

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Bohumil Kubeša

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Stanovení exprese transportérů ABCG5
a ABCG8 na úrovni proteinu u HHTg
potkanů na dietě obohacené o přírodní látky**

Bakalářská práce

Bohumil Kubeša

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Zuzany Matuškové, Ph.D. Veškeré zdroje uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

SOUHRN

V rámci teoretické části byl vypracován přehled zaměřený na vlastnosti transportních proteinů ABCG5/8 a možnosti jejich ovlivnění. Práce se dále zabývá metabolickým syndromem a potkany s dědičnou hypertriglyceridemií, které jsou akceptovaným modelem metabolického syndromu. Jako podpůrná léčba metabolického syndromu by se mohl použít silymarin, tedy přírodní extrakt z ostropestřce mariánského, nebo omega-3 polynenasycené mastné kyseliny. Víme, že tyto přírodní látky zvyšují expresi proteinů ABCG5/8 v játrech hypertriglyceridemických potkanů. Cílem této práce bylo potvrdit, zda silymarin, omega-3 polynenasycené mastné kyseliny a jejich kombinace ovlivňují expresi i střevních transportérů ABCG5/8 na úrovni proteinu u potkaního modelu metabolického syndromu.

Z výsledků vyplývá, že potkani na dietě obohacené o vybrané přírodní látky neměli změněnou expresi střevních ABCG5/8 v porovnání s kontrolními potkany, kteří byli krmeni standardní dietou bez obsahu silymarinu a omega-3 polynenasycených mastných kyselin. Výsledky tedy nepotvrdily efekt v játrech potkanů. Důvodů může být několik, např. mohou zde hrát velkou roli střevní bakterie nebo naopak v játrech metabolity vzniklé ze silymarinu a omega-3 polynenasycených mastných kyselin. K vysvětlení rozdílných účinků vybraných přírodních látek na expresi ABCG5/8 v játrech a ve střevech je zapotřebí provést další experimenty, které jsou v budoucnu v plánu.

SUMMARY

The summary focused on qualities of transport proteins ABCG5/8 and possibilities of their influencing has been elaborated in the theoretical part. Then the study deals with a metabolic syndrome and rats with hereditary hypertriglyceridemia which are an accepted model of the metabolic syndrome. Silymarin (natural extract of milk thistle) could be used as a supporting therapy of the metabolic syndrome or omega-3 polyunsaturated fatty acids. It is known that these natural substances increase the expression of proteins ABCG5/8 in the hypertriglyceridemic rats livers. The aim of this work was to confirm if silymarin, omega-3 polyunsaturated fatty acids and their combinations influence the expression also at intestinal transporters ABCG5/8 on a protein level at rats model of the metabolic syndrome.

From the results it arises that the rats which were on a diet enriched by chosen natural substances did not have different expression intestinal ABCG5/8 in comparison with the inspecting rats which were on a standard diet without the contents of silymarin and omega-3 polyunsaturated fatty acids. The results did not confirm any effect in the rats intestines. There can be several reasons for this fact, e.g. some intestinal bacterias can play a big role or on the contrary metabolites which have arisen from silymarin in the livers and omega-3 polyunsaturated fatty acids. Some other experiments (which are planned in the future) are needed to be done for the explanation of different effects of chosen natural substances for the expression ABCG5/8 in livers and intestines.

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Zuzaně Matuškové, Ph.D. za cenné rady, ochotu, připomínky a trpělivost během zpracování této práce.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Metabolický syndrom	3
3.1.1	Kritéria metabolického syndromu	3
3.1.2	Cholesterol	4
3.1.3	Léčba metabolického syndromu.....	5
3.2	Transportní proteiny ABCG5/8.....	6
3.2.1	Regulace genové exprese Abcg5 a Abcg8	8
3.2.2	Intestinální absorpce cholesterolu	10
3.2.3	Hepatobiliární sekrece cholesterolu.....	11
3.3	Model metabolického syndromu	11
3.3.1	Vznik HHTg potkanů.....	11
3.3.2	Charakteristika HHTg potkanů	12
3.4	Western blot	12
3.4.1	Příprava vzorku	13
3.4.2	Gelová elektroforéza SDS-PAGE	14
3.4.3	Přenos.....	14
3.4.4	Blokování a imunodetekce.....	15
3.4.5	Kvantifikace	15
4	MATERIÁL a METODY.....	16
4.1	Biologický materiál.....	16
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	17
4.2.1	Použité chemikálie.....	17
4.2.2	Použité soupravy	18
4.2.3	Použité roztoky.....	19

4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	20
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	20
4.4.1	Izolace cytosolární frakce z potkaních střev	20
4.4.2	Měření koncentrace proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA)	21
4.4.3	Příprava vzorků pro elektroforézu	23
4.4.4	SDS-PAGE.....	23
4.4.5	Metoda WB	24
4.4.6	Blokování a imunodetekce.....	24
4.4.7	Vyhodnocení proužků (normalizace dat).....	25
4.4.8	Statistická analýza	26
5	VÝSLEDKY	27
6	DISKUZE	42
7	ZÁVĚR.....	44
8	LITERATURA	45

SEZNAM SYMBOLŮ a ZKRATEK

ABC	protein s doménou vázající ATP
ABCG5	ABC transportní protein, typ G5
ABCG8	ABC transportní protein, typ G8
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérový albumin
CBE	extrakt z aronie černé
Cx	konexin
DHA	kyselina dokosahexaenová
EDTA-Na ₂	dihydrát disodné soli kyseliny etylendiamintetraoctové
EPA	kyselina eikosapentaenová
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GATA4	transkripční faktor GATA vázající protein 4
HDL	vysokodenzitní lipoprotein
HHTg	potkani trpcící dědičnou hypetriglyceridémií
HNF4 α	jaterní jaderný faktor 4 α
HRP	křenová peroxidáza
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
LXR α	transkripční jaterní X receptor α
NBD	doména vázající nukleotid
NPC1L1	protein Niemann-Pick-C1-L1
PAGE	gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
PUFAs	polynenasycené mastné kyseliny
PVDF	polyvinylidendifluorid
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný

SE	standardní chyba
SM	silymarin
SP	sójový protein
STD	standardní laboratorní dieta
T ₃	trijodthyronin, hormon štítné žlázy
TBS	pufrovací roztok obsahující tris(hydroxymethyl)aminomethan
TBS TWEEN	TBS s polysorbátem 20
TBS TWEEN Milk	TBS TWEEN s přídavkem nízkotučného mléka
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)etan
WB	Western blot

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Stavba polo-transportérů ABCG5 a ABCG8.	8
Obrázek 2: Regulace genové exprese Abcg5 a Abcg8	9
Obrázek 3: Transport sterolů a cholesterolu pomocí transportního heterodimeru ABCG5/ABCG8 a transportéru NPC1L1 v jaterní a střevní tkáni.....	10
Obrázek 4: Skládání blotovacího sendviče.	14
Obrázek 5: Kalibrační křivka hovězího sérového albuminu s rovnicí lineární regrese a hodnotou spolehlivosti R^2	27
Obrázek 6: Reprezentativní Western blot proužky „housekeeping“ proteinů GAPDH a β -Tubulinu u vzorků 3, 15, 6, 18, 9, 21, 12 a 22.	32
Obrázek 7: Reprezentativní Western blot proužky pro ABCG5 (75 kDa) protein.	33
Obrázek 8: Relativní množství ABCG5 proteinu u jednotlivých skupin.....	36
Obrázek 9: Krabicový graf. Grafické znázornění analýzy rozpylu dle Kruskal-Wallisova testu u ABCG5 proteinu.....	37
Obrázek 10: Reprezentativní Western blot proužky ABCG8 (70 kDa).....	37
Obrázek 11: Relativní množství ABCG8 proteinu u jednotlivých skupin.....	40
Obrázek 12: Krabicový graf. Grafické znázornění analýzy rozpylu dle Kruskal-Wallisova testu u ABCG8 proteinu.....	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Čísla potkanů a jejich rozdělení do skupin na základě odlišné stravy.	16
Tabulka 2: Ředění hovězího sérového albuminu (BSA).	22
Tabulka 3: Schéma pipetování hovězího sérového albuminu, blanku a jednotlivých vzorků do mikrotitrační destičky.....	22
Tabulka 4: Schéma pipetování vzorků do jamek zaostřovacího gelu.....	24
Tabulka 5: Změřené absorbance pro hovězí sérový albumin pomocí UV-Vis spektrofotometru. Měřeno při 562 nm.	27
Tabulka 6: Stanovení objemu 23 vzorků obsahující stejné množství celkových proteinů (20 µg).....	29–31
Tabulka 7: Stanovení intenzity proužků u jednotlivých vzorků pro ABCG5 protein a kontrolní β-Tubulin, normalizace dat pro ABCG5 protein a porovnání mezi skupinami... ..	34–35
Tabulka 8: Stanovení aritmetického průměru u jednotlivých skupin, porovnání mezi skupinami, výpočet směrodatné odchylky (SD) a standardní chyby (SE) u vzorků ABCG5 proteinu.	36
Tabulka 9: Stanovení intenzity proužků u jednotlivých vzorků pro ABCG8 protein a kontrolní β-Tubulin, normalizace dat pro ABCG8 protein a porovnání mezi skupinami... ..	38–39
Tabulka 10: Stanovení aritmetického průměru u jednotlivých skupin, porovnání mezi skupinami, výpočet směrodatné odchylky (SD) a standardní chyby (SE) u vzorků ABCG8 proteinu.	40

1 ÚVOD

V současné době se lidstvo čím dál víc setkává s nemocemi, které jsou převážně vyvolány špatným životním stylem, např. zvýšená hladina cholesterolu je toho součástí. V těle každého z nás existují transportní proteiny ABCG5 a ABCG8, které mají schopnost eliminovat hladinu cholesterolu v organismu.

Existují přírodní látky, jako jsou polyfenoly v silymarinu (SM), tedy v extraktu ostropestřce mariánského, nebo některé polynenasycené mastné kyseliny (PUFAs), které mohou napomoci při eliminaci cholesterolu z organismu a mohou tak pomoci v udržování jeho optimální hladiny. Silymarin i PUFAs, konkrétně PUFAs omega-3 byly testovány u potkanů trpící dědičnou hypertriglyceridémií (HHTg), kteří jsou akceptováni jako model metabolického syndromu (Poruba *et al.*, 2015b). Zjistilo se (data nepublikována), že PUFAs omega-3 samotné i v kombinaci se silymarinem způsobují statisticky významné zvýšení v expresi jaterních proteinů ABCG5/8 u HHTg potkana. Otázkou tedy je, zda vybrané přírodní látky budou mít vliv i na expresi proteinů ABCG5 i ABCG8 ve střevní tkáni HHTg potkanů.

