat komplement a působí silně prozánětlivě, představuje transgenní kmen SHR-CRP unikátní model pro studium izolovaného vlivu chronického zánětu na pozadí esenciální hypertenze [150]. Porovnáním tohoto kmene s jeho genetickým pozadím, kmenem SHR, lze přesně izolovat vliv chronického zánětu na regulaci metabolismu [150].

V jaterní tkáni potkanů SHR-CRP byla exprese většiny sledovaných genů rodiny CYP srovnatelná s výchozím kmenem SHR. Z literatury je známo, že zánětlivé stavy a přítomnost CRP typicky vedou k downregulaci cytochromů P450, často prostřednictvím modulace mikroRNA [232]. Tomuto supresivnímu vlivu odpovídají i funkční data získaná v této práci, kdy chronická expozice lidského CRP vedla u transgenního kmene k mírnému útlumu katalytické aktivity enzymu CYP3A ve srovnání s výchozím kmenem SHR. Tento útlum však nebyl tak markantní, jak by se u chronického zánětu dalo předpokládat. Klíčem k tomuto udržení relativně vysoké biotransformační kapacity je pravděpodobně adaptivní odpověď na úrovni transkripčních faktorů. U kmene SHR-CRP byl zaznamenán statisticky významný nárůst exprese mRNA *Nr1i3* (oproti kmeni SHR, $p < 0,05$). CAR, společně s PXR, představuje klíčový senzor pro regulaci xenobiotického i endogenního metabolismu [233]. Lze tedy konstatovat, že i přes přítomnost chronického zánětu, který mívá na expresi cytochromů tlumivý efekt, zůstává biotransformační kapacita CYP3A u kmene SHR-CRP zachována na relativně vysoké úrovni. Tento stav může úzce souviset právě se zjištěnou upregulací transkripčního faktoru CAR.

Kromě metabolismu xenobiotik stojí za pozornost také vliv chronického zánětu na regulaci cholesterolové homeostázy. V jaterní tkáni potkanů SHR-CRP byl zaznamenán zřetelný trend ke zvýšení exprese mRNA formy *Cyp7a1*. Ačkoliv tento nárůst nedosáhl vlivem vysoké interindividuální variability statistické významnosti, biologicky koresponduje s naměřenými biochemickými parametry. Jak bylo uvedeno výše, transgenní kmen SHR-CRP vykazoval signifikantně vyšší koncentrace sérového cholesterolu a TAG ve srovnání s výchozím kmenem SHR (viz tabulka 6). Vzhledem k tomu, že CYP7A1 představuje limitující enzym pro metabolismus cholesterolu na žlučové kyseliny [230],

pozorovaný trend k jeho upregulaci pravděpodobně odráží fyziologickou snahu jaterní tkáň kompenzovat nastupující dyslipidemii a urychlit eliminaci nadbytečných sterolů.

Zatímco geny enzymů první fáze biotransformace si v prozánětlivém prostředí částečně zachovávají svou expresní kapacitu, u genů enzymů konjugací fáze byl v jaterní tkáni zaznamenán odlišný dopad. U potkanů SHR-CRP došlo k signifikantnímu poklesu exprese mRNA konjugacího enzymu *Ugt1a1*. Výrazný úbytek mRNA byl pozorován i u genu *Ugt1a9*, kde došlo k downregulaci o více než 70 % oproti SHR. Tento propad však, pravděpodobně vlivem vysoké interindividuální variability, nedosáhl statistické významnosti. Tyto formy jsou nezbytné pro glykosylaci bilirubinu a řady endogenních i exogenních látek. Jejich downregulace naznačuje, že chronický zánět může v játrech selektivně snižovat detoxikační kapacitu druhé fáze, což by mohlo vést ke zpomalené clearance a zvýšenému riziku toxicity podávaných farmak.

Zcela odlišná a nejvýraznější adaptační odpověď na stav chronického zánětu však byla zaznamenána v tenkém střevě. V intestinální tkáni byl u transgenických potkanů pozorován nárůst exprese klíčových xenosenzorů – signifikantní upregulace *Nr1i2* (130 %, $p < 0,01$) a výrazný trend k nárůstu *Nr1i3* (325 %). Tato aktivace jaderných receptorů se přímo promítla do regulace druhé fáze biotransformace, kde byl ve střevě zaznamenán zrcadlově opačný efekt než v játrech. V intestinální tkáni byl pozorován signifikantní nárůst exprese *Ugt1a1* o 207 % ($p < 0,05$) a výrazný trend k nárůstu *Ugt1a9* o 301 % vůči skupině SHR.

Zatímco o vlivu zánětu na jaterní biotransformaci existuje literatura [63,232], jeho dopad na intestinální metabolismus je dosud prozkoumán jen okrajově. Získaná data naznačují existenci silné tkáňově specifické odpovědi. Zatímco v játrech zánět expresi glykosylačních enzymů tlumí, tenké střevo reaguje na prozánětlivé signály lidského CRP posílením své enzymatické bariéry. Zvýšená kapacita střevní glykosylace, zprostředkovaná upregulací *Ugt1a1* a *Ugt1a9*, by mohla představovat lokální obranný mechanismus zabráňující vstřebávání potenciálně toxických látek z lumen střeva do systémové cirkulace v podmínkách zánětem narušené slizniční imunity. V klinické praxi by tato intestinální upregulace mohla zásadně snižovat biologickou dostupnost perorálně podávaných léčiv, která podléhají presystémové glukuronidaci v enterocytech.

6.4. Molekulární profil proteinů zapojených do biotransformace v postmenopauzálním stavu

Prevalence MetS se u žen v postmenopauzálním období téměř zdvojnásobuje, což z hormonálního činí jeden z klíčových rizikových faktorů pro rozvoj metabolických a kardiovaskulárních onemocnění [234]. Pro studium patogeneze menopauzou indukovaného MetS a objevování nových terapeutických přístupů představují ovariektomizované potkaní samice spolehlivý a hojně využívaný experimentální model [153]. Jak potvrzují biometrická a biochemická data získaná v rámci této disertační práce, chirurgické odstranění ovarií vedlo u samic k signifikantnímu nárůstu tělesné hmotnosti, indexu adipozity, akumulaci jaterních TAG a ke zvýšení množství sérového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou W-SHAM.

Z hlediska první fáze biotransformace byl v jaterní tkáni samic W-OVX pozorován zřetelný trend ke snížení exprese *Cyp1a2* a jeho transkripčního faktoru Ahr. Toto experimentální pozorování rezonuje s klinickými daty Tsiokou a kol., kteří pozorovali *in vivo* pokles enzymové aktivity CYP1A2 u postmenopauzálních žen ve srovnání s premenopauzálními [235]. Tyto výsledky naznačují, že útlum exprese a aktivity CYP1A2 může být asociován se ztrátou ovariální funkce a s ní spojenými metabolickými a hormonálními změnami v postmenopauzálním období. Podobný trend k poklesu exprese mRNA byl pozorován také u forem *Cyp3a23* a *Cyp7a1*. Jak již bylo diskutováno u předchozích modelů, formě CYP7A1 náleží limitující role v přeměně cholesterolu na žlučové kyseliny. Downregulace *Cyp7a1* u W-OVX dobře koresponduje s naměřenými biochemickými parametry, kdy tato zvířata vykazovala statisticky významný nárůst množství sérového cholesterolu, viz tabulka 6. Snížená jaterní kapacita pro metabolismus sterolů tak může představovat jeden z faktorů přispívajících k rozvoji postmenopauzální hypercholesterolemie. Forma CYP3A1, která je kódována genem *Cyp3a23*, vykazovala trend ke zvýšení množství proteinu. Absence korelace může být způsobena v postmenopauzálním modelu komplexními posttranskripčními a posttranslačními mechanismy, jako je například odlišná stabilita translátu nebo snížená rychlost degradace proteinu v prostředí narušené metabolické homeostázy a zvýšeného množství lipidů [188,210]. Oproti downregulaci forem *Cyp3a23* a *Cyp7a1* byl pozorován trend ke zvýšení relativního množství mRNA *Cyp2b1* a *Cyp2a2*. V případě *Cyp2b1* lze upregulaci uvést do souvislosti s trendem ke zvýšení exprese genu *Nr1i3*. Tento náleží je v souladu s literaturou zabývající se pohlavním dimorfismem jaterních enzymů, kde je naznačováno, že ovariální estrogény za

fyziologických podmínek vykazují supresivní vliv na aktivitu CAR a expresi jeho cílových genů [236]. Ztráta estrogenů po ovariectomii tak pravděpodobně vede k uvolnění této inhibice. Zvýšená exprese CAR navíc může odrážet kompenzační snahu jaterních buněk posílit alternativní detoxikační dráhy v odpovědi na steatózu indukovanou ztrátou ovariálních hormonů [237]. Tento předpoklad je navíc podpořen analýzou na úrovni proteinu, kde byl v jaterních mikrozomech W-OVX pozorován korespondující trend ke zvýšení relativního množství proteinu CYP2B1. Na rozdíl od výše zmíněné formy CYP3A1 zde byla pozorována přímá korelace mezi mRNA a proteinem, což naznačuje, že regulace CYP2B1 probíhá v tomto modelu primárně na transkripční úrovni řízené jadernými receptory.

Zatímco u první fáze biotransformace byly pozorovány obousměrné transkripční i translační změny, ztráta funkce ovarií se významně promítla do regulace druhé fáze metabolismu látek. V jaterní tkáni byla nejvýraznějším nálezem selektivní downregulace *Ugt1a6* o 53 % ($p < 0,05$), *Ugt1a9* o 46 % ($p < 0,05$) a *Gsta1* o 26 % ($p < 0,05$). Pozorovaný stav exprese mRNA poukazuje na ztrátu hepatoprotektivního vlivu estrogenů. Současná literatura uvádí, že ovariální hormony za fyziologických podmínek udržují jaterní redoxní homeostázu a stimulují expresi antioxidantních a konjugčních enzymů prostřednictvím aktivace signální dráhy *Nrf2* [238]. Absence estrogenů u modelu W-OVX tak může vést k narušení této signální dráhy, což v kombinaci s nastupující jaterní steatózou a lokální lipotoxicitou vede k prooxidačnímu fenotypu [239,240] a systematickému oslabení detoxikační kapacity druhé fáze biotransformace. Ačkoliv data z této disertační práce poskytují vhled do molekulární patogeneze postmenopauzálního stavu, pro definitivní hodnocení funkčního dopadu na konjugční reakce by v navazujících studiích bylo žádoucí korelovat zjištěné změny s analýzou funkční kapacity enzymů a analýzou enzymů na úrovni proteinu. Rutinní stanovení metodou Western blot však v současnosti naráží na objektivní metodické limity spojené s vysokou zkříženou reaktivitou a obtížnou dostupností specifických protilátek pro jednotlivé potkaní formy rodin druhé fáze biotransformace [241,242].