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Stručný přehled problematiky transportních proteinů ABCG5 a ABCG8, jejich vliv na lidský organismus a možnosti jejich ovlivnění.
- 2) Stanovení exprese vybraných transportérů na úrovni proteinu ve střevní tkáni HHTg potkanů metodou Western blot.
- 3) Vyhodnocení výsledků a jejich porovnání mezi jednotlivými skupinami HHTg potkanů.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom, jehož první zmínka byla zaznamenána ve 20. letech minulého století (Federspil *et al.*, 2006), zahrnuje skupinu několika abnormalit, které mají vliv na zdraví organismu (Reaven, 1988), především mohou zvýšit riziko vývoje kardiovaskulárního onemocnění a diabetu 2. typu (Grundy *et al.*, 2004). Každá z těchto abnormalit vede nezávisle na ostatních ke zhoršení endoteliální funkce aorty (Török *et al.*, 2002). Metabolické abnormality vyvolané nepříznivým životním stylem mohou vést k hypertriglyceridémii (Ruderman *et al.*, 1998) neboli zvýšené hladině triglyceridů v krvi. Hypertriglyceridémie podmiňuje vznik dalších onemocnění, jako je inzulínová rezistence, ateroskleróza, hyperinzulinémie, snížená hladina HDL (high-density lipoprotein) cholesterolu a intolerance glukózy (Sarafidis *et Nilsson*, 2006). Metabolický syndrom je tedy projevem dyslipidémie, hypertenze, inzulínové rezistence, glukózové intolerance, obezity, aterosklerózy a endoteliální dysfunkce (Grundy *et al.*, 2004). Předpokládá se, že inzulínová rezistence a hyperinzulinémie působí stimulačně na sympatický nervový systém, transport Ca^{2+} kationtů a reabsorpci Na^+ kationtů v ledvinách. Následkem těchto změn může nastat hypertenze (Vrana *et Kazdova*, 1990). Ačkoliv trygliceridy, cholesterol a glukóza hrají velkou roli v mnoha fyziologických funkcích a jsou pro organismus nezbytné, jejich zvýšená hladina může být rizikem vzniku řady onemocnění (Brown *et al.*, 2010). Pacienti, trpící metabolickým syndromem, mají často narušený metabolismus glukózy (buňky nereagují na zvýšené hladiny inzulínu) a mají vysoké riziko vzniku diabetu 2. typu (Poruba *et al.*, 2015b).

3.1.1 Kritéria metabolického syndromu

Organismus, který trpí několika již zmíněnými nemocemi, nemusí v konečném důsledku trpět metabolickým syndromem. Pro člověka byly stanoveny některé parametry, které definují, zda nemocný trpí metabolickým syndromem:

- obvod pasu (u mužů širší než 102 cm, u žen širší než 88 cm)
- hladina glukózy na lačno (u obou pohlaví vyšší než 6,0 mmol/l)
- hodnota krevního tlaku (u obou pohlaví větší než 130/80 mm Hg)
- hladina triglyceridů v krvi (u obou pohlaví vyšší než 1,6 mmol/l)

- plazmatická hladina HDL cholesterolu (u mužů menší než 1,0 mmol/l, u žen menší 1,3 mmol/l)

Pokud nemocný trpí nejméně třemi z těchto vybraných kritérií, je zřejmé, že trpí metabolickým syndromem (Zicha *et al.*, 2006)

3.1.2 Cholesterol

Cholesterol je nezbytnou součástí buněčných membrán savčích buněk. Hraje důležitou roli v embryonálním vývoji, buněčné diferenciaci, membránové tekutosti a v syntéze steroidů. Díky tomu je cholesterol v omezeném množství potřebný pro zdraví každého z nás. Nadměrné množství cholesterolu v našich buňkách vede k různým onemocněním. Nekontrolovatelné zvyšování cholesterolu v buněčné membráně vede k narušení membrány a následné apoptóze buňky. Nárůst nadměrného cholesterolu v krvi způsobuje hyperlipidémii, kardiovaskulární onemocnění a přispívá k propuknutí Alzheimerovy choroby (Wellington, 2004). Optimální hladina cholesterolu v těle je regulována syntézou *de novo*, absorpcí ze střeva a vylučováním žlučí. Biosyntéza cholesterolu je regulovaný proces, do kterého se zapojuje řada enzymatických reakcí (Robichon *et Dugail*, 2007). Jeden z enzymů podílející se na endogenní syntéze cholesterolu je 3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzym A reduktasa a při léčbě hypercholesterolemie se využívá inhibice právě tohoto enzymu (Barter *et al.*, 2007). Celková hladina cholesterolu v plazmě je určena především koncentracemi cholesterolu typu LDL (low-density lipoprotein) a HDL. Typ HDL představuje reverzní transport cholesterolu, má významné antioxidační a protizánětlivé vlastnosti a dokáže zabránit adhezi monocytů k endotelu (Barter *et al.*, 2007). Nízká hladina HDL v plazmě je spojena se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění (Gordon *et al.*, 1977). LDL cholesterol je naopak zodpovědný za transport cholesterolu z jater do periferních tkání (Barter *et al.*, 2007). Zvýšená plazmatická koncentrace LDL cholesterolu je dobře známým rizikovým faktorem infarktu myokardu a zvýšená hladina celkového cholesterolu ve žluči je rizikovým faktorem vzniku žlučových kamenů (Portincasa *et al.*, 2006).

3.1.3 Léčba metabolického syndromu

V současné době neexistuje lék, který by mohl ovlivnit všechny abnormality, které přispívají k metabolickému syndromu. Hypertriglyceridémie je obvykle léčena fibráty, které stimulují specifické receptory, čímž přispívají ke katabolismu triglyceridů. Hypercholesterolemie je léčena statiny, což je skupina léků, které inhibují *de novo* syntézu cholesterolu v játrech. Diabetes mellitus 2. typu je obvykle léčen látkami, které stimulují sekreci inzulínu (deriváty sulfonylmočoviny) a zvyšují jeho citlivost (metformin), a exogenními látkami, které jsou jeho analogy (Poruba *et al.*, 2015b). Některé přírodní extrakty, zejména ty, které jsou bohaté na polyfenoly, mohou také zlepšit tyto patologické stavy, navíc jsou velmi důležitými zdroji nových terapeutických možností (Valenzuela *et Garrido*, 1994).

3.1.3.1 Silymarin

Bylinnými prostředky pro podpůrnou léčbu metabolického syndromu by mohly být extrakty z rostlin bohatých na polyfenoly. Mezi tyto léčivé rostliny bohaté na polyfenolové sloučeniny patří ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*). Extrakt ze semen této byliny se nazývá silymarin. Obsahuje bohatou směs flavonoidů a tradičně se používá při poruše trávení. Po mnoha staletí se silymarin používá v podpůrné léčbě onemocnění jater a jeho cytoprotektivní aktivita je založena na antioxidačních vlastnostech (Valenzuela *et Garrido*, 1994). Tento extrakt lze také použít jako výživový doplněk díky jeho příznivému vlivu na rizikové faktory aterosklerózy (Wellington *et Jarvis*, 2001). U silymarinu byly také prokázány hypolipidemické účinky, snižuje celkový cholesterol v plazmě a játrech (Skottova *et al.*, 2003; Skottova *et al.*, 2004). Možným vysvětlením hypolipidemického účinku silymarinu je snížení absorpce cholesterolu ve střevě (Sobolova *et al.*, 2006). Hlavní složkou silymarinu je silybin, sloučenina, u níž se předpokládá, že je zodpovědná za mnoho pozitivních vlastností silymarinu. Silybin je tradičně používán k léčbě otravy muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*) a je dokonce možné jej použít k prevenci komplikací spojených s transplantací jater (Enjalbert *et al.*, 2002). Silymarin se vyskytuje v několika formách. Jedním z nich je standardizovaný silymarin, který má velmi nízkou biologickou dostupnost. Mikronizovaný silymarin, další z forem, poskytuje přibližně o 85 % vyšší biologickou dostupnost než standardizovaný silymarin.

Silymarin ve formě fytosomů představuje pak další formu silymarinu s ještě vyšší biologickou dostupností, dosahuje přibližně 6–10x vyšších hodnot ve srovnání se standardizovaným silymarinem (Morazzoni *et al.*, 1992; Morazzoni *et al.*, 1993).

3.1.3.2 Polynenasycené mastné kyseliny

Polynenasycené mastné kyseliny jsou esenciální mastné kyseliny, které člověk získává z potravy. Dělíme je na omega-3 a omega-6. Číslo znázorňuje, na kterém uhlíku je první dvojná vazba, počítáno od koncového metylu. Polynenasycené mastné kyseliny omega-3 se vyskytují převážně v rybách a hlavními složkami PUFAs omega-3 v rybách je kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina dokosaheptaenová (DHA) (Innes *et Calder*, 2018). Polynenasycené mastné kyseliny jsou velmi známé díky svým vlastnostem. Mají schopnost snižovat hladinu triglyceridů a mají tedy příznivé účinky na léčbu aterosklerózy a dalších kardiovaskulárních onemocnění (Frimmel *et al.*, 2016). Dále snižují plazmatickou hladinu lipidů, zlepšují funkci endotelu, pomáhají buňkám při zánětu a oxidativním stresu. Modulují fyzikální struktury buněčné membrány a mají vliv i na transportní mechanismy, např. u nefronu aktivují sodnodraselnou pumpu (Pirillo *et Catapano*, 2013). Polynenasycené mastné kyseliny mohou mít také vliv na cévní mezibuněčné „gap junctions“ (Perkins *et al.*, 1998). Jedná se o typ spojení dvou sousedních buněk, které je prostředkováno transmembránovými kanály, tzv. konexony. Ty zajišťují průchod iontů, malých metabolitů a molekul mezi sousedními buňkami, které mají funkci cévní stěny (Figuroa *et Dulin*, 2009). Toto mezibuněčné spojení je tvořeno 2 konexony. Každý konexon se skládá z 6 proteinů, které nazýváme konexiny (Cx) (Perkins *et al.*, 1998). Exprese těchto proteinů je především závislá na typu a lokalizaci buněk v cévách (van Kempen *et Jongma*, 1999). Hlavním konexinem konexonu je Cx40 (Brisset *et al.*, 2009).

3.2 Transportní proteiny ABCG5/8

Transmembránové proteiny, které využívají energii z hydrolyzy adenosintrifosfátu (ATP) k transportu substrátů přes buněčnou membránu (Dean *et al.*, 2001), se nazývají ABC (ATP-Binding Cassette) transportéry. Genová exprese ABC transportérů probíhá u člověka v každé buňce. Dosud bylo identifikováno 48 odlišných lidských genů ABC transportérů (Borst *et al.*, 2002). Proteiny těchto transportérů jsou primárně lokalizovány v cytoplazmatické membráně, kde katalyzují energeticky závislý transport různých substrátů, jako jsou nukleotidy, kovové ionty, tuky, cukry, aminokyseliny,

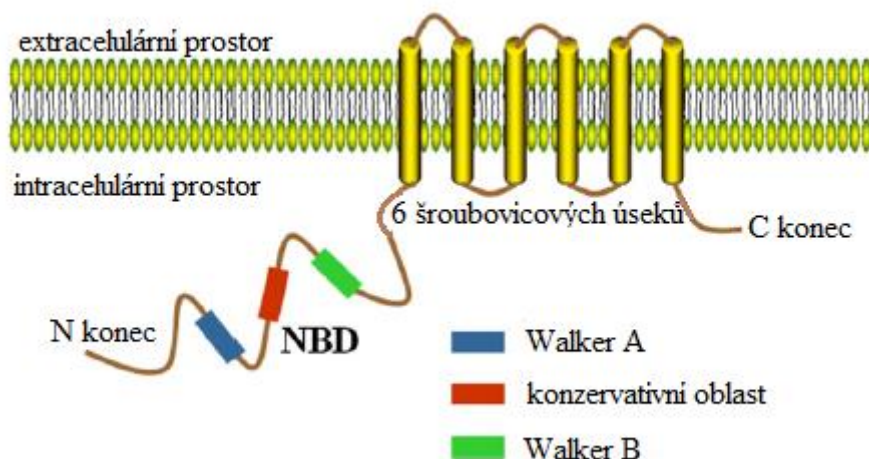
peptidy, proteiny a mnoho hydrofobních sloučenin a jejich konjugovaných metabolitů. Jejich hlavní význam spočívá v udržení homeostázy mnoha látek (Elferink *et al.*, 2002). Geny pro transportní proteiny ABCG5 a ABCG8 leží na chromozómu 2p21. Každý z těchto genů má 13 exonů a 12 intronů (Brown *et al.*, 2010). Geny pro ABCG5 a ABCG8 jsou orientovány opačně a jsou odděleny 374 páry bází (Repa *et al.*, 2002). Každý protein obsahuje 2 domény, transmembránovou doménu a doménu vázající nukleotid (NBD). Transmembránová doména zahrnuje 6 sekundárních struktur, konkrétně 6 šroubovicových úseků. Cytoplazmatická doména NBD zahrnuje 2 konzervativní úseky Walker A a Walker B a konzervativní specifický úsek pro ABC proteiny (Brown *et al.*, 2010), jak je zobrazeno na Obr. 1. Pokud dojde k expresi pouze jednoho transportéru, stává se z něj nefunkční tzv. polo-transportér. Aby byly tyto transportéry funkční, musí se zformovat do heterodimeru. Některé studie ukázaly, že tyto transportéry vznikají v endoplazmatickém retikulu a dále se společně transportují přes Golgiho aparát až na apikální membránu hepatocytu nebo enterocytu (Graf *et al.*, 2003; Dijkers *et al.*, 2010). Výrazná genová exprese těchto proteinů probíhá především v hepatocytech a enterocytech (Berge *et al.*, 2000), kde působí proti akumulaci sterolů v organismu. Jaterní proteiny ABCG5/8 zprostředkovávají exkreci cholesterolu a fytosterolů do žluče (Wang *et al.*, 2015) a hrají klíčovou roli v udržování optimální hladiny sterolů u obratlovců. Střevní proteiny ABCG5/8 zprostředkovávají přenos sterolů z enterocytů zpět do lumenu střeva (Zhang *et al.*, 2002). Fytosteroly jsou pro ABCG5/8 vhodnějším substrátem než cholesterol samotný, protože se od cholesterolu liší modifikací postranního řetězce (Yu *et al.*, 2004).

Pokud dojde k mutaci genů ABC transportérů, může dojít ke vzniku mnoha lidských poruch, jako je cystická fibróza, retinální degenerace nebo cholestáza (Elferink *et al.*, 2002). Mutace v genu *Abcg5* nebo *Abcg8* by mohla způsobit tzv. sitosterolémii, díky které dochází k akumulaci sterolů v organismu. Jedná se o autozomální recesivní onemocnění s poškozenou funkcí ABCG5/8 proteinů, které způsobuje hypercholesterolémii, fytosterolémii a koronární aterosklerózu (Berge *et al.*, 2000). Pacienti se sitosterolémií trpí sníženou sekrecí cholesterolu do žluče a sníženou biosyntézou cholesterolu v organismu (Salen *et al.*, 1992).

Yamazaki *et al.* (2011) zjistili, že myši na dietě s vysokým obsahem sacharidů a tuků mají zvýšenou expresi ABCG5/8 ve žlučových kanálcích oproti myším, které byly na standardní dietě. Bohatým zdrojem polyfenolů, které výrazně zvyšují hladinu ABCG5/8

v Caco-2 buňkách je například extrakt (CBE) z aronie černé (*Aronia melanocarpa*) (Kim *et al.*, 2013).

Kromě N-glykosylace není zatím objasněna žádná další posttranslační modifikace ABCG5/8. Některé analýzy u myších ABCG5/8 ukázaly místa pro fosforylaci serinu, threoninu a tyrosinu. Cílem budoucích výzkumů je objasnění dalších modifikací těchto transportérů a vysvětlení jejich důsledků na regulaci genové exprese (Yu *et al.*, 2014).



Obrázek 1: Stavba polo-transportérů ABCG5 a ABCG8 (upraveno a převzato z Yu *et al.*, 2014).

NBD – nukleotidová vázající oblast

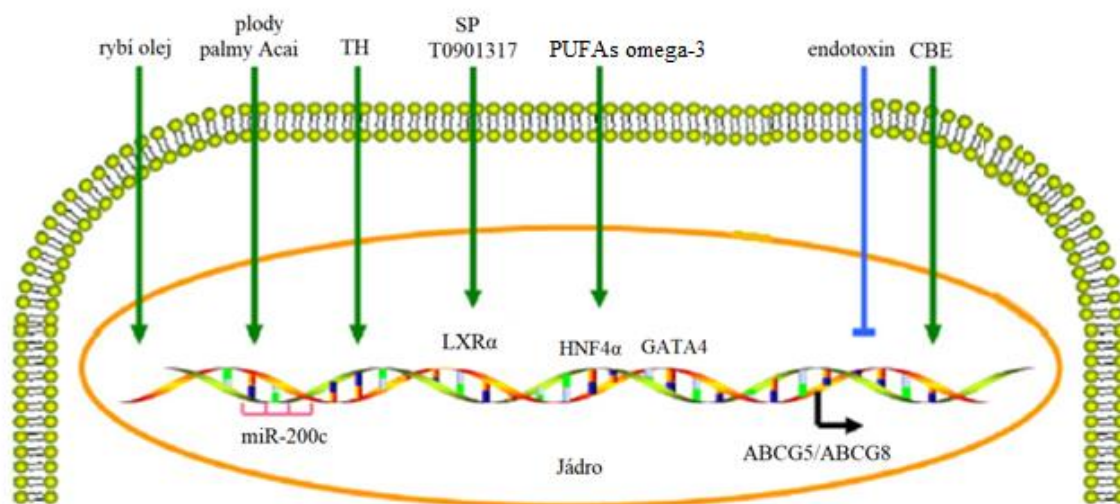
3.2.1 Regulace genové exprese *Abcg5* a *Abcg8*

Genová exprese *Abcg5* a *Abcg8* je primárně regulována na úrovni transkripce. Ligandem aktivovaný, jaderný, transkripční faktor LXR α (Liver X receptor α) je považován za hlavní regulátor mRNA *Abcg5* a *Abcg8* a je zřejmé, že regulace exprese genů *Abcg5* a *Abcg8* je koordinačně řízena několika transkripčními procesy. Bylo prokázáno, že sójový protein (SP) a LXR agonista T0901317 rapidně zvyšují expresi těchto genů v tenkém střevě a játrech u volně žijících myší (van der Veen *et al.*, 2007). Expresi jaterních genů *Abcg5* a *Abcg8* také zvyšuje hormon štítné žlázy trijodthyronin (T₃) (Bonde *et al.*, 2012). Transkripci *Abcg5* a *Abcg8* v buňkách HepG2 stimuluje jaterní jaderný faktor 4 α (HNF4 α) a transkripční faktor GATA4 (Sumi *et al.*, 2007). Nedávno byla vyšlechtěna transgenní myš s genem Fat-1. Jedná se o gen, který není přítomen u savců. Kóduje n-3 desaturasu u háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*). Úlohou n-3desaturasy je přeměna PUFAs omega-6 na PUFAs omega-3, které aktivují

HNF4 α , a jak už bylo zmíněno, HNF4 α reguluje transkripci genů Abcg5 a Abcg8. Transgenní Fat-1 myš má pak v důsledku většího příjmu PUFAs v potravě zvýšenou expresi jaterních mRNA Abcg5 a Abcg8 (Kim *et al.*, 2012). Dále je známo, že exprese jaterních genů Abcg5 a Abcg8 je zvyšována u potkana trpící hypercholesterolemií (indukovanou speciální stravou) bobulemi palmy euterpe brazilské (*Euterpe oleracea Martius*), v Brazílii je známá jako Acai (de Souza *et al.*, 2012). Expresi genu Abcg5 a Abcg8 u potkana také výrazně zvyšuje rybí olej (Takahashi, 2011).

Naopak sníženou expresi mRNA jaterních Abcg5 a Abcg8 způsobuje endotoxin (Khovidhunkit *et al.*, 2003), který je hlavní složkou buněčných membrán gramnegativních bakterií a je uvolňován z bakterie až po rozpadu buněčné stěny (Lodowska *et al.*, 2013). Tento efekt však nebyl pozorován ve střevní tkáni (Khovidhunkit *et al.*, 2003).

Stejně tak snížení v expresi mRNA těchto genů může způsobit nadměrná exprese miR-200c. Mikro RNA (miRNA) jsou krátké, nekódující RNA, které se vážou k cílovým mRNA a způsobují inhibici translace nebo iniciaci degradace mRNA (Liu *et al.*, 2012). Z toho důvodu mohou být inhibitory miR-200c potenciálně využity k léčbě aterosklerózy, jak je to znázorněno na Obr. 2 (Yu *et al.*, 2014).