Vliv postmenopauzálního hormonálního deficitu se neomezuje pouze na jaterní metabolismus, ale významně zasahuje i do funkce intestinální bariéry. V tenkém střevě, které představuje bariéru presystémové eliminace xenobiotik a absorpce živin, byla pozorována při analýze genové exprese specifická adaptace na ztrátu ovariálních hormonů. Z hlediska statistické významnosti a přímého klinického dopadu je nejzásadnějším

zjištěním signifikantní upregulace genu *Abcb1* (120 %; $p < 0,05$), kódujícího efluxní transportér P-glykoprotein (P-gp). Modulační vliv pohlavních hormonů na expresi P-gp je v literatuře dlouhodobě studován. Data *in vivo* modelu W-OVX jsou v souladu s předpokladem, že estrogeny za fyziologických podmínek mají na *Abcb1* represivní vliv [243,244]. Chirurgická ovariectomie a s ní spojený deficit estradiolu tak může vést k uvolnění této inhibice a overexpresi P-gp v tkáni tenkého střeva [243,244]. Vzhledem k tomu, že P-gp představuje primární efluxní pumpu pro široké spektrum běžně užívaných léčiv, může jeho zvýšená intestinální aktivita u postmenopauzálních žen kriticky snižovat perorální biologickou dostupnost podávaných farmak [243]. Tento molekulární mechanismus jasně zdůrazňuje nutnost přehodnocení dávkovacích schémat, a to zejména u léčiv s úzkým terapeutickým indexem [243].

Dalším významným výsledkem je transkripční odpověď efluxních transportérů pro steroly. Obecně přijímaný model předpokládá, že proteiny ABCG5 a ABCG8 fungují jako obligátní heterodimer [128,245]. Jejich genová exprese by proto měla být za fyziologických podmínek regulována, primárně prostřednictvím jaderného receptoru LXR v reakci na zvýšený přísun cholesterolu [246]. Data získaná v rámci této disertační práce ovšem tento předpoklad v podmínkách estrogenního deficitu zpochybňují. U genu *Abcg5* došlo k signifikantní upregulaci (124 %; $p < 0,05$), jeho partnerský gen *Abcg8* ovšem vykazoval opačný trend směřující k poklesu. Tato asymetrická transkripční odpověď naznačuje, že ztráta ovariálních hormonů dokáže standardní koregulaci obou transportérů narušit. Zvýšenou expresi samotného *Abcg5* lze interpretovat jako extrémní kompenzační mechanismus enterocytů. Střevní bariéra se tímto způsobem pravděpodobně snaží aktivně omezit absorpci sterolů do krevního oběhu a lokálně tak čelit rozvíjející se postmenopauzální hypercholesterolemii.

Odpověď intestinální tkáně na hormonální deficit se částečně projevila i v regulaci enzymů první a druhé fáze biotransformace, ačkoliv získaná data byla zatížena značnou interindividuální variabilitou. U forem *Cyp1a1*, *Cyp2c6* a konjugačního enzymu *Ugt1a9* byl pozorován trend ke zvýšení genové exprese, gen *Gsta1* naopak vykazoval trend k poklesu. Tento profil částečně kontrastuje s jaterní tkání, která na hormonální deficit zareagovala převážně downregulací. Pozorovaný orgánový dimorfismus naznačuje, že regulace intestinálních biotransformačních enzymů nemusí být v tomto modelu závislá pouze na systémovém úbytku estrogenů. K modulaci exprese může významně přispívat i alterace střevního mikrobiomu a s ním spojeného metabolismu žlučových kyselin.

Literatura uvádí, že dysbalance jaterního metabolismu sterolů navozená ovariektomií vede ke změně mikrobiálního osídlení střeva a modifikaci složení secernovaných žlučových kyselin [247]. Tyto endogenní metabolity mají schopnost působit jako ligandy pro jaderné receptory enterocytů (např. PXR či FXR) a potenciálně tak indukovat kompenzační reakce v enterocytech [248]. Vysoký rozptyl naměřených hodnot u těchto genů pak pravděpodobně odráží přirozenou citlivost střevního traktu na lokální faktory a individuální rozdíly v adaptaci jednotlivých zvířat na probíhající metabolické změny.

6.5. Vliv suplementace silymarinem na jaterní distribuci kyseliny fenofibrové u potkanů HHTg

Fenofibrát představuje jedno z nejčastěji předepisovaných hypolipidemik, které se v klinické praxi využívá primárně k terapii hypertriglyceridémie a smíšené dyslipidémie [22,25]. Terapie fenofibrátem u pacientů s MetS a MASLD může být v klinické praxi limitována rizikem mírné hepatotoxicity a elevací jaterních transamináz [25,48]. V klinické praxi je proto běžným postupem kombinovat tuto léčbu s užíváním hepatoprotektiv, přičemž nejčastěji voleným doplňkem je silymarin [46]. Ačkoliv se souběžné užívání fenofibrátu a silymarinu jeví z klinického hlediska jako synergické a bezpečné, jejich vzájemné farmakokinetické interakce na úrovni cílových tkání nebyly dosud plně objasněny.

Pro posouzení těchto interakcí přímo v místě hlavního metabolismu obou látek, tedy jaterní tkáni, byla v rámci této disertační práce optimalizována metoda LC-MS pro kvantifikaci kyseliny fenofibrové. Z důvodu vysoké komplexity biologické matrice byla validita měření zajištěna použitím bezafibrátu jako vnitřního standardu. Kalibrační křivka vykazovala linearitu v definovaném koncentračním rozsahu ($R^2 > 0,997$). Pro objektivní porovnání byly zjištěné absolutní koncentrace analytu následně normalizovány na množství celkového jaterního proteinu. Při analýze jaterní tkáně potkanů HHTg byly pozorovány statisticky významné změny v koncentracích FFA. U zvířat léčených fenofibrátem v monoterapii (25 mg/kg tělesné hmotnosti) dosahovala tkáňová expozice volné kyselině fenofibrové průměrných hodnot $8,87 \pm 2,62$ ng/mg proteinu. Ve skupině s kombinovanou terapií (FF+SLM) došlo k signifikantnímu poklesu koncentrace na $2,20 \pm 0,73$ ng/mg proteinu ($p < 0,05$). Suplementace silymarinem tedy vedla ke snížení kumulace tohoto léčiva v játrech. Tento *in vivo* výsledek z jaterní tkáně je částečně v rozporu s předpokladem, že silymarin, jakožto inhibitor efluxních transportérů (např. P-gp) [107,162], povede

k buněčné kumulaci xenobiotik. Tento fenomén lze však vysvětlit komplexním působením silymarinu. Jedním z mechanismů, kterými silymarin uplatňuje svůj komplexní hepatoprotektivní účinek, je modulace biotransformačních enzymů druhé fáze, především forem z rodiny UGT [107]. Glukuronidace představuje primární eliminační cestu kyseliny fenofibrové z hepatocytů [106] a silymarin tak pravděpodobně významně urychluje lokální metabolismus kyseliny fenofibrové a její následnou exkreci do žluči.

Z farmakologického hlediska je tento nález vysoce relevantní. Snížená tkáňová expozice volné kyselině fenofibrové nabízí nový úhel pohledu na interakci obou látek. Lze uvažovat o tom, že tento farmakokinetický posun v jaterní tkáni může představovat jeden z dílčích faktorů, kterým silymarin přispívá k lepší tolerabilitě léčby fenofibrátem. Data z této disertační práce tak otevírají prostor pro další výzkum, který by detailněji objasnil, jak tato modifikace tkáňové distribuce koreluje s celkovým terapeutickým a bezpečnostním profilem léčby u pacientů s metabolickým syndromem.

6.6. Limitace práce

Přestože tato disertační práce poskytuje komplexní pohled na molekulární regulace biotransformačních systémů u zvířecích modelů MetS, je nutné získaná data interpretovat v kontextu několika metodologických a biologických limitací. Prvním a zcela zásadním faktorem je samotné využití zvířecích modelů, jejichž data nelze kompletně extrapolovat na lidský organismus. Ačkoliv použité neobézní kmeny představují vysoce validní nástroje pro studium patofyziologie metabolického syndromu, superrodina CYP i enzymy druhé fáze vykazují jistou míru rozdílnosti. Mezi druhové rozdíly se projevují jak v expresi odlišných forem, tak v jejich substrátové specifitě a regulaci [90,93,98]. Z tohoto důvodu je nutné nahlížet na zjištěné farmakokinetické interakce jako na mechanistický *in vivo* důkaz, jehož přesný dopad u člověka vyžaduje další ověření v klinické praxi. Tato biologická limitace je dále umocněna relativně nízkým počtem zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách ($n = 5-7$). Tento počet byl na jedné straně striktně limitován snahou o dodržení etických principů 3R (Replacement, Reduction, Refinement) pro práci s laboratorními zvířaty [134], ze statistického hlediska by však robustnost analýz benefitovala z větších souborů. Vzhledem ke značné interindividuální variabilitě nabyla řada pozorovaných fyziologických změn pouze charakteru trendů, aniž by dosáhla požadované hranice statistické významnosti. Vyšší počet biologických replikátů by mohl tyto trendy s konečnou platností potvrdit. Významnou limitací při zpracování biologického materiálu

byla nemožnost provést plnohodnotnou funkční analýzu a kvantifikaci na úrovni proteinu v tkáních tenkého střeva. Tento krok byl zásadně limitován extrémně nízkým výtěžkem mikrozomální frakce z tkáně tenkého střeva, což omezilo hodnocení této presystémové bariéry pouze na analýzu genové exprese. Samotná analýza mRNA z tenkého střeva navíc vykazovala značnou biologickou variabilitu, která pravděpodobně odráží anatomickou a funkční heterogenitu při odběru relativně malých úseků tkáně. Další významný metodologický limit představovalo hodnocení enzymů druhé fáze biotransformace na úrovni proteinu. Zavedení rutinního stanovení metodou Western blot u zkoumaných potkaních forem naráží na absenci vysoce specifických komerčních protilátek a na vysokou míru zkřížené reaktivity mezi příbuznými členy rodin enzymů. Významným analytickým zjištěním při studiu první fáze biotransformace pak byla interference u luminiscenčních testů. V prostředí jaterní steatózy, typické pro model HHTg [48,234], dochází pravděpodobně k nespecifické retenci vysoce lipofilních luminogenních substrátů v mikrozomálních membránách. Tento jev může zkreslovat reálnou katalytickou aktivitu enzymu, což se projevilo zejména u forem s objemným vazebným místem, jakým je rodina CYP3A [208,235]. Identifikace a popsání těchto limitů nicméně nesnižuje platnost hlavních zjištění, ale poskytuje nezbytný kontext pro jejich interpretaci a otevírá prostor pro metodologickou optimalizaci v navazujících preklinických farmakologických studiích.

7. Závěr

Předkládaná disertační práce poskytuje komplexní pohled na molekulární změny biotransformačních systémů a transportérů u vybraných neobézních potkaních modelů metabolického syndromu. Výsledky potvrzují, že jednotlivé patofyziologické komponenty tohoto onemocnění modulují expresi a aktivitu sledovaných proteinů vysoce specifickým a tkáňově odlišným způsobem. U modelu HHTg byl prokázán útlum jaterní biotransformační kapacity, zejména u forem rodiny CYP1A a CYP2C, jenž byl doprovázen down-regulací vybraných konjugčních enzymů. Tento stav představuje významné riziko pro farmakokinetické interakce a toxickou kumulaci léčiv. Naopak adaptace na chronickou hypertenzi u kmene SHR se projevila selektivní upregulací jaterních CYP3A, CYP2D a CYP2C, což pravděpodobně odráží kompenzační snahu organismu o zvýšení produkce vazodilatačních eikosanoidů.

Přítomnost chronického nízkostupňového zánětu u transgenního modelu SHR-CRP indukovala silnou tkáňově specifickou odpověď. Zatímco v játrech došlo

k potlačení genů glykosylace, v tenkém střevě byla exprese této detoxikační dráhy významně posílena prostřednictvím aktivace jaderných receptorů. Obdobně orgánově specifická reakce byla pozorována u modelu postmenopauzálního stavu, W-OVX. Zde v důsledku absence estrogenů byl pozorován útlum jaterní antioxidační a konjugací kapacity, přičemž v tenkém střevě došlo k signifikantní indukci genu pro efluxní transportér P-gp, který může mít negativní dopad na biologickou dostupnost perorálně podávaných léčiv.

V navazující farmakologické části práce bylo prokázáno, že suplementace silymarinem signifikantně snižuje tkáňovou kumulaci kyseliny fenofibrové v játrech potkana HHTg. Tento náález naznačuje, že urychlení eliminace aktivního metabolitu fenofibrátu cestou glukuronidace může představovat jeden z mechanismů, kterým silymarin přispívá k lepší tolerabilitě této hypolipidemické léčby. Získaná data tak celkově zdůrazňují nezbytnost zohledňovat individuální metabolický fenotyp při optimalizaci farmakoterapie.

8. Souhrn

Tato disertační práce se zabývá studiem změn v expresi a aktivitě vybraných enzymů biotransformace, transportérů a transkripčních faktorů v játrech a tenkém střevě u neobéznicích potkaních modelů metabolického syndromu. Metabolický syndrom představuje komplexní patologický stav charakterizovaný poruchami metabolismu lipidů a glukózy, hypertenzí a chronickým nízkostupňovým zánětem, což jsou faktory schopné ovlivňovat farmakokinetiku léčiv a metabolismus endogenních látek. Cílem práce bylo komplexně zhodnotit, jak jednotlivé komponenty metabolického syndromu (hypertriglyceridémie, hypertenze, chronická exprese lidského C-reaktivního proteinu a hormonální deficit navozený ovariektomií) ovlivňují expresi a funkci klíčových enzymů 1. a 2. fáze biotransformace léčiv, transkripčních faktorů a vybraných ABC transportérů.

Experimentální část práce byla provedena na potkanech kmenů Wistar, HHTg, SHR, SHR-CRP a na ovariektomizovaných samicích Wistar. V rámci experimentální části byla analyzována relativní exprese mRNA vybraných forem CYP, enzymů 2. fáze biotransformace (UGT, SULT, GST a COMT), ABC transportérů a jaderných receptorů v jaterní a intestinální tkáni. Současně byla stanovena relativní enzymová aktivita vybraných forem CYP v jaterních mikrozomech. Genová exprese byla vyhodnocena metodou RT-qPCR, enzymová aktivita pomocí luminiscenčních testů a LC/MS metod, přičemž získaná data byla statisticky zpracována standardními postupy.

Výsledky práce ukázaly, že jednotlivé modely metabolického syndromu vykazují odlišné a modelově specifické změny v expresi a aktivitě biotransformačních enzymů. U potkanů kmene HHTg byly v játrech zaznamenány významné změny v expresi vybraných forem CYP, zejména výrazné snížení exprese *Cyp1a2* a signifikantní změny v expresi genů *Cyp2d1* a *Cyp2c6*. U hypertenzního modelu SHR byla detekována upregulace genů zapojených do metabolismu kyseliny arachidonové, zatímco transgenní exprese lidského CRP vedla k divergentní regulaci konjugčních enzymů mezi játry a střevní tkání. Ovariectomie u samic Wistar způsobila pokles jaterní detoxikační kapacity a zvýšení intestinální exprese efluxního transportéru P-glykoproteinu. Poslední část práce potvrdila, že suplementace silymarinem u potkanů HHTg snižuje jaterní kumulaci kyseliny fenofibrové, pravděpodobně cestou aktivace enzymů druhé fáze biotransformace. Výsledky přispívají k objasnění mechanismů, kterými metabolický syndrom modifikuje biotransformační systémy a farmakokinetiku léčiv.

9. Summary

This dissertation thesis focuses on the study of changes in the expression and activity of selected drug biotransformation enzymes, transporters, and transcription factors in the liver and small intestine of non-obese rat models of metabolic syndrome. Metabolic syndrome represents a complex pathological condition characterized by lipid and glucose metabolism disorders, hypertension, and chronic low-grade inflammation, which are factors capable of influencing drug pharmacokinetics and the metabolism of endogenous substances. The aim of this work was to comprehensively evaluate how individual components of metabolic syndrome (hypertriglyceridemia, hypertension, chronic expression of human C-reactive protein, and ovariectomy-induced hormonal deficit) affect the expression and function of key phase I and phase II biotransformation enzymes, transcription factors, and selected ABC transporters.

The experimental part of the study was conducted on Wistar, HHTg, SHR, and SHR-CRP rat strains, and on ovariectomized Wistar females. Within the experimental part, the relative mRNA expression of selected CYP forms, phase II biotransformation enzymes (UGT, SULT, GST, and COMT), ABC transporters, and nuclear receptors was analyzed in the hepatic and intestinal tissues. Concurrently, the relative enzyme activity of selected CYP forms in hepatic microsomes was determined. Gene expression was evaluated using the RT-qPCR method, and enzyme activity was assessed via luminescent

assays and LC/MS methods, with the acquired data being statistically processed using standard procedures.

The results of the study demonstrated that individual models of metabolic syndrome exhibit distinct and model-specific changes in the expression and activity of biotransformation enzymes. In HHTg rats, significant changes in the expression of selected CYP forms were observed in the liver, particularly a marked decrease in *Cyp1a2* expression and significant changes in the expression of *Cyp2d1* and *Cyp2c6* genes. In the SHR model, the upregulation of genes involved in arachidonic acid metabolism was detected, whereas the transgenic expression of human CRP led to a divergent regulation of conjugation enzymes between the liver and intestinal tissue. Ovariectomy in Wistar females caused a decline in hepatic detoxification capacity and an increase in the intestinal expression of the efflux transporter P-glycoprotein. The final part of the study confirmed that silymarin supplementation in HHTg rats reduces the hepatic accumulation of fenofibric acid, likely via the activation of phase II biotransformation enzymes. The results contribute to elucidating the mechanisms by which metabolic syndrome modifies biotransformation systems and drug pharmacokinetics.