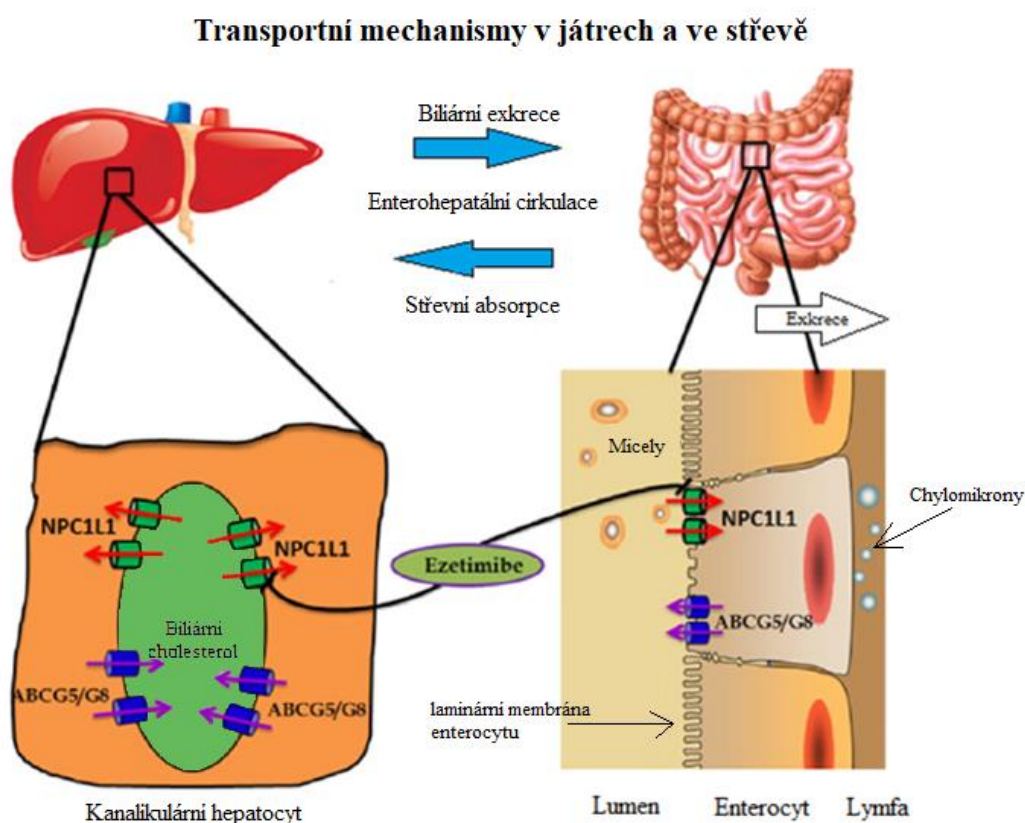
Obrázek 2: Regulace genové exprese Abcg5 a Abcg8 (upraveno a převzato z Yu *et al.*, 2014).

TH – hormon štítné žlázy trijodtyronin, SP – sójový protein, T0901317 – agonista LXR, PUFA omega-3 polynenasycené mastné kyseliny, CBE – extrakt z aronie černé, LXR α – transkripční jaterní faktor X receptor α , HNF4 α – transkripční jaterní jaderný faktor 4 α , GATA4 – transkripční faktor GATA-vázající protein 4, miR-200c – typ krátkých nekódujících RNA.

3.2.2 Intestinální absorpce cholesterolu

Transportéry ABCG5/8 jsou lokalizovány na apikální straně membrány enterocytů, která je vybavena kartáčovým lemem. Jejich úkolem je přenos cholesterolu ze střevních buněk zpět do lumenu střeva. Kromě heterodimeru ABCG5/8 se ve střevních buňkách také nachází protein Niemann-Pick-C1-Like 1 (NPC1L1). Jedná se o transportér, který zajišťuje naopak absorpci cholesterolu z lumenu střeva přes kartáčový lem membrány enterocytů. Tam dochází k jeho esterifikaci a obalení do tzv. chylomikronu. Následně je chylomikron uvolněn do lymfy, do oběhového systému a následně se dostává i do hepatocytu (Yu *et al.*, 2014).

Inhibiční efekt na NPC1L1 má látka ezetimib. Účinek této látky přispívá k inhibici absorpce cholesterolu, proto se užívá při léčbě hypercholesterolemie (Brown *et al.*, 2009). Funkce zmíněných transportérů jsou schematicky znázorněny na Obr. 3.



Obrázek 3: Transport sterolů a cholesterolu pomocí transportního heterodimeru ABCG5/ABCG8 a transportéru NPC1L1 v jaterní a střevní tkáni (upraveno a převzato z Yu *et al.*, 2014).

NPC1L1 – Niemann-Pick-C1-Like 1

3.2.3 Hepatobiliární sekrece cholesterolu

ABCG5 a ABCG8 podporují eliminaci cholesterolu a rostlinných sterolů z těla (Obr. 2). Vědecký tým Yu *et al.* (2002a) prokázal, že pokud dojde k degradaci těchto proteinů, výrazně se sníží hladina cholesterolu ve žluči, přičemž koncentrace fosfolipidů a žlučových kyselin nenabývá žádné změny. Díky tomu lze usoudit, že heterodimer ABCG5/8 vykazuje určitou transportní selektivitu (Yu *et al.*, 2002a). Naopak nadměrná exprese ABCG5/8 u myši zvyšuje hladinu cholesterolu ve žluči o více než pětinašobek (Yu *et al.*, 2002b). Jaterní heterodimer ABCG5/8 je lokalizován na kanalikulární membráně hepatocytů a jeho cílem je přenos cholesterolu do lumenu tenkého střeva přes hepatocyty a žlučovod. Ve žlučovodu se pak cholesterol vyskytuje spolu se žlučovými kyselinami ve formě tzv. micel. V takové formě může být cholesterol znovu vstřebán enterocyty. Cholesterol tedy podléhá tzv. enterohepatální cirkulaci (Yu *et al.*, 2002b).

Na kanalikulární straně jaterních buněk se také nachází NPC1L1, který zajišťuje transport cholesterolu zpět do hepatocytů (Yu *et al.*, 2014), jak je schematicky znázorněno na Obr. 3.

3.3 Model metabolického syndromu

Laboratorní potkani HHTg (z anglického slova hereditary hypertriglyceridemic) jsou speciálně vyšlechtění potkani, kteří slouží jako model pro studium metabolického syndromu (Vrana *et Kazdova*, 1990). V důsledku zvýšené hladiny triglyceridů v krvi trpí řadou onemocnění, zejména hypertenzí (Stolba *et al.*, 1992). Tito potkani byli vyšlechtění z potkanů kmene Wistar, kteří jsou běžně používáni v laboratořích pro vědecké účely (Vrana *et Kazdova*, 1990).

3.3.1 Vznik HHTg potkanů

V roce 1970 doc. Vrána zkoumal (Klimes *et al.*, 1995), jak působí odlišná strava na potkany kmene Wistar. Zjistil, že větší příjem sacharosy a fruktosy způsobí u některých potkanů velkou změnu v plazmatické koncentraci triglyceridů. U těchto potkanů pak propukla hypertriglyceridémie, zatímco u ostatních nikoli. Díky tomuto pokusu bylo zjištěno, že hladina triglyceridů v krvi je geneticky determinovaná (Klimes *et al.*, 1995).

Křížením hypetriglyceridémických potkanů se začínala formovat kolonie HHTg potkanů. Nejprve došlo ke křížení 3 párů hypertriglyceridemických potkanů. Následně byli kříženi jejich potomci systémem bratranec x sestřenice až po 10. generaci. Poté byli potkani kříženi systémem bratr x sestra. Následkem tohoto křížení vznikli potkani s několikanásobně vyšší plazmatickou koncentrací triglyceridů (Vrana *et al.*, 1993). V současnosti se pro vědecké účely metabolického syndromu používají potkani, kteří jsou potomky až 30. generace (Klimes *et al.*, 1995).

3.3.2 Charakteristika HHTg potkanů

Bylo opakovaně prokázáno, že tělesná hmotnost HHTg potkanů je menší než u potkanů kmene Wistar. Díky tomuto faktu nejsou HHTg potkani obézní (Klimes *et al.*, 1995). V důsledku příbuzenského křížení hypetriglyceridémických potkanů je *in vivo* lipogeneze v játrech významně vyšší. Také koncentrace sérového inzulínu a velikost jater je větší. Hladina LDL cholesterolu je stejná ve srovnání s potkany kmene Wistar (Vrana *et Kazdova*, 1990). Dosud nebyla v játrech pozorována změna aktivity LDL receptoru (Sebokova *et al.*, 1992), zato byla pozorována hypertenze (Stolba *et al.*, 1992). Na základě výzkumů bylo potvrzeno, že hypertenze a hypertriglyceridémie mají podobný regulační mechanismus. Hypertenze úzce souvisí se zvýšenou hladinou triglyceridů v plazmě (Vincent *et al.*, 1984). Zdá se, že zvýšená hladina triglyceridů je důležitým faktorem mnoha změn ve struktuře a funkci buněčné membrány u HHTg potkanů (Devynck *et al.*, 1998). Chronická intervence vede ke zvýšení nebo snížení plazmatické koncentrace triglyceridů. Tím může být ovlivněna membránová mikroviskozita a metabolismus cyklických nukleotidů v trombocytech (Pernollet *et al.*, 2001). Proto HHTg potkani představují užitečný model pro analýzu poruch metabolismu lipidů jak na úrovni celého těla, tak na úrovni buněčné membrány (Zicha *et al.*, 2006).

3.4 Western blot

Western blot (WB) je důležitá technika používaná v buněčné a molekulární biologii k separaci a identifikaci proteinů. Na základě metody WB lze identifikovat specifické proteiny z komplexní směsi proteinů extrahovaných z buněk. Technika WB využívá 3 kroky: rozdělení proteinů podle velikosti, přenos proteinů na pevný nosič

a imunodetekce za použití vhodné primární a sekundární protilátky a případně chemiluminiscenčního činidla (Mahmood *et* Yang, 2012).

Před WB obvykle probíhá gelová elektroforéza. Díky gelové elektroforéze se z proteinové směsi oddělí jednotlivé proteiny. Ty jsou poté přeneseny na membránu. Membrána se potom inkubuje s protilátkami, které jsou specifické pro každý protein. Nenavázaná protilátka se odmyje, přičemž zůstává pouze navázaná protilátka ke sledovanému proteinu. Vizualizace jednotlivých proteinů probíhá chemiluminiscenčně za použití vhodného přístroje nebo fotografického filmu. Pokud jsou použity specifické monoklonální protilátky, měl by být viditelný pouze jeden proužek nebo jeden pás proužků pro sledovaný protein. Velikost bandů se vyhodnocuje denzitometricky. Ze získaných dat lze získat relativní množství sledovaného proteinu (Mahmood *et* Yang, 2012).