10. Seznam publikací, které jsou součástí této disertační práce

10.1. Původní vědecké publikace v časopise s IF

Soukop J, Rácová Z, Kazdová L, Zapletalová I, Poruba M, Malínská H, Hüttl M, Marková I, Nováková K, Večeřa R. Differences in mRNA Expression of Selected Cytochrome P450, Transporters and Nuclear Receptors Among Various Rat Models of Metabolic Syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2025 Aug;137(2):e70075. doi: 10.1111/bcpt.70075. PMID: 40616279; PMCID: PMC12227904. (Q2)

Soukop J, Kazdová L, Hüttl M, Malínská H, Marková I, Oliarynyk O, Miklánková D, Gurská S, Rácová Z, Poruba M, Večeřa R. Beneficial Effect of Fenofibrate in Combination with Silymarin on Parameters of Hereditary Hypertriglyceridemia-Induced Disorders in an Animal Model of Metabolic Syndrome. *Biomedicines*. 2025 Jan 16;13(1):212. doi: 10.3390/biomedicines13010212. PMID: 39857794; PMCID: PMC11763318. (Q2)

Vecera R, Poruba M, Hüttl M, Malinska H, Oliarynyk O, Markova I, Racova Z, **Soukop J**, Kazdova L. Beneficial Effect of Fenofibrate and Silymarin on Hepatic Steatosis and Gene Expression of Lipogenic and Cytochrome P450 Enzymes in Non-Obese Hereditary

Hypertriglyceridemic Rats. Curr Issues Mol Biol. 2022 Apr 26;44(5):1889-1900. doi: 10.3390/cimb44050129. PMID: 35678658; PMCID: PMC9164080. (Q3)

10.2. Přehledové vědecké publikace

Soukop J, Večeřa R. Vybrané polyfenolické látky a jejich použití jako podpůrná terapie metabolického syndromu. Čes. slov. farm. 2022;71(4):135-139. doi: 10.5817/CSF2022-4-135. (Q3)

Soukop J, Večeřa R. Aktuální poznatky ve výzkumu silymarinu a jeho komponent. Klin Farmakol Farm. 2022;36(4):146-9. (Q4)

10.3. Abstrakta a příspěvky na konferencích

Soukop J, Poruba M, Večeřa R. Vliv fenofibrátu a silymarinu na vybrané enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik v játrech potkaního modelu SHR-CRP. 71. Česko-slovenské farmakologické dny. Plzeň 14-16.6. 2023

Soukop J, Večeřa R. Rozdíly v genové expresi vybraných cytochromů P450 u potkaních modelů metabolického syndromu vyšlechtěných z kmene Wistar. 1. společná konference farmakologických společností 2024. Ostrava 13-15.6. 2024.

Soukop J. Metabolic Syndrome may alter effects of nootropic drugs. V4 International Nootropics Conference. Szeged (Maďarsko) 12-14.11. 2024.

Kubíčková V, **Soukop J**, Rychlíčková J. Problematika stanovení kolistinu a CMS. 2023. 23. Česká konference klinické farmakologie, Olomouc, 7. - 9. září 2023. Vybraná abstrakta z 23. české konference klinické farmakologie, str. 7. ISSN 1803-5353.

Kubíčková V, **Soukop J**, Rychlíčková J, Urbánek K. Determination of colistin A and B in human plasma: Application for verification of adsorption on the ECMO circuit and TDM. 2022. EACPT.

10.4. Práce nesouvisející s disertační prací

Kubíčková V, **Soukop J**, Rychlíčková J. Stanovení kolistinu A, B a kolistin-methanesulfonátu v lidské plazmě pomocí LC-MS/MS a jejich krátkodobá stabilita v plazmě. Klin Farmakol Farm. 2023;37(3):89-92. doi: 10.36290/far.2023.016. (Q4).

11. Seznam literatury

1. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; And international association for the study of obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
2. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2017;11(8):215. doi:10.1177/1753944717711379
3. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2005;112(17):2735-2752. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404
4. Pecani M, Andreozzi P, Cangemi R, et al. Metabolic Syndrome and Liver Disease: Re-Appraisal of Screening, Diagnosis, and Treatment Through the Paradigm Shift from NAFLD to MASLD. *J Clin Med*. 2025;14(8):2750. doi:10.3390/JCM14082750
5. Peterseim CM, Jabbour K, Kamath Mulki A. Metabolic Syndrome: An Updated Review on Diagnosis and Treatment for Primary Care Clinicians. *J Prim Care Community Health*. 2024;15:21501319241309170. doi:10.1177/21501319241309168
6. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Accessed June 2, 2025. <https://iris.who.int/handle/10665/66040>
7. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Med*. 2011;9(1):1-13. doi:10.1186/1741-7015-9-48
8. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(2):12. doi:10.1007/S11906-018-0812-Z
9. Al-Hamad D, Raman V. Metabolic syndrome in children and adolescents. *Transl Pediatr*. 2017;6(4):397. doi:10.21037/TP.2017.10.02
10. Sanyal D. Lean Metabolic Syndrome: An Emerging Concept. *Indian J Endocrinol Metab*. 2018;22(3):301. doi:10.4103/2230-8210.236782

11. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133. doi:10.1152/PHYSREV.00063.2017
12. Reaven GM. The insulin resistance syndrome: Definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:391-406. doi:10.1146/ANNUREV.NUTR.24.012003.132155
13. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017;542(7640):177-185. doi:10.1038/NATURE21363
14. Drabczyk M, Kosyra K, Magda I, Marczyńska Z, Zyśk A. Insulin resistance and metabolic diseases - a review. *Journal of Education, Health and Sport.* 2024;61:186-199. doi:10.12775/JEHS.2024.61.012
15. Reaven G. Insulin resistance and coronary heart disease in nondiabetic individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1754-1759. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241885
16. McEvoy JW, McCarthy CP, Bruno RM, et al. 2024 ESC Guidelines for the management of elevated blood pressure and hypertension: Developed by the task force on the management of elevated blood pressure and hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and endorsed by the European Society of Endocrinology (ESE) and the European Stroke Organisation (ESO). *Eur Heart J.* 2024;45(38):3912-4018. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAE178
17. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J.* 2018;39(33):3021-3104. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHY339
18. Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J.* 2020;41(1):111-188. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHZ455
19. Jacobsen AP, Whelton SP, Blumenthal RS, Mcevoy JW. Dyslipidemia. *Hypertension: A Companion to Braunwald's Heart Disease.* Published online March 4, 2024;476-488. doi:10.1016/B978-0-323-88369-6.00042-6

20. Berberich AJ, Hegele RA. A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr Rev.* 2021;43(4):611. doi:10.1210/ENDREV/BNAB037
21. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko A V., Orekhov AN. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1273042. doi:10.1155/2017/1273042
22. Canfora I, Pierno S. Hypertriglyceridemia Therapy: Past, Present and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol 25, Page 9727. 2024;25(17):9727. doi:10.3390/IJMS25179727
23. Elkeles R. Fibrates: past history or renaissance? *British Journal of Diabetes.* 2023;23(2):65-68. doi:10.15277/BJD.2023.415
24. Kim NH, Kim SG. Fibrates Revisited: Potential Role in Cardiovascular Risk Reduction. *Diabetes Metab J.* 2020;44(2):213-221. doi:10.4093/DMJ.2020.0001
25. Sidhu G, Tripp J. Fenofibrate. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* Published online March 13, 2023:1-6. doi:10.1016/B978-008055232-3.61742-8
26. Fenofibric Acid | C₁₇H₁₅ClO₄ | CID 64929 - PubChem. Accessed June 26, 2025. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fenofibric-Acid>
27. Fenofibrate: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online. Accessed June 27, 2025. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01039>
28. Tzeng J, Byun J, Park JY, et al. An ideal PPAR response element bound to and activated by PPAR α . *PLoS One.* 2015;10(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0134996
29. Karahashi M, Hoshina M, Yamazaki T, et al. Fibrates Reduce Triacylglycerol Content by Upregulating Adipose Triglyceride Lipase in the Liver of Rats. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(4):356-370. doi:10.1254/JPHS.13149FP
30. Poruba M, Matuskova Z, Hüttl M, et al. Fenofibrate decreases hepatic P-glycoprotein in a rat model of hereditary hypertriglyceridemia. *Front Pharmacol.* 2019;10(FEB):56. doi:10.3389/FPHAR.2019.00056
31. The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities. <https://www.chromatographyonline.com/view/essence-modern-hplc-advantages-limitations-fundamentals-and-opportunities>
32. Li G, Yang F, Liu M, Su X, Zhao M, Zhao L. Development and application of a UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of fenofibric acid and

- berberine in rat plasma: Application to the drug-drug pharmacokinetic interaction study of fenofibrate combined with berberine after oral administration in rats. *Biomedical Chromatography*. 2016;30(7):1075-1082. doi:10.1002/BMC.3652
33. Martemucci G, Fracchiolla G, Muraglia M, Tardugno R, Dibenedetto RS, D'Alessandro AG. Metabolic Syndrome: A Narrative Review from the Oxidative Stress to the Management of Related Diseases. *Antioxidants*. 2023;12(12):2091. doi:10.3390/ANTIOX12122091
 34. Zhou HH, Tang YL, Xu TH, Cheng B. C-reactive protein: structure, function, regulation, and role in clinical diseases. *Front Immunol*. 2024;15:1425168. doi:10.3389/FIMMU.2024.1425168
 35. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009;84(21-22):705-712. doi:10.1016/J.LFS.2009.02.026
 36. Masenga SK, Kabwe LS, Chakulya M, Kirabo A. Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9):7898. doi:10.3390/IJMS24097898
 37. Muntaha ST, Rakha A, Rasheed H, et al. Polyphenol-protein particles: A nutraceutical breakthrough in nutrition and food science. *J Agric Food Res*. 2025;19:101641. doi:10.1016/J.JAFR.2025.101641
 38. Puri V, Nagpal M, Singh I, et al. A Comprehensive Review on Nutraceuticals: Therapy Support and Formulation Challenges. *Nutrients*. 2022;14(21):4637. doi:10.3390/NU14214637
 39. De la Fuente MF, Souto A, Albuquerque UP, Schiel N. Self-medication in nonhuman primates: A systematic evaluation of the possible function of the use of medicinal plants. *Am J Primatol*. 2022;84(11):e23438. doi:10.1002/AJP.23438
 40. Fahed G, Aoun L, Zerdan MB, et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 786. 2022;23(2):786. doi:10.3390/IJMS23020786
 41. McClements DJ, Li F, Xiao H. The nutraceutical bioavailability classification scheme: Classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2015;6(Volume 6, 2015):299-327. doi:10.1146/ANNUREV-FOOD-032814-014043