3.4.1 Příprava vzorku

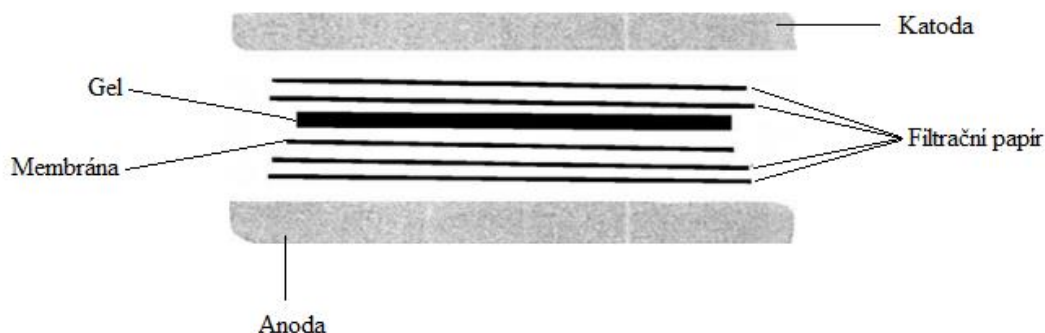
Vzorek s obsahem sledovaných proteinů se získává z tkání nebo buněk. Tento proces by měl probíhat za nízké teploty a v přítomnosti inhibitorů proteáz, které zabraňují denaturaci proteinů. Vzhledem k tomu, že vzorek tkáně vykazuje vyšší stupeň struktury, pro izolaci proteinů je potřebná homogenizace nebo sonikace vzorku, případně diferenciální centrifugace vzorku. Je důležité znát koncentraci proteinů ve vzorku, aby byly vzorky srovnávány na rovnocenném základě. Koncentrace proteinů se často měří s použitím činidla a detekce proteinů se provádí pomocí UV-Vis spektrofotometru. Vzorek se změřeným obsahem proteinů se ředí vzorkovým pufrům, který obsahuje glycerol, takže vzorky snadno klesají do jamek v elektroforetickém gelu, a bromfenolovou modř, aby mohl výzkumník vidět průběh separace proteinů. Dále je ve vzorkovém pufru obsažen dodecylsírán sodný (SDS), který zajišťuje negativní náboj aminokyselin a umožňuje tedy, aby se protein pohyboval v elektrickém poli (aplikované během elektroforézy) ke kladné elektrodě. Před samotnou elektroforézou je potřeba vzorek zahřát, aby proteiny ve vzorku byly denaturovány. K denaturaci také přispívá použití redukčních činidel, jako je merkptoethanol, který štěpí disulfidické můstky v proteinu (Mahmood *et* Yang, 2012).

3.4.2 Gelová elektroforéza SDS-PAGE

Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) v přítomnosti SDS je jeden z elektroforetických způsobů separace proteinů, která probíhá na základě velikosti molekul proteinu. Využívá dva různé typy gelu: zaostřovací a separační. Zaostřovací gel je mírně kyselé (pH 6,8) s nižší koncentrací akrylamidu, čímž vytváří pórovitý gel, který hůře odděluje proteiny, ale umožňuje tvořit tenké, ostře definované pásy. Separační gel je zásaditý (pH 8,8) a obsahuje větší koncentraci akrylamidu, díky kterému se póry v gelu zužují. Proteiny, které jsou nanášeny na gel, mají záporný náboj, díky přídavku dodecylsírany sodného (SDS). Do jamek zaostřovacího gelu se pipetují vzorky připravené dle odstavce 3.4.1. Kromě vzorků se do jamek gelu také vkládá tzv. molekulární marker, který obsahuje fragmenty o definované velikosti. Kvůli přídavku SDS mají všechny proteiny ve vzorku záporný náboj, a tudíž se všechny proteiny během elektroforézy separují stejným směrem (ke kladné elektrodě). Separace proteinů závisí jak na molekulové hmotnosti, tak i na stupni denaturace sledovaného proteinu (Kurien *et* Scofield, 2006).

3.4.3 Přenos

Separované proteiny jsou po elektroforéze převedeny na membránu. Přenos se provádí pomocí elektrického pole orientovaného kolmo na povrch gelu a membrány, což způsobuje, že jsou proteiny převedeny z gelu na membránu. Membrána je umístěna mezi gelem a kladnou elektrodou v tzv. sendviči, jak je zobrazeno na Obr. 4. Aby přenos probíhal co nejlépe, je sendvič předem vložený do tzv. přenosového pufru. Pro WB se používají různé typy membrán: nejčastěji nitrocelulózoová a polyvinylidendifluoridová (PVDF) (Kurien *et* Scofield, 2006).



Obrázek 4: Skládání blotovacího sendviče.

3.4.4 Blokování a imunodetekce

Blokování je důležitým krokem WB. Zabraňuje, aby se protilátky nenavázaly do míst, kde nejsou přenesené proteiny. Blokování se často provádí pomocí hovězího sérového albuminu (BSA) nebo nízkotučného mléka. Mléko je často upřednostňováno kvůli jeho ceně a široké dostupnosti (Kurien *et* Scofield, 2006).

Imunodetekce probíhá za použití primární protilátky, která se během inkubace naváže na sledovaný protein, poté sekundární protilátky, která se naváže na primární protilátku. Sekundární protilátka může být fluorescenčně značená, detekce pak probíhá fluorescenčně, nebo je značená enzymem křenovou peroxidasou (HRP). V tomto případě se používá ještě chemiluminiscenční činidlo a detekce probíhá chemiluminiscenčně. Získané signály se detekují vhodným přístrojem nebo za použití fotografického filmu (Kurien *et* Scofield, 2006).

3.4.5 Kvantifikace

Výsledkem metody WB jsou zóny nebo tzv. proužky, které odpovídají množství sledovaných proteinů. Poloha proužku umožňuje identifikovat protein, intenzita signálu pak určit množství proteinu (Kurien *et* Scofield, 2006).

4 MATERIÁL a METODY

4.1 Biologický materiál

Pro studii bylo vybráno 23 samců hereditárně hypertriglyceridemického (HHTg) potkana (stáří 3 měsíce, hmotnost 340-350 g). Zvířata byla chována za standardních podmínek s volným přístupem ke krmivu i vodě. Potkani byli krmeni (*ad libitum*) standardní laboratorní dietou (STD) a v případě experimentálních skupin (celkem tří) byla STD obohacena o mikronizovaný silymarin (SM; 1 % v STD), PUFAs omega-3 (300 mg/kg/den) nebo kombinaci mikronizovaného silymarinu a PUFAs omega-3 (Tab. 1). V každé skupině bylo šest zvířat, v poslední skupině bylo jen pět zvířat. Po čtyřech týdnech byla zvířata dekapitována, exsanguinována a tkáně tenkého střeva byly zamraženy na -70 °C pro další analýzu.

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

Tabulka 1: Čísla potkanů a jejich rozdělení do skupin na základě odlišné stravy.

Skupina	Číslo vzorku	Skupina	Číslo vzorku
Kontrola	1	Kontrola	13
Kontrola	2	Kontrola	14
Kontrola	3	Kontrola	15
SM	4	SM	16
SM	5	SM	17
SM	6	SM	18
PUFAs	7	PUFAs	19
PUFAs	8	PUFAs	20
PUFAs	9	PUFAs	21
PUFAs + SM	10	PUFAs + SM	22
PUFAs + SM	11	PUFAs + SM	23
PUFAs + SM	12		

Kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; PUFAs + SM – skupina s kombinovanou dietou.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 1,2-bis(dimethylamino)etan (Sigma-Aldrich, katalogové číslo T9281, Praha, ČR)
- 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, katalogové číslo M3148, Praha, ČR)
- Akrylamid LIQUI-GEL™ 37.5:1 (MP Biomedicals LLC, katalogové číslo 800804, Santa Ana, Kalifornie, USA)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, katalogové číslo B-8026, Praha, ČR)
- Dihydridrát sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Penta, katalogové číslo 18080-30500, Praha, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner, katalogové číslo 30145, Neratovice, ČR)
- Dodecylsíran sodný (Sigma-Aldrich, katalogové číslo L3771, Praha, ČR)
- Fenylmetylsulfonylfluorid (Sigma-Aldrich, katalogové číslo 78830, Praha, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, katalogové číslo G8898, Praha, ČR)
- Chlorid draselný (Lachner, katalogové číslo 30076-CPO, Neratovice, ČR)
- Inhibitory proteáz cOmplete (Roche, katalogové číslo 11836145001, Basilej, SUI)
- Isopropanol (Penta, katalogové číslo 17540, Praha, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachner, katalogové číslo 10033-A35, Neratovice, ČR)
- Metanol (Sigma-Aldrich, katalogové číslo 32213, Praha, ČR)
- Molekulární marker Dual Xtra Standards (BIO-RAD, katalogové číslo 161-0377, Hercules, Kalifornie, USA)
- Molekulární marker Kaleidoscope™ (BIO-RAD, katalogové číslo 161-0375, Hercules, Kalifornie, USA)
- n-butanol (Sigma-Aldrich, katalogové číslo B7906, Praha, ČR)
- Omega-3 polynenasycené mastné kyseliny: směs 310 mg kyselina dokosahexaenové (DHA) a 43 mg kyseliny eikosapentaneové (EPA) (katalogové číslo 130616, Smart City S.A., Lucemburk, LU)
- Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich, katalogové číslo A3678, Praha, ČR)

- Primární protilátka Goat polyclonal antibody Actin (I-19), ředěno 1:500 v TBS TWEEN MILK (Santa Cruz Biotechnology, katalogové číslo sc-1616, Santa Cruz, Kalifornie, USA)
- Primární protilátka Mouse monoclonal antibody GAPDH (G9), ředěno 1:500 v TBS TWEEN MILK (Santa Cruz Biotechnology, katalogové číslo sc-365062, Santa Cruz, Kalifornie, USA)
- Primární protilátka Mouse monoclonal antibody β -Tubulin (D3U1W), ředěno 1:500 v TBS TWEEN Milk (Cell Signaling Technology, katalogové číslo 86298, Danvers, Massachusetts, USA)
- Primární protilátka Rabbit polyclonal antibody ABCG5, ředěno 1:500 v TBS TWEEN Milk (Bioss antibodies, katalogové číslo bs-5013R, Woburn, Massachusetts, USA)
- Primární protilátka Rabbit polyclonal antibody ABCG8 (H-300), ředěno 1:500 v Solution 1 for primary antibodies od Merck millipore, (Santa Cruz Biotechnology, INC., katalogové číslo sc-30111, Santa Cruz, Kalifornie, USA)
- Sacharosa (Penta, katalogové číslo 24970-31000, Praha, ČR)
- Sekundární protilátka Goat anti rabbit polyclonal antibody IgG, ředěno 1:10 000 v Solution 1 for primary antibodies od Merck millipore, (Sigma-Aldrich, katalogové číslo A0545, Praha, ČR)
- Sekundární protilátka Rabbit anti goat polyclonal antibody IgG, ředěno 1:10 000 v Solution 1 for primary antibodies od Merck millipore, (Sigma-Aldrich, katalogové číslo A5420, Praha, ČR)
- Standardizovaný extrakt silymarinu, mikronizovaný (Favea, Kopřivnice, ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, katalogové číslo T1503, Praha, ČR)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, katalogové číslo P1379, Praha, ČR)
- Ustalovač (Sigma-Aldrich, katalogové číslo 7167, Praha, ČR)
- Vývojka (Sigma-Aldrich, Praha, katalogové číslo P7042, ČR)

4.2.2 Použité soupravy

- blotovací papíry TransBlot® Turbo™ Mini-size Transfer Stacks (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)
- filmy Medical X-Ray Blue (Agfa, Mortsel, B)

- membrány TransBlot® Turbo™ Mini-size PVDF (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)
- Pierce BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, katalogové číslo 23225, Waltham, Massachusetts, USA)
- Precellys lysing KIT, Hard tissue homogenizing CK 28_15 ml (Bertin Corporation, katalogové číslo P000947-LYSK0-A, Montigny-le-Bretonneux, FR)
- Western Blotting Luminol Reagent kit (Santa Cruz Biotechnology, katalogové číslo sc-2048, Texas, Dallas, USA)

4.2.3 Použité roztoky

- homogenizační pufr: 42,7875 g sacharosa; 0,1861 g EDTA; rozpustit do 0,5 l vody a před doplněním po rysku upravit pH na 7,4
- odmývací roztok: 0,781 ml merkptoetanol; 2 g SDS; 0,757 Tris; přidat H₂O, upravit pH pomocí HCl na 6,7 a doplnit H₂O do 100 ml
- promývací pufr: 3,0275 g Tris; 5,5913 g KCl; rozpustit do 0,5 l vody a před doplněním po rysku upravit pH na 7,4
- roztok pro elektroforézu: 1,51 g Tris; 7,25 g glycin, 5 ml 10% SDS; doplnit H₂O do 500 ml
- roztok pro separační gel: 181,65 g Tris; přidat H₂O; upravit pomocí HCl na pH 8,8 a doplnit H₂O do 1000 ml
- roztok pro zaostřovací gel: 60,55 g Tris přidat H₂O; upravit pomocí HCl na pH 6,8 a doplnit H₂O do 1000 ml
- separační gel (10 ml 8%): 4,68 ml H₂O; 2,50 ml roztoku pro separační gel; 100 µl SDS; 2,67 ml akrylamid; 50 µl 10% peroxidisíran amonný; 5 µl TEMED
- TBS pufr: 6,055 g Tris; 8,766 NaCl; přidat H₂O, upravit pH pomocí HCl na 7,4 a doplnit H₂O do 1000 ml
- TBS TWEEN: 50 ml TBS pufru; 125 µl TWEEN 20
- TBS TWEEN Milk: 6,25 ml mléka do 100 ml TBS TWEEN
- transférový pufr: 3,0275 g Tris; 14,413 g glycin; 200 ml metanol; doplnit H₂O do 1000 ml
- zaostřovací gel (5 ml 4%): 3,05 ml H₂O; 1,25 ml zaostřovací pufr; 50 µl SDS; 650 µl akrylamid; 25 µl peroxidisíran amonný; 5 µl TEMED

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- analytická váha, Xp 205 DELTA RANGE[®] (Mettler-Toledo, Praha, ČR)
- centrifuga Hermle Z 323 K (Gosheim, D)
- centrifuga mini Spin (Eppendorf, Hamburk, D)
- elektroforéza Power PAC[™] HC (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)
- falkonky 50 ml VWR[®] SuperClear[™] (katalogové číslo 21008-240, Radnor, Pensylvánie, USA)
- homogenizátor Precellys Evolution (Bertin Technologies, Rockville, Maryland, USA)
- inkubátor DRY BATH INCUBATOR (Major Science, San Jose, Kalifornie, USA)
- míchačka Sunflower mini shaker (P-LAB a.s., Praha, ČR)
- pH metr (Mettler TOLEDO, Columbus, Ohio, USA) + míchačka (Heidolph, Schwabach, D)
- snap i.d.[™] (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- spektrofotometr INFINITE M200 (TECAN, Mannedorf, SUI)
- TRANS-BLOT[®] TURBO[™] (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)
- třepačka Sunflower Mini-Shaker (P-LAB a.s., Praha, ČR)
- ultracentrifuga Optimal LE-80K (Beckman, Praha, ČR)
- váha Adventurer[™] Pro (Ohaus, Columbus, Ohio, USA)
- vodní lázeň (Memmert, Schwabach, D)
- vortex IKA[®] MS3 Basic (MERCY s.r.o., Ostrava, ČR)
- vývěva VacSafe[™] Scanvac (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- zdroj napětí PowerPac[™] HC 250 V, 3.0 A, 300 W (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)
- zdroj vakua VacSafe[™] (SCANVAC, Lillerod, DK)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace cytosolární frakce z potkaních střev

V den přípravy byly nejprve připraveny 2 roztoky fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF), které byly připraveny navážením 17,5 mg PMSF a rozpuštěním v 0,5 ml isopropanolu.

Tyto roztoky byly použity do 0,5 l homogenizačního a 0,5 l promývacího pufru. Poté byly přidány tabletky s inhibitory proteáz (1 tabletky na 50 ml).

Po celou dobu probíhala práce na ledě a v rukavicích.

1. Střevní tkáň byla rozstříhána, zbavena exkrementů, řádně osušena buničinou a zvážena na analytických vahách.
2. Tkáň byla vložena do vychlazené kádinky a zalita vychlazeným homogenizačním pufrem.
3. Pufř byl slit přes gázu.
4. Takto byla tkáň promyta ještě 2x.
5. Do odměrného válce bylo odlito 10 ml homogenizačního pufru s inhibitory proteáz.
6. Pomocí pinzety byla střevní tkáň přenesena do Precellys zkumavky, byl přidán homogenizační pufř s inhibitory proteáz a proběhla homogenizace 2x 10 s při 7200 ot/min.
7. Zhomogenizovaná tkáň byla s pufrem přelita do vymražené 50ml zkumavky a pomocí homogenizačního pufru dolita na stejnou váhu jako ostatní zkumavky.
8. Zkumavka byla centrifugována při 6500 ot/min v rotoru s poloměrem 103 mm při 4 °C po dobu 10 min.
9. Supernatant byl odlit do čisté vychlazené zkumavky.
10. Proběhla centrifugace při 11 000 ot/min v rotoru s poloměrem 103 mm při 4 °C po dobu 25 min.
11. Po centrifugaci byl supernatant slit do vychlazené ultracentrifugační zkumavky, objem byl doplněn po okraj homogenizačním pufrem a zkumavka byla uzavřena uzávěrem tak, aby uvnitř zkumavky nebyla žádná vzduchová bublina.
12. Proběhla ultracentrifugace při 35 000 ot/min v rotoru s poloměrem 91,9 mm a 4 °C po dobu 60 min.
13. Po ultracentrifugaci se v supernatantu nacházel cytosol a v sedimentu mikrosomální frakce. Cytosol byl zamražen v 1,5ml mikrozkuvkách na -70 °C.

4.4.2 Měření koncentrace proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA)

1. Cytosolární frakce byla zředěna 100 mM roztokem KH_2PO_4 , pH 7,4 v poměru 1:9.
2. Směs byla zvortexována a uchována na ledu.
3. Pro kalibrační křivku byl použit hovězí sérový albumin o výchozí koncentraci 2 mg/ml (Tab. 2).

4. Do plastové vaničky byla smíchána BCA s CuSO_4 v poměru 50:1, tj. 19 ml:380 μl .
5. Poté bylo napipetováno na mikrotitrační destičku 25 μl jednotlivých vzorků, albuminu a blanku. (Tab. 3). Do každé jamky bylo napipetováno 200 μl smíchaného činidla.
6. Směs byla vložena do inkubátoru po dobu 30 min při 37 °C.
7. Nakonec byla změřena absorbance pomocí UV-Vis spektrofotometru při 562 nm.

Tabulka 2: Ředění hovězího sérového albuminu (BSA).

Přidaný objem BSA o koncentraci 2 mg/ml [μl]	Přidaný objem 100 mM KH_2PO_4, pH 7,4 [μl]	Výsledná koncentrace v jamce [mg/ml]
10	90	0,2
20	80	0,4
30	70	0,6
40	60	0,8

Tabulka 3: Schéma pipetování hovězího sérového albuminu, blanku a jednotlivých vzorků do mikrotitrační destičky.

sloupec / řada	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8
B	0,8	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4
C	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	8	8
D	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12
E	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	16	16
F	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19	20	20
G	20	21	21	21	22	22	22	23	23	23	blank	blank

0,2–0,8 – koncentrace albuminu [mg/ml] potřebné pro kalibrační křivku; 1–23 – čísla jednotlivých vzorků.

4.4.3 Příprava vzorků pro elektroforézu

1. Ke vzorku o objemu 50 μl bylo do mikrozkušavek napipetováno 45 μl vzorkového pufru s bromfenolovou modří.
2. Následně bylo ke vzorkům napipetováno 5 μl merkaptoetanolu.
3. Vzorky se nechaly 5 minut vařit a poté byly stočeny na 5 min v centrifuze při 3000 ot/min v rotoru s poloměrem 60,3 mm.

4.4.4 SDS-PAGE

1. Skla na elektroforézu byla odmaštěna lihem a skla byla k sobě přiložena tak, aby mezi skly vznikl prostor pro nalévání gelu.
2. Skla byla vložena do držáku.
3. Skla byla v držáku pečlivě vyrovnána s podložkou a poté vložena do stojánku.
4. V kádince byl připraven dělicí gel, který byl poté Pausterovou pipetou nalit mezi skla.
5. Gel byl převrstven malým množstvím n-butanolu.
6. Gel byl ponechán tuhnout 30 minut.
7. Jakmile gel ztuhl, n-butanol byl slit, gel byl opláchnut vodou a prostor mezi skly vysušen filtračním papírem.
8. V kádince byl připraven zaostřovací gel, který byl poté Pausterovou pipetou nalit mezi skla.
9. Ihned byl vložen mezi skla hřebínek a gel byl nechán tuhnout 20 min.
10. Skla byla se ztuhlými gely vyndána ze stojanu i držáku a přesunuta do elektroforetické komory (malé sklo směřovalo to středu komůrky).
11. Z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek.
12. Elektroforetická komora byla naplněna pufrem pro elektroforézu.
13. Do jamek bylo napipetováno 3 μl markeru (M1, M2) a vzorky (Tab. 4). Vzorky měly odlišný objem (Tab. 6), aby bylo v jamkách stejné množství proteinů (20 μg).
14. Po nanesení vzorků byla elektroforetická komora přenesena do elektroforetické vany.
15. Elektroforetická vana byla naplněna pufrem pro elektroforézu.
16. Vana byla uzavřena víkem se správnou orientací elektrod.
17. Elektrody byly zapojeny do zdroje s konstantním napětím 120 V.