42. Mishra A, Pradhan D, Biswasroy P, Kar B, Ghosh G, Rath G. Recent advances in colloidal technology for the improved bioavailability of the nutraceuticals. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2021;65:102693. doi:10.1016/J.JDDST.2021.102693
43. Muchiri RN, van Breemen RB. Chemical Standardization of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) Extract Using UHPLC-MS/MS and the Method of Standard Addition. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2024;35(8):1726-1732. doi:10.1021/JASMS.4C00125
44. Pourová J, Applová L, Macáková K, et al. The Effect of Silymarin Flavonolignans and Their Sulfated Conjugates on Platelet Aggregation and Blood Vessels Ex Vivo. *Nutrients*. 2019;11(10). doi:10.3390/NU11102286
45. Kim BR, Seo HS, Ku JM, et al. Silibinin inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B signaling pathway in HMC-1 human mast cells. *Inflammation Research*. 2013;62(11):941-950. doi:10.1007/S00011-013-0640-1
46. Seifert, Bohumil. Hepatoprotektiva a jejich využití ve všeobecné praxi. *Med. praxi*. 2019;16(1): 20-22. doi:10.36290/MED.2019.046
47. Shriram RG, Moin A, Alotaibi HF, et al. Phytosomes as a Plausible Nano-Delivery System for Enhanced Oral Bioavailability and Improved Hepatoprotective Activity of Silymarin. *Pharmaceuticals*. 2022;15(7). doi:10.3390/PH15070790
48. Oliyarnyk O, Markova I, Malinska H, et al. Micronized silymarin extract reduced hepatotoxic effect of fenofibrate in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Atherosclerosis*. 2018;275:e195. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.601
49. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules* 2017, Vol 22, Page 191. 2017;22(2):191. doi:10.3390/MOLECULES22020191
50. Sharma U, Sahni PK, Sharma B, et al. Silymarin: a promising modulator of apoptosis and survival signaling in cancer. *Discover Oncology*. 2025;16(1):1-12. doi:10.1007/S12672-025-01800-3
51. Koeberle SC, Thürmer M, Su F, et al. Silybin A from *Silybum marianum* reprograms lipid metabolism to induce a cell fate-dependent class switch from triglycerides to phospholipids. *Theranostics*. 2025;15(5):2006-2034. doi:10.7150/THNO.99562

52. Rourke JL, Sinal CJ. Biotransformation/Metabolism. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. Published online January 1, 2014:490-502. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00007-5
53. Anzenbacher P, Zanger UM. Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Published online June 4, 2012. doi:10.1002/9783527630905
54. Švihovec J, Bultas J, Anzenbacher P, Chládek J, Příborský J, Slíva J, Votava M. *Farmakologie*. Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
55. Appendix: Drug Metabolizing Enzymes and Biotransformation Reactions. *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development*. Published online April 20, 2012:545-565. doi:10.1002/9781118180778.APP1
56. Cook DJ, Finnigan JD, Cook K, Black GW, Charnock SJ. Cytochromes P450: History, Classes, Catalytic Mechanism, and Industrial Application. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2016;105:105-126. doi:10.1016/BS.APCSB.2016.07.003
57. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1958;75(2):376-386. doi:10.1016/0003-9861(58)90436-3
58. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 9th edition | AccessPharmacy | McGraw Hill Medical. 2018. ISBN 1259863743.
59. P.B. Danielson BSP. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab*. 2002;3(6):561-597. doi:10.2174/1389200023337054
60. Ahn T, Yun CH. Molecular mechanisms regulating the mitochondrial targeting of microsomal cytochrome P450 enzymes. *Curr Drug Metab*. 2010;11(10):830-838. doi:10.2174/138920010794479655
61. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, et al. The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA Cell Biol*. 1993;12(1):1-51. doi:10.1089/DNA.1993.12.1
62. Gront D, Syed K, Nelson DR. Exploring P450 superfamily diversity with P450Atlas - Online tool for automated subfamily assignment. *Protein Science*. 2025;34(3):e70057. doi:10.1002/PRO.70057

63. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138(1):103-141. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2012.12.007
64. Carrothers S, Trevisan R, Jayasundara N, et al. An epigenetic memory at the CYP1A gene in cancer-resistant, pollution-adapted killifish. *Sci Rep.* 2025;15(1):1-16. doi:10.1038/S41598-024-82740-W
65. Chen C, Wang DW. Cytochrome P450-CYP2 Family-Epoxygenase Role in Inflammation and Cancer. *Adv Pharmacol.* 2015;74:193-221. doi:10.1016/BS.APHA.2015.04.005
66. Zhang Y, Wang Z, Wang Y, et al. CYP3A4 and CYP3A5: the crucial roles in clinical drug metabolism and the significant implications of genetic polymorphisms. *PeerJ.* 2024;12(12):e18636. doi:10.7717/PEERJ.18636
67. Prueksaritanont T, Richards KM, Qiu Y, et al. Comparative effects of fibrates on drug metabolizing enzymes in human hepatocytes. *Pharm Res.* 2005;22(1):71-78. doi:10.1007/S11095-004-9011-5
68. Guttman Y, Yedidia I, Nudel A, Zhmykhova Y, Kerem Z, Carmi N. New grapefruit cultivars exhibit low cytochrome P4503A4-Inhibition activity. *Food and Chemical Toxicology.* 2020;137:111135. doi:10.1016/J.FCT.2020.111135
69. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets.* 2017;19(1):38-54. doi:10.2174/1389450118666170125144557
70. Zhou M, Li J, Xu J, Zheng L, Xu S. Exploring human CYP4 enzymes: Physiological roles, function in diseases and focus on inhibitors. *Drug Discov Today.* 2023;28(5):103560. doi:10.1016/J.DRUDIS.2023.103560
71. Chen F, Liang RR, Zhang J, Kang R, Tang D, Liu J. CYP51A1 in health and disease: from sterol metabolism to regulated cell death. *Cell Death Discovery* 2025 11:1. 2025;11(1):1-15. doi:10.1038/s41420-025-02621-7
72. Munro AW, McLean KJ, Grant JL, Makris TM. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(1):183-196. doi:10.1042/BST20170218
73. Guengerich FP. Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations. *ACS Catal.* 2018;8(12):10964-10976. doi:10.1021/ACSCATAL.8B03401

74. Matušková MZ. Cytochromy P450 - hlavní enzymy metabolismu léčiv: studium vlastností těchto enzymů v gastrointestinálním traktu potkana a jejich ovlivnění probiotiky. Published online 2015.
75. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138(1):103-141. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2012.12.007
76. Van Herwaarden AE, Wagenaar E, Van Der Kruijsen CMM, et al. Knockout of cytochrome P450 3A yields new mouse models for understanding xenobiotic metabolism. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3583-3592. doi:10.1172/JCI33435
77. Thelen K, Dressman JB. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2009;61(5):541-558. doi:10.1211/JPP.61.05.0002
78. Renaud HJ, Cui JY, Khan M, Klaassen CD. Tissue Distribution and Gender-Divergent Expression of 78 Cytochrome P450 mRNAs in Mice. *Toxicological Sciences.* 2011;124(2):261-277. doi:10.1093/TOXSCI/KFR240
79. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis.* 2017;21(1):1-20. doi:10.1016/J.CLD.2016.08.001
80. Cyp3a23-3a1 (cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 23-polypeptide 1) - Rat Genome Database. Accessed October 4, 2023. <https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=628626>
81. Mitschke D, Reichel A, Fricker G, Moenning U. Characterization of cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(6):1039-1045. doi:10.1124/DMD.107.019687
82. Back DJ, Rogers SM. Review: first-pass metabolism by the gastrointestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther.* 1987;1(5):339-357. doi:10.1111/J.1365-2036.1987.TB00634.X
83. Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;27(2-3):161-170. doi:10.1016/S0169-409X(97)00041-0
84. Hossam Abdelmonem B, Abdelaal NM, Anwer EKE, et al. Decoding the Role of CYP450 Enzymes in Metabolism and Disease: A Comprehensive Review. *Biomedicines* 2024, Vol 12, Page 1467. 2024;12(7):1467. doi:10.3390/BIOMEDICINES12071467

85. Mir O, Blanchet B, Goldwasser F. Drug-Induced Effects on Erlotinib Metabolism. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(4):379-380. doi:10.1056/NEJMC1105083
86. Qian Z, Chen L, Liu J, Jiang Y, Zhang Y. The emerging role of PPAR-alpha in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;161:114420. doi:10.1016/J.BIOPHA.2023.114420
87. Deodhar M, Al Rihani SB, Arwood MJ, et al. Mechanisms of CYP450 Inhibition: Understanding Drug-Drug Interactions Due to Mechanism-Based Inhibition in Clinical Practice. *Pharmaceutics* 2020, Vol 12, Page 846. 2020;12(9):846. doi:10.3390/PHARMACEUTICS12090846
88. Kuhn UD, Schröter D, Gaßler N, Tautenhahn HM, Settmacher U, Lupp A. CYP1A2 expression and activity in a large panel of human nonneoplastic surgical liver samples: Influence of genetics, lifestyle, and other factors. *Drug Metabolism and Disposition*. 2025;53(8):100111. doi:10.1016/J.DMD.2025.100111
89. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013;368(1612):20120431. doi:10.1098/RSTB.2012.0431
90. Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006;2(6):875-894. doi:10.1517/17425255.2.6.875
91. Gerges SH, El-Kadi AOS. Sexual Dimorphism in the Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Rat Heart, Liver, Kidney, Lung, Brain, and Small Intestine. *Drug Metabolism and Disposition*. 2023;51(1):81-94. doi:10.1124/DMD.122.000915
92. Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52(4):349. doi:10.1046/J.0306-5251.2001.01499.X
93. Liu W, Sui D, Ye H, Ouyang Z, Wei Y. CYP2C11 played a significant role in down-regulating rat blood pressure under the challenge of a high-salt diet. *PeerJ*. 2019;2019(4):e6807. doi:10.7717/PEERJ.6807
94. Endo M, Takahashi Y, Sasaki Y, Saito T, Kamataki T. Novel Gender-Related Regulation of CYP2C12 Gene Expression in Rats. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(5):1181-1190. doi:10.1210/ME.2004-0063