18. Po doputování vzorků na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu byl nastaven zdroj napětí na 180 V.
19. Po 45 minutách byl zdroj napětí vypnut, elektroforetická komora byla vyndána z vany a z elektroforetické komory byl vyndán gel, který byl ponořen do transferového pufru.

Tabulka 4: Schéma pipetování vzorků do jamek zaostřovacího gelu.

Číslo jamky / gel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. gel	M1	1 (K)	13 (K)	4 (SM)	16 (SM)	7 (PUFAs)	19 (PUFAs)	10 (SM + PUFAs)	22 (SM + PUFAs)	x
2. gel	x	2 (K)	14 (K)	5 (SM)	17 (SM)	8 (PUFAs)	20 (PUFAs)	11 (SM + PUFAs)	23 (SM + PUFAs)	M1
3. gel	M2	13 (K)	5 (K)	6 (SM)	18 (SM)	9 (PUFAs)	21 (PUFAs)	12 (SM + PUFAs)	22 (SM + PUFAs)	x

M1 – marker 1, M2 – marker 2, K – kontrolní skupina, SM - silymarin, PUFAs – omega-3 polynenasycené mastné kyseliny.

4.4.5 Metoda WB

1. Membrána byla zalita na 5 s metanolem a následně 3x H₂O v intervalu po dobu 5 min.
2. Poté byla membrána zalita na 15 min přenosovým pufrem.
3. Na anodu byly položeny 2 blotovací papíry navlhčené přenosovým pufrem, na ně byla přiložena membrána a poté gel, který byl přikryt dalšími 2 blotovacími papíry navlhčené transferovým pufrem. Sendvič byl přejet válečkem, aby byly odstraněny vzduchové bubliny.
4. Sendvič byl přikryt katodou a trans blot byl zapojen ke zdroji. Byl nastaven proud na 2,5 A a napětí na 25 V po dobu 7 minut.

4.4.6 Blokování a imunodetekce

Promytí membrán probíhalo na třepačce.

1. Po ukončení WB byla membrána položena na filtrační papír a řádně vysušena.

2. Poté byla membrána promyta 2x v TBS v intervalu 5 min, v TBS TWEEN milk po dobu 60 min a v 1x v TBS po dobu 5 min.
3. Membrána byla následně promyta v primární protilátce při 8 °C, inkubace probíhala přes noc.
4. Poté byla membrána promyta 3x v TBS TWEEN v intervalech po dobu 5 min.
5. Poté se nechala membrána 15 min inkubovat se sekundární protilátkou za použití přístroje Snap i.d.. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě.
6. Po 15 min byla sekundární protilátka odsáta přes membránu přístrojem Snap i.d. a membrána byla promyta 5x 25 ml TBS TWEEN.
7. Na membránu byla nalita směs chemiluminiscenčních činidel o objemu 4 ml.
8. Poté byla membrána položena mezi 2 fólie a přenesena do fotokomory.
9. Ve fotokomoře byla membrána exponována na medicínální film.
10. Medicínální film byl vyvolán s použitím vývojky a ustalovače. Vyvolání filmu probíhalo bez viditelného světla.

Po ukončení detekce proteinů byly membrány promyty v promývacím roztoku a vloženy do inkubátoru na 30 min při 60 °C. Bod 4.4.6 se opakoval detekci srovnávacích proteinů β -Tubulin, β -Actin a GAPDH.

4.4.7 Vyhodnocení proužků (normalizace dat)

Normalizace dat je důležitá k přesnému porovnání exprese sledovaného proteinu v různých vzorcích u analýzy Western blot. Normalizace dat proběhla dle Loading Control Handbook od firmy Novus Biologicals (Littleton, Colorado, USA). Pro normalizaci exprese cílového proteinu se intenzita proužku každého vzorku stanovovala pomocí denzitometrického softwaru. Elfoman (ver. 2.6; Semecký, Praha, ČR). Normalizace hustoty jednotlivých vzorků byla stanovena poměrem intenzity proužku kontrolního proteinu (v našem případě β -Tubulinu) prvního vzorku k intenzitě proužku kontrolního proteinu pro daný vzorek. Tento poměr se vynásobil intenzitou proužku sledovaného proteinu (ABCG5 nebo ABCG8) pro daný vzorek. Tento výpočet upravoval expresi sledovaného proteinu do společného měřítka. Takto získaná normalizační hustota se použila pro relativní srovnání množství proteinu mezi vzorkami. Relativní vyjádření jednotlivých vzorků byly vypočítány poměrem normalizační hustoty daného vzorku k normalizační hustotě prvního vzorku.

Poté byly zprůměrovány hodnoty relativního vyjádření pro jednotlivé skupiny potkanů. Dále byl proveden přepočítání průměru relativního vyjádření na procenta a vypočítána směrodatná odchylka. Nakonec byla stanovena střední chyba průměru, která se vypočítala jako poměr směrodatné odchylky a odmocniny jednotlivých četností ve skupinách.

4.4.8 Statistická analýza

Na základě vyhodnocení proužků proběhla následná statistická analýza v programu Statistica (StatSoft, ČR). Jako test byl zvolen neparametrický test, konkrétně Kruskal-Wallisův, díky kterému je možné porovnávat výsledky více skupin. Grafické znázornění analýzy rozptylů jednotlivých proteinů je znázorněno v krabicovém grafu (Obr. 9 a 12).

5 VÝSLEDKY

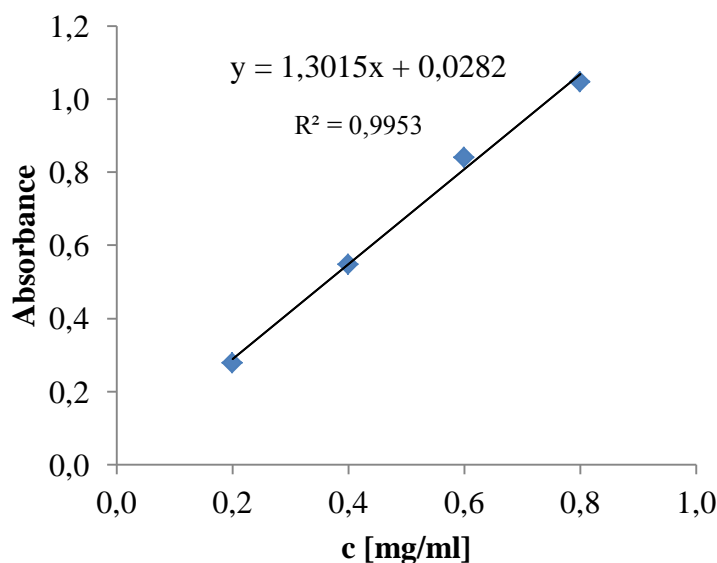
V praktické části byla nejprve provedena izolace cytosolární frakce z 23 potkaních střev. Pomocí roztoku PMSF a dalších inhibitorů proteáz nedocházelo při izolaci k degradaci proteinů. Pomocí diferenciální centrifugace došlo k následné izolaci cytosolární frakce.

Poté bylo potřeba změřit koncentraci proteinů v jednotlivých vzorcích. Smícháním chemikálií z kitu pro stanovení proteinu metodou BCA se vzorky, BSA a blankem byla v mikrotitrační destičce pomocí spektrofotometru změřena koncentrace proteinů při 562 nm. Kalibrační křivka byla vytvořena pomocí BSA (Obr. 5).

Tabulka 5: Změřené absorbance pro hovězí sérový albumin pomocí UV-Vis spektrofotometru. Měřeno při 562 nm.

c [mg/ml]	A	A	A	průměr A	A po odečtení blanku
blank	0,1692	0,1573	0,1527	0,1597	x
0,2	0,4532	0,4484	0,4109	0,4375	0,2778
0,4	0,7432	0,7203	0,6628	0,7088	0,5490
0,6	1,0219	1,0000	0,9802	1,0007	0,5490
0,8	1,1510	1,2714	1,2011	1,2078	1,0481

A – absorbance



Obrázek 5: Kalibrační křivka hovězího sérového albuminu s rovnicí lineární regrese a hodnotou spolehlivosti R^2 .

Pomocí kalibrační křivky byla zjištěna rovnice lineární regrese, díky které byla stanovena koncentrace všech proteinů v jednotlivých vzorcích. Na základě zjištěné koncentrace celkových proteinů ve vzorcích bylo spočítáno, jaký objem vzorku použít na elektroforézu, aby obsahoval vždy 20 µg proteinů (Tab. 6).

Výpočet č. 1: Výpočet pro vzorek 1:

Bude potřeba 50 µl vzorku, který bude zředěn na 100 µl a je zapotřebí zjistit, kolik µl vzorku je třeba pipetovat do elektroforetické jamky, ve kterých bude vždy obsaženo 20 µg proteinu.

- **výpočet koncentrace celkového proteinu ve vzorku 1 z kalibrační křivky**

$$y = 1,3015x + 0,0282$$

$$0,6540 = 1,3015x + 0,0282$$

$$x = \underline{0,4808 \text{ mg/ml}}$$

- **zahrnuto ředění (10x)**

$$t = 0,4808 \text{ mg/ml} \cdot 10 = \underline{4,808 \text{ mg/ml}}$$

- **výpočet množství celkového proteinu v 50 µl vzorku**

$$\begin{array}{l} \uparrow 4,808 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ } \mu\text{l} \uparrow \\ \left| \frac{v \text{ mg} \dots\dots\dots 50 \text{ } \mu\text{l}}{v = \underline{0,2404 \text{ mg}}} \right| \end{array}$$

- **přepočet množství na µg**

$$w = 0,2404 \text{ mg} \cdot 1000 = \underline{240,4 \text{ } \mu\text{g}}$$

- **výpočet objemu vzorku obsahující 20 µg proteinu**

$$\begin{array}{l} \uparrow 240,4 \text{ } \mu\text{g} \dots\dots\dots 100 \text{ } \mu\text{l} \uparrow \\ \left| \frac{20 \text{ } \mu\text{g} \dots\dots\dots z \text{ } \mu\text{l}}{z = \underline{8,32 \text{ } \mu\text{l}}} \right| \end{array}$$

Objemy jednotlivých vzorků, které obsahují 20 µg proteinů, byly vypočítány u všech vzorků a zahrnuty v tab. 6.