95. Wright MC, Edwards RJ, Pimenta M, et al. Developmental changes in the constitutive and inducible expression of cytochrome p450 3a2. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(7):841-846. doi:10.1016/S0006-2952(97)00264-5
96. Lu J, Shao Y, Qin X, et al. CRISPR knockout rat cytochrome P450 3A1/2 model for advancing drug metabolism and pharmacokinetics research. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017;7(1):42922-. doi:10.1038/srep42922
97. Fujino C, Sanoh S, Katsura T. Variation in Expression of Cytochrome P450 3A Isoforms and Toxicological Effects: Endo- and Exogenous Substances as Regulatory Factors and Substrates. *Biol Pharm Bull.* 2021;44(11):1617-1634. doi:10.1248/BPB.B21-00332
98. Venhorst J, Ter Laak AM, Commandeur JNM, Funae Y, Hiroi T, Vermeulen NPE. Homology Modeling of Rat and Human Cytochrome P450 2D (CYP2D) Isoforms and Computational Rationalization of Experimental Ligand-Binding Specificities. *J Med Chem.* 2002;46(1):74-86. doi:10.1021/JM0209578
99. Waxman DJ, Holloway MG. Sex Differences in the Expression of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes. *Mol Pharmacol.* 2009;76(2):215. doi:10.1124/MOL.109.056705
100. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES. <http://biomed.papers.upol.cz/doi/105507/bp2010017.html>. 2010;154(2):103-116. doi:10.5507/BP.2010.017
101. Anzenbacher P. Nejvýznamnější enzymy druhé fáze metabolismu léčiv: UDP-glukuronosyltransferázy a sulfotransferázy. doi:10.36290/far.2023.008
102. Bock KW. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal plant arms-race and co-evolution. *Biochem Pharmacol.* 2016;99:11-17. doi:10.1016/J.BCP.2015.10.001
103. Hennet T, Cabalzar J. Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glyocalyx dysfunction. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(7):377-384. doi:10.1016/J.TIBS.2015.03.002
104. González-Padilla D, Camara MD, Lauschke VM, Zhou Y. Population-scale variability of the human UDP-glycosyltransferase gene family. *Journal of Genetics and Genomics.* 2024;51(11):1228-1236. doi:10.1016/J.JGG.2024.06.018

105. Meech R, Hu DG, McKinnon RA, et al. The UDP-Glycosyltransferase (UGT) superfamily: New members, new functions, and novel paradigms. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1153-1222. doi:10.1152/PHYSREV.00058.2017
106. Tojcic J, Benoit-Biancamano MO, Court MH, Straka RJ, Caron P, Guillemette C. In Vitro Glucuronidation of Fenofibric Acid by Human UDP-Glucuronosyltransferases and Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition.* 2009;37(11):2236. doi:10.1124/DMD.109.029058
107. Xie Y, Zhang D, Zhang J, Yuan J. Metabolism, Transport and Drug–Drug Interactions of Silymarin. *Molecules.* 2019;24(20):3693. doi:10.3390/MOLECULES24203693
108. González-Padilla D, Camara MD, Lauschke VM, Zhou Y. Population-scale variability of the human UDP-glycosyltransferase gene family. *Journal of Genetics and Genomics.* 2024;51(11):1228-1236. doi:10.1016/J.JGG.2024.06.018
109. Stingl JC, Bartels H, Viviani R, Lehmann ML, Brockmöller J. Relevance of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms for drug dosing: A quantitative systematic review. *Pharmacol Ther.* 2014;141(1):92-116. doi:10.1016/J.PHARM-THERA.2013.09.002
110. Malojčić G, Owen RL, Grimshaw JPA, Brozzo MS, Dreher-Teo H, Glockshuber R. A structural and biochemical basis for PAPS-independent sulfuryl transfer by aryl sulfotransferase from uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(49):19217. doi:10.1073/pnas.0806997105
111. Springer M, Meugnier E, Schnabl K, et al. Loss of Sult1a1 reduces body weight and increases browning of white adipose tissue. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024;15:1448107. doi:10.3389/FENDO.2024.1448107
112. Isvoran A, Peng Y, Ceauranu S, Schmidt L, Nicot AB, Miteva MA. Pharmacogenetics of human sulfotransferases and impact of amino acid exchange on Phase II drug metabolism. *Drug Discov Today.* 2022;27(11):103349. doi:10.1016/J.DRUG-DIS.2022.103349
113. Runge-Morris M, Kocarek TA, Falany CN. Regulation of the cytosolic sulfotransferases by nuclear receptors. *Drug Metab Rev.* 2013;45(1):15-33. doi:10.3109/03602532.2012.748794
114. Männistö PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective

- COMT Inhibitors. *Pharmacol Rev.* 1999;51(4):593-628. doi:10.1016/S0031-6997(24)01423-6
115. Huotari M, Gogos JA, Karayiorgou M, et al. Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice. *European Journal of Neuroscience.* 2002;15(2):246-256. doi:10.1046/J.0953-816X.2001.01856.X
 116. Tunbridge EM, Lane TA, Harrison PJ. Expression of multiple catechol-o-methyltransferase (COMT) mRNA variants in human brain. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics.* 2007;144(6):834-839. doi:10.1002/AJMG.B.30539
 117. Tunbridge EM, Farrell SM, Harrison PJ, Mackay CE. Catechol-O-methyltransferase (COMT) influences the connectivity of the prefrontal cortex at rest. *Neuroimage.* 2013;68:49. doi:10.1016/J.NEUROIMAGE.2012.11.059
 118. Jenner P, Nyholm D. COMT inhibition with entacapone for patients with Parkinson's disease and motor complications: the novelty of continuous infusion. *Journal of Neural Transmission* 2025. Published online September 2, 2025:1-15. doi:10.1007/S00702-025-03006-X
 119. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal.* 2001;360(Pt 1):1. doi:10.1042/0264-6021:3600001
 120. Henderson CJ, Wolf CR, Kitteringham N, Powell H, Otto D, Park BK. Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(23):12741. doi:10.1073/PNAS.220176997
 121. Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics* 2004 1:6. 2004;1(6):460-. doi:10.1186/1479-7364-1-6-460
 122. Ma X, Liu F, Li M, et al. Expression of glutathione S-transferase A1, a phase II drug-metabolizing enzyme in acute hepatic injury on mice. *Exp Ther Med.* 2017;14(4):3798. doi:10.3892/ETM.2017.4957
 123. Tew KD, Townsend DM. Glutathione-S-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(12):1728-1737. doi:10.1089/ARS.2012.4640

124. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: The power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):218-227. doi:10.1038/NRM2646
125. Chang G. Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett.* 2003;555(1):102-105. doi:10.1016/S0014-5793(03)01085-8
126. Shchulkin A V., Abalenikhina Y V., Kosmachevskaya O V., Topunov AF, Yakusheva EN. Regulation of P-Glycoprotein during Oxidative Stress. *Antioxidants.* 2024;13(2):215. doi:10.3390/ANTIOX13020215/S1
127. Patel SB, Graf GA, Temel RE. Thematic Review Series: Lipid Transfer Proteins ABCG5 and ABCG8: more than a defense against xenosterols. *J Lipid Res.* 2018;59(7):1103-1113. doi:10.1194/JLR.R084244
128. Williams K, Segard A, Graf GA. Sitosterolemia: Twenty Years of Discovery of the Function of ABCG5ABCG8. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 2641. 2021;22(5):2641. doi:10.3390/IJMS22052641
129. S. Baldwin W. Phase 0 of the Xenobiotic Response: Nuclear Receptors and Other Transcription Factors as a First Step in Protection from Xenobiotics. *Nucl Receptor Res.* 2019;6:101447. doi:10.32527/2019/101447
130. He F, Wu H, Zhao F, et al. The role of nuclear receptors in metabolic homeostasis and disease: From molecular mechanisms to drug discovery. *Pharmacol Res.* 2025;218:107856. doi:10.1016/J.PHRS.2025.107856
131. Hong F, Pan S, Guo Y, Xu P, Zhai Y. PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules* 2019, Vol 24, Page 2545. 2019;24(14):2545. doi:10.3390/MOLECULES24142545
132. Bock KW, Bock-Hennig BS. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): from purification of Ah-receptor-inducible UGT1A6 to coordinate regulation of subsets of CYPs, UGTs, and ABC transporters by nuclear receptors. *Drug Metab Rev.* 2010;42(1):6-13. doi:10.3109/03602530903205492
133. Gallucci GM, Hayes CM, Boyer JL, Barbier O, Assis DN, Ghonem NS. PPAR-Mediated Bile Acid Glucuronidation: Therapeutic Targets for the Treatment of Cholestatic Liver Diseases. *Cells* 2024, Vol 13, Page 1296. 2024;13(15):1296. doi:10.3390/CELLS13151296
134. Chang MCJ, Grieder FB. The continued importance of animals in biomedical research. *Lab Anim (NY).* 2024;53(11):295-297. doi:10.1038/S41684-024-01458-4;SUBJMETA=1426,308,692

135. Debnath Scholar A, Ayub Ali M, Newmai Scholar K, et al. Effective management of wistar rats in laboratory research: A Brief Review. doi:10.33545/26174693.2024.v8.i12Si.3182
136. Yu S, Shang P. A review of bioeffects of static magnetic field on rodent models. *Prog Biophys Mol Biol.* 2014;114(1):14-24. doi:10.1016/J.PBIOMOL-BIO.2013.11.002
137. Krubaa P, Yogitha PS. Albino Wistar Rats: Advantages and Limitations in Biomedical Research. *SBV Journal of Basic, Clinical and Applied Health Science.* 2024;7(2):61-65. doi:10.4103/SBVJ.SBVJ_22_24
138. Takahashi K, Shima T, Soya M, Oharomari LK, Okamoto M, Soya H. Differences in exercise capacity and physiological responses in Wistar rats among breeders. *Exp Anim.* 2021;70(4):508. doi:10.1538/EXPANIM.21-0057
139. Ghezzi AC, Cambri LT, Botezelli JD, Ribeiro C, Dalia RA, De Mello MAR. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol Metab Syndr.* 2012;4(1):16. doi:10.1186/1758-5996-4-16
140. Vrána A, Kazdová L. The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc.* 1990;22(6):2579.
141. Klimeš I, Vraana A, Kuneš J, et al. Hereditary Hypertriglyceridemic Rat: A New Animal Model of Metabolic Alterations in Hypertension. *Blood Press.* 1995;4(3):137-142. doi:10.3109/08037059509077585
142. Zicha J, Pecháňová O, Čáčányiová S, et al. Hereditary Hypertriglyceridemic Rat: a Suitable Model of Cardiovascular Disease and Metabolic Syndrome? *Physiol Res.* 2006;55:49-63. Accessed January 9, 2022. <http://www.biomed.cas.cz/physiolres>
143. Okamoto K, Aoki K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn Circ J.* 1963;27(3):282-293. doi:10.1253/JCJ.27.282
144. Pravenec M, Křen V, Landa V, et al. Recent Progress in the Genetics of Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiol Res.* 2014;63:1-8. doi:10.33549/physiolres.932622
145. Bianchi G, Fox U, Imbasciati E. The development of a new strain of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 1974;14(2):339-347. doi:10.1016/0024-3205(74)90064-2

146. Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, et al. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genetics* 1999 21:1. 1999;21(1):76-83. doi:10.1038/5013
147. Pravenec M, Zidek V, Simakova M, et al. Genetics of Cd36 and the clustering of multiple cardiovascular risk factors in spontaneous hypertension. *J Clin Invest.* 1999;103(12):1651-1657. doi:10.1172/JCI6691
148. Kwitek AE. Rat Models of Metabolic Syndrome. *Methods Mol Biol.* 2019;2018:269. doi:10.1007/978-1-4939-9581-3_13
149. Hulman S, Falkner B, Freyvogel N. Insulin resistance in the conscious spontaneously hypertensive rat: Euglycemic hyperinsulinemic clamp study. *Metabolism.* 1993;42(1):14-18. doi:10.1016/0026-0495(93)90165-K
150. Pravenec M, Kajiya T, Zídek V, et al. Effects of Human C-Reactive Protein on Pathogenesis of Features of the Metabolic Syndrome. *Hypertension.* 2011;57(4):731-737. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164350
151. Nemeckova I, Eissazadeh S, Rathouska JU, et al. Transgenic human C-reactive protein affects oxidative stress but not inflammation biomarkers in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *BMC Cardiovasc Disord.* 2024;24(1). doi:10.1186/S12872-024-03870-7
152. Malinská H, Hüttl M, Miklánková D, et al. Ovariectomy-Induced Hepatic Lipid and Cytochrome P450 Dysmetabolism Precedes Serum Dyslipidemia. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 4527. 2021;22(9):4527. doi:10.3390/IJMS22094527
153. Medina-Contreras J, Villalobos-Molina R, Zarain-Herzberg A, Balderas-Villalobos J. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. *Mol Cell Biochem.* 2020;475(1-2):261-276. doi:10.1007/S11010-020-03879-4
154. Woo JR, Bae SH, Wales TE, et al. The serine phosphorylations in the IRS-1 PIR domain abrogate IRS-1 and IR interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2024;121(17):e2401716121. doi:10.1073/PNAS.2401716121
155. Yokota-Nakagi N, Omoto S, Tazumi S, Kawakami M, Takamata A, Morimoto K. Estradiol replacement improves high-fat diet-induced insulin resistance in ovariectomized rats. *Physiol Rep.* 2022;10(5):e15193. doi:10.14814/PHY2.15193

156. Koricanac G, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Zakula Z, Ribarac-Stepic N, Isenovic ER. Insulin signaling in the liver and uterus of ovariectomized rats treated with estradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108(1-2):109-116. doi:10.1016/J.JSBMB.2007.06.001
157. Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, Davidge ST. Tumor Necrosis Factor- α and Vascular Angiotensin II in Estrogen-Deficient Rats. *Hypertension.* 2006;48(3):497-503. doi:10.1161/01.HYP.0000235865.03528.F1
158. Kireev RA, Tresguerres ACF, Garcia C, et al. Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. *Biogerontology.* 2010;11(2):229-243. doi:10.1007/S10522-009-9242-2
159. Paquette A, Wang D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM. Effects of ovariectomy on PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause.* 2008;15(6):1169-1175. doi:10.1097/GME.0B013E31817B8159
160. Yeh JH, Tung YT, Yeh YS, Chien YW. Effects of Dietary Fatty Acid Composition on Lipid Metabolism and Body Fat Accumulation in Ovariectomized Rats. *Nutrients* 2021, Vol 13, Page 2022. 2021;13(6):2022. doi:10.3390/NU13062022
161. Škop V, Trnovská J, Oliyarnyk O, et al. Hepatotoxic Effects of Fenofibrate in Spontaneously Hypertensive Rats Expressing Human C-Reactive Protein. doi:10.33549/physiolres.933304
162. Ferreira A, Rodrigues M, Meirinho S, Fortuna A, Falcão A, Alves G. Silymarin as a flavonoid-type P-glycoprotein inhibitor with impact on the pharmacokinetics of carbamazepine, oxcarbazepine and phenytoin in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2021;44(5):458-469. doi:10.1080/01480545.2019.1601736
163. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res.* 2014;3(1):85. doi:10.4103/2277-9175.127998
164. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/METH.2001.1262
165. Dragon AH, Rowe CJ, Rhodes AM, Pak OL, Davis TA, Ronzier E. Systematic Identification of the Optimal Housekeeping Genes for Accurate Transcriptomic

- and Proteomic Profiling of Tissues following Complex Traumatic Injury. *Methods Protoc.* 2023;6(2):22. doi:10.3390/MPS6020022/S1
166. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
 167. OMURA T, SATO R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *Journal of Biological Chemistry.* 1964;239(7):2370-2378. doi:10.1016/S0021-9258(20)82244-3
 168. P450-Glo™ Assays. Accessed February 22, 2026. www.promega.com
 169. Soukop J, Rácová Z, Kazdová L, et al. Differences in mRNA Expression of Selected Cytochrome P450, Transporters and Nuclear Receptors Among Various Rat Models of Metabolic Syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2025;137(2):e70075. doi:10.1111/BCPT.70075
 170. Voulgari C, Tentolouris N, Dilaveris P, Tousoulis D, Katsilambros N, Stefanadis C. Increased Heart Failure Risk in Normal-Weight People With Metabolic Syndrome Compared With Metabolically Healthy Obese Individuals. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(13):1343-1350. doi:10.1016/J.JACC.2011.04.047
 171. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, et al. The Obese Without Cardiometabolic Risk Factor Clustering and the Normal Weight With Cardiometabolic Risk Factor Clustering. Accessed June 18, 2024. www.jamaarchivescme.com
 172. Alemany M. The Metabolic Syndrome, a Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol 25, Page 2251. 2024;25(4):2251. doi:10.3390/IJMS25042251
 173. Lillich FF, Imig JD, Proschak E. Multi-Target Approaches in Metabolic Syndrome. *Front Pharmacol.* 2021;11:1996. doi:10.3389/FPHAR.2020.554961
 174. Aggarwal R, Bhatt DL, Rodriguez F, Yeh RW, Wadhera RK. Trends in Lipid Concentrations and Lipid Control Among US Adults, 2007-2018. *JAMA.* 2022;328(8):737-745. doi:10.1001/JAMA.2022.12567
 175. Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG, Christoffersen M. Triglyceride-rich remnant lipoproteins are more atherogenic than LDL per particle: is this important? *Eur Heart J.* 2023;44(39):4196-4198. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAD419
 176. Orolin J, Vecera R, Markova I, Zacharova A, Anzenbacher P. Differences in hepatic expression of genes involved in lipid homeostasis between hereditary

- hypertriglyceridemic rats and healthy Wistar rats and in their response to dietary cholesterol. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(10):2624-2630. doi:10.1016/J.FCT.2009.07.022
177. Štolba P, Dobešová Z, Hušek P, et al. The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes. *Life Sci*. 1992;51(10):733-740. doi:10.1016/0024-3205(92)90482-5
 178. Pravenec M, Zidek V, Simakova M, et al. Genetics of Cd36 and the clustering of multiple cardiovascular risk factors in spontaneous hypertension. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(12):1651. doi:10.1172/JCI6691
 179. Cifarelli V, Abumrad NA. Intestinal CD36 and Other Key Proteins of Lipid Utilization: Role in Absorption and Gut Homeostasis. *Compr Physiol*. 2018;8(2):493-507. doi:10.1002/CPHY.C170026
 180. Ulug E, Nergiz-Unal R. Dietary fatty acids and CD36-mediated cholesterol homeostasis: potential mechanisms. *Nutr Res Rev*. 2021;34(1):64-77. doi:10.1017/S0954422420000128
 181. Zhao L, Li Y, Ding Q, Li Y, Chen Y, Ruan XZ. CD36 Senses Dietary Lipids and Regulates Lipids Homeostasis in the Intestine. *Front Physiol*. 2021;12:669279. doi:10.3389/FPHYS.2021.669279
 182. Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. CD36 Is Important for Fatty Acid and Cholesterol Uptake by the Proximal but Not Distal Intestine. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(27):19493-19501. doi:10.1074/JBC.M703330200
 183. Sun D, Xiang H, Yan J, He L. Intestinal microbiota: A promising therapeutic target for hypertension. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:970036. doi:10.3389/FCVM.2022.970036
 184. Dardi P, Coutinho CP, de Oliveira S, et al. Changes in the intestinal microbiota induced by the postnatal environment and their association with hypertension. *Pharmacol Res*. 2025;212:107621. doi:10.1016/J.PHRS.2025.107621
 185. Siais L, Grangeiro É, Coimbra V, et al. Correlation between Firmicutes, Bacteroidetes and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio and Lipid Profile in Severely Obese Women in Rio de Janeiro - Brazil. *J Acad Nutr Diet*. 2022;122(9):A15. doi:10.1016/j.jand.2022.06.054

186. Cao K, Zhang K, Ma M, Ma J, Tian J, Jin Y. Lactobacillus mediates the expression of NPC1L1, CYP7A1, and ABCG5 genes to regulate cholesterol. *Food Sci Nutr*. 2021;9(12):6882-6891. doi:10.1002/FSN3.2600
187. Sun D, Lu J, Zhang Y, et al. Characterization of a novel cyp1a2 knockout rat model constructed by crispr/cas9. *Drug Metabolism and Disposition*. 2021;49(8):638-647. doi:10.1124/DMD.121.000403
188. Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, et al. Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012;40(1):83-92. doi:10.1124/dmd.111.042259
189. Xun T, Lin Z, Wang X, et al. Advanced oxidation protein products downregulate CYP1A2 and CYP3A4 expression and activity via the NF- κ B-mediated signaling pathway in vitro and in vivo. *Laboratory Investigation*. 2021;101(9):1197-1209. doi:10.1038/s41374-021-00610-9
190. Shakunthala N. New cytochrome P450 mechanisms: Implications for understanding molecular basis for drug toxicity at the level of the cytochrome. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010;6(1):1-15. doi:10.1517/17425250903329095
191. Karuzina II, Zgoda VG, Kuznetsova GP, Samenkova NF, Archakov AI. Heme and apoprotein modification of cytochrome P450 2B4 during its oxidative inactivation in monooxygenase reconstituted system. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(5-6):620-632. doi:10.1016/S0891-5849(98)00252-4
192. Aleksunes LM, Klaassen CD. Coordinated Regulation of Hepatic Phase I and II Drug-Metabolizing Genes and Transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR α -, and Nrf2-Null Mice. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012;40(7):1366-1379. doi:10.1124/dmd.112.045112
193. Shen Y, Liu J, Yao B, et al. Non-alcoholic fatty liver disease changes the expression and activity of hepatic drug-metabolizing enzymes and transporters in rats. *Toxicol Lett*. 2024;396(12):36-47. doi:10.1016/j.toxlet.2024.04.010
194. Zhou M, Maitra SR, Wang P. The potential role of transcription factor aryl hydrocarbon receptor in downregulation of hepatic cytochrome P-450 during sepsis. *Int J Mol Med*. 2008;21(4):423-428. doi:10.3892/ijmm.21.4.423

195. Aleksunes LM, Klaassen CD. Coordinated Regulation of Hepatic Phase I and II Drug-Metabolizing Genes and Transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR α -, and Nrf2-Null Mice. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012;40(7):1366-1379. doi:10.1124/dmd.112.045112
196. Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, et al. Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Alterations in Humans with Progressive Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metabolism and Disposition*. 2009;37(10):2087-2094. doi:10.1124/dmd.109.027466
197. Hiroi T, Chow T, Imaoka S, Funae Y. Catalytic Specificity of CYP2D Isoforms in Rat and Human. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002;30(9):970-976. doi:10.1124/dmd.30.9.970
198. Haduch A, Bromek E, Daniel WA. Role of brain cytochrome P450 (CYP2D) in the metabolism of monoaminergic neurotransmitters. *Pharmacological Reports*. 2013;65(6):1519-1528. doi:10.1016/S1734-1140(13)71513-5
199. Elraghy O, Baldwin WS. REPRESSION OF MULTIPLE CYP2D GENES IN MOUSE PRIMARY HEPATOCYTES WITH A SINGLE siRNA CONSTRUCT. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014;51(1):9. doi:10.1007/s11626-014-9803-9
200. Ning M, Jeong H. High-Fat Diet Feeding Alters Expression of Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes in Mice. *Drug Metabolism and Disposition*. 2017;45(7):707-711. doi:10.1124/dmd.117.075655
201. Haduch A, Danek PJ, Kuban W, et al. Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats. *Neurochem Int*. 2022;152(25):105223. doi:10.1016/j.neuint.2021.105223
202. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):59-69. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.10.003
203. Sadler NC, Webb-Robertson BJM, Clauss TR, Pounds JG, Corley R, Wright AT. High-Fat Diets Alter the Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 Activities. *Chem Res Toxicol*. 2018;31(5):308-318. doi:10.1021/acs.chemres-tox.8b00008

204. Matušková Z, Poruba M, Švandová A, Kazdová L, Večeřa R, Anzenbacher P. Comparison of protein expression and activity of CYP3A and CYP2E1 in different rat models. In: *Xenobiochemické Sympóziium*. 2015.
205. Ekroos M, Sjögren T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(37):13682. doi:10.1073/pnas.0603236103
206. Vander Schaaf M, Luth K, Townsend DM, et al. CYP3A4 drug metabolism considerations in pediatric pharmacotherapy. *Medicinal Chemistry Research* 2024 33:12. 2024;33(12):2221-2235. doi:10.1007/s00044-024-03360-7
207. Kandel SE, Han LW, Mao Q, Lampe JN. Digging Deeper into CYP3A Testosterone Metabolism: Kinetic, Regioselectivity, and Stereoselectivity Differences between CYP3A4/5 and CYP3A7. *Drug Metabolism and Disposition*. 2017;45(12):1266-1275. doi:10.1124/dmd.117.078055
208. Williams PA, Cosme J, Matak Vinković D, et al. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* (1979). 2004;305(5684):683-686. doi:10.1126/science.1099736
209. Bell L, Bickford S, Nguyen PH, et al. Proluciferin Acetals as Bioluminogenic Substrates for Cytochrome P450 Activity and Probes for CYP3A Inhibition. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011;39(12):2403-2410. doi:10.1177/1087057108317480
210. Karin M, Kim JY. Endoplasmic reticulum stress at the forefront of fatty liver diseases and cancer. *Pharmacol Rev*. 2025;77(6):100096. doi:10.1016/j.pharmr.2025.100096
211. Fu S, Yang L, Li P, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 2011 473:7348. 2011;473(7348):528-531. doi:10.1038/nature09968
212. Austin RP, Barton P, Cockcroft SL, Wenlock MC, Riley RJ. The influence of non-specific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002;30(12):1497-1503. doi:10.1124/dmd.30.12.1497
213. Hardwick RN, Ferreira DW, More VR, et al. Altered UDP-Glucuronosyltransferase and Sulfotransferase Expression and Function during Progressive Stages of

- Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metabolism and Disposition*. 2013;41(3):554-561. doi:10.1124/DMD.112.048439
214. Schiöth HB, Boström A, Murphy SK, et al. A targeted analysis reveals relevant shifts in the methylation and transcription of genes responsible for bile acid homeostasis and drug metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Genomics* 2016 17:1. 2016;17(1):462-. doi:10.1186/s12864-016-2814-z
 215. Powell NR, Liang T, Ipe J, et al. Clinically important alterations in pharmacogene expression in histologically severe nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Communications* 2023 14:1. 2023;14(1):1474-. doi:10.1038/s41467-023-37209-1
 216. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(1):75-81. doi:10.1007/s10545-010-9177-4
 217. Price BR, Wilcock DM, Weekman EM. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:405852. doi:10.3389/fnagi.2018.00350
 218. Gamage N, Barnett A, Hempel N, et al. Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. *Toxicological Sciences*. 2006;90(1):5-22. doi:10.1093/toxsci/kfj061
 219. Xie Y, Xie W. The Role of Sulfotransferases in Liver Diseases. *Drug Metabolism and Disposition*. 2020;48(9):742-749. doi:10.1124/dmd.120.000074
 220. Yoshinari K, Yoda N, Toriyabe T, Yamazoe Y. Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5'-flanking region. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(2):261-269. doi:10.1016/J.BCP.2009.08.008
 221. Zemanová N, Anzenbacher P, Zapletalová I, et al. The role of the microbiome and psychosocial stress in the expression and activity of drug metabolizing enzymes in mice. *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020;10(1):1-8. doi:10.1038/s41598-020-65595-9
 222. Wang S, Wen Q, Qin Y, Xia Q, Shen C, Song S. Gut microbiota and host cytochrome P450 characteristics in the pseudo germ-free model: co-contributors to a diverse metabolic landscape. *Gut Pathog*. 2023;15(1):1-14. doi:10.1186/S13099-023-00540-5

223. Lemmer B, Mattes A, Böhm M, Ganten D. Circadian blood pressure variation in transgenic hypertensive rats. *Hypertension*. 1993;22(1):97-101.
doi:10.1161/01.HYP.22.1.97
224. Walker NJ, Gastel JA, Costa LT, Clark GC, Lucier GW, Sutter TR. Rat CYP1B1: an adrenal cytochrome P450 that exhibits sex-dependent expression in livers and kidneys of TCDD-treated animals. *Carcinogenesis*. 1995;16(6):1319-1327.
doi:10.1093/CARCIN/16.6.1319
225. Emery MG, Fisher JM, Chien JY, et al. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003;38(2):428-435. doi:10.1053/JHEP.2003.50342
226. Schattenberg JM, Wang Y, Rigoli RM, Koop DR, Czaja MJ. CYP2E1 Overexpression Alters Hepatocyte Death from Menadione and Fatty Acids by Activation of ERK1/2 Signaling. *Hepatology*. 2004;39(2):444-455. doi:10.1002/hep.20067
227. Lu D, Ma Y, Zhang W, et al. Knockdown of cytochrome P450 2E1 inhibits oxidative stress and apoptosis in the cTnTR141W dilated cardiomyopathy transgenic mice. *Hypertension*. 2012;60(1):81-89.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.191478
228. Subramanian M, Tam H, Zheng H, Tracy TS. CYP2C9-CYP3A4 Protein-Protein Interactions: Role of the Hydrophobic N Terminus. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(6):1003-1009. doi:10.1124/DMD.109.030155
229. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16237-16242. doi:10.1073/pnas.252582399
230. Chiang JYL. Bile acids: Regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009;50(10):1955-1966. doi:10.1194/jlr.R900010-JLR200
231. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(4):354-362.
doi:10.1056/nejmoa0809171
232. Kugler N, Klein K, Zanger UM. MiR-155 and other microRNAs downregulate drug metabolizing cytochromes P450 in inflammation. *Biochem Pharmacol*. 2020;171:113725. doi:10.1016/J.BCP.2019.113725
233. NR1I3 nuclear receptor subfamily 1 group I member 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9970#summary>

234. Vecera R, Poruba M, Hüttl M, et al. Beneficial Effect of Fenofibrate and Silymarin on Hepatic Steatosis and Gene Expression of Lipogenic and Cytochrome P450 Enzymes in Non-Obese Hereditary Hypertriglyceridemic Rats. *Current Issues in Molecular Biology* 2022, Vol 44, Pages 1889-1900. 2022;44(5):1889-1900. doi:10.3390/CIMB44050129
235. Hendrychová T, Anzenbacherová E, Hudeček J, et al. Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: Molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2011;1814(1):58-68. doi:10.1016/j.bbapap.2010.07.017