Tabulka 6: Stanovení objemu 23 vzorků obsahující stejné množství celkových proteinů (20 µg).

	A	A	A	průměr A	A po odečtení blanku	po dosažení do rovnice [mg/ml]	·ředění (·10) [mg/ml]	množství v 50 µl [mg]	přepočet na µg	přepočet objemu na 20 µg [µl]
blank	0,1692	0,1573	0,1527	0,1597	x	x	x	x	x	x
vzorek 1	0,8110	0,8477	0,7825	0,8137	0,6540	0,4808	4,8083	0,2404	240,4149	8,32
vzorek 2	0,7629	0,7023	0,7335	0,7329	0,5732	0,4187	4,1872	0,2094	209,3610	9,55
vzorek 3	0,7609	0,7647	0,7027	0,7428	0,5830	0,4263	4,2630	0,2132	213,1515	9,38
vzorek 4	0,6370	0,7059	0,6520	0,6650	0,5052	0,3665	3,6653	0,1833	183,2629	10,91
vzorek 5	0,4871	0,4736	0,4657	0,4755	0,3157	0,2209	2,2092	0,1105	110,4623	18,11
vzorek 6	0,7586	0,7513	0,7480	0,7526	0,5929	0,4339	4,3388	0,2169	216,9420	9,22
vzorek 7	0,8176	0,7798	0,6445	0,7473	0,5876	0,4298	4,2979	0,2149	214,8931	9,31

Tabulka 6: Stanovení objemu 23 vzorků obsahující stejné množství celkových proteinů (20 µg).

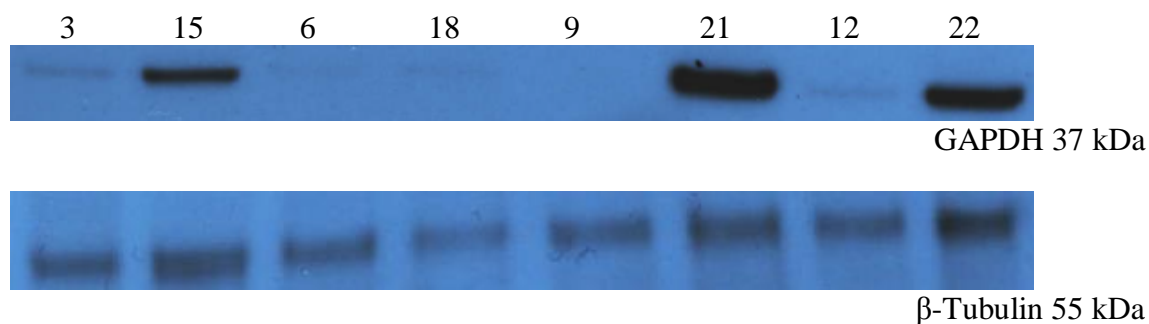
	A	A	A	průměr A	A po odečtení blanku	po dosažení do rovnice [mg/ml]	ředění ($\cdot 10$) [mg/ml]	množství v 50 mikrolitrech [mg]	přepočet na mikrogramy [µg]	přepočet objemu na 20 mikrogramů [µl]
vzorek 8	0,9286	0,8715	0,8936	0,8979	0,7382	0,5455	5,4550	0,2727	272,7494	7,33
vzorek 9	0,9437	0,9217	0,9207	0,9287	0,7690	0,5692	5,6916	0,2846	284,5819	7,03
vzorek 10	1,1085	1,0505	1,0663	1,0751	0,9154	0,6816	6,8165	0,3408	340,8247	5,87
vzorek 11	0,6476	0,6602	0,6612	0,6563	0,4966	0,3599	3,5989	0,1799	179,9462	11,11
vzorek 12	0,8008	0,8031	0,6491	0,7510	0,5913	0,4326	4,3263	0,2163	216,3145	9,25
vzorek 13	0,8768	0,8469	0,8156	0,8464	0,6867	0,5060	5,0595	0,2530	252,9773	7,91
vzorek 14	0,8232	0,8391	0,8179	0,8267	0,6670	0,4908	4,9082	0,2454	245,4091	8,15
vzorek 15	0,7330	0,7148	0,8042	0,7507	0,5909	0,4324	4,3237	0,2162	216,1865	9,25

Tabulka 6: Stanovení objemu 23 vzorků obsahující stejné množství celkových proteinů (20 µg).

	A	A	A	průměr A	A po odečtení blanku	po dosažení do rovnice [mg/ml]	ředění ($\cdot 10$) [mg/ml]	množství v 50 mikrolitrech [mg]	přepočet na mikrogramy [µg]	přepočet objemu na 20 mikrogramů [µl]
vzorek 16	0,8729	0,8858	0,7048	0,8212	0,6614	0,4865	4,8654	0,2433	243,2706	8,22
vzorek 17	0,6447	0,6793	0,6422	0,6554	0,4957	0,3592	3,5918	0,1796	179,5877	11,14
vzorek 18	0,8832	0,8738	0,8593	0,8721	0,7124	0,5257	5,2568	0,2628	262,8378	7,61
vzorek 19	0,6430	0,6363	0,5951	0,6248	0,4651	0,3357	3,3566	0,1678	167,8320	11,92
vzorek 20	0,8549	0,8848	0,8578	0,8658	0,7061	0,5209	5,2086	0,2604	260,4303	7,68
vzorek 21	0,6518	0,6275	0,5993	0,6262	0,4665	0,3367	3,3674	0,1684	168,3698	11,88
vzorek 22	0,6805	0,7395	0,7306	0,7169	0,5571	0,4064	4,0640	0,2032	203,2014	9,84
vzorek 23	0,6851	0,6553	0,6672	0,6692	0,5095	0,3698	3,6978	0,1849	184,8892	10,82

Vzorky byly separovány pomocí SDS-PAGE. Po elektroforetické separaci proběhl WB a následná chemiluminiscenční detekce proteinů na fotografický film (Obr. 6, 7 a 10).

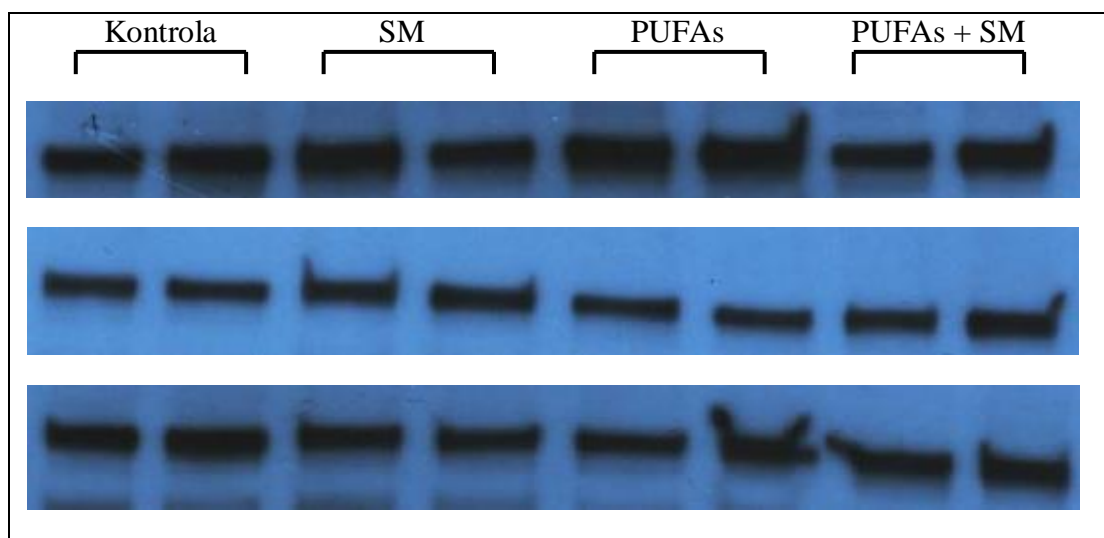
Jako tzv. housekeeping proteiny (kontrolní proteiny ukazující, jak byly vzorky nanесeny do jamek gelu) byly použity tyto: β -Actin (data neuvedena), GAPDH a β -Tubulin. Na základě srovnání těchto kontrolních proteinů mezi sebou (Obr. 6) byl vybrán β -Tubulin jako nejvhodnější kontrolní protein pro zjištění, zda všechny nanесené vzorky byly na gel nanесeny stejně (tedy obsahovaly stejné množství celkového proteinu).



Obrázek 6: Reprezentativní Western blot proužky „housekeeping“ proteinů GAPDH a β -Tubulinu u vzorků 3, 15, 6, 18, 9, 21, 12 a 22.

3, 15 – kontrolní skupina; 6, 18 – skupina s mikronizovaným silymarinem (SM); 9, 21 – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFAs); 12, 22 – skupina s kombinovanou dietou (SM + PUFAs).

- Stanovení exprese ABCG5 proteinu u jednotlivých vzorků a porovnání mezi skupinami potkanů



Obrázek 7: Reprezentativní Western blot proužky pro ABCG5 (75 kDa) protein.

Kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; PUFAs + SM – skupina s kombinovanou dietou.

Tabulka 7: Stanovení intenzity proužků u jednotlivých vzorků pro ABCG5 protein a kontrolní β -Tubulin, normalizace dat pro ABCG5 protein a porovnání mezi skupinami.

membrána	potkan	skupina	β -Tubulin	ABCG5	normalizace hustoty (ABCG5)	Porovnání mezi skupinami (r. j.)
1	1	kontrola	0,35	0,72	0,72	1,00
1	13	kontrola	0,47	0,97	0,71	0,98
1	4	SM	0,87	1,02	0,40	0,56
1	16	SM	0,39	0,85	0,75	1,03
1	7	PUFAs	0,97	1,05	0,37	0,52
1	19	PUFAs	1,01	1,09	0,37	0,52
1	10	SM + PUFAs	0,54	0,84	0,54	0,74
1	22	SM + PUFAs	0,87	0,93	0,37	0,51
2	2	kontrola	0,47	0,57	0,57	1,00
2	14	kontrola	0,31	0,61	0,93	1,64
2	5	SM	0,42	0,69	0,77	1,36
2	17	SM	0,39	0,81	0,98	1,72
2	8	PUFAs	0,40	0,69	0,82	1,45
2	20	PUFAs	0,30	0,58	0,90	1,59
2	11	SM+ PUFAs	0,25	0,63	1,17	2,06
2	23	SM+ PUFAs	0,70	0,82	0,55	0,96

Tabulka 7: Stanovení intenzity proužků u jednotlivých vzorků pro ABCG5 protein a kontrolní β -Tubulin, normalizace dat pro ABCG5 protein a porovnání mezi skupinami.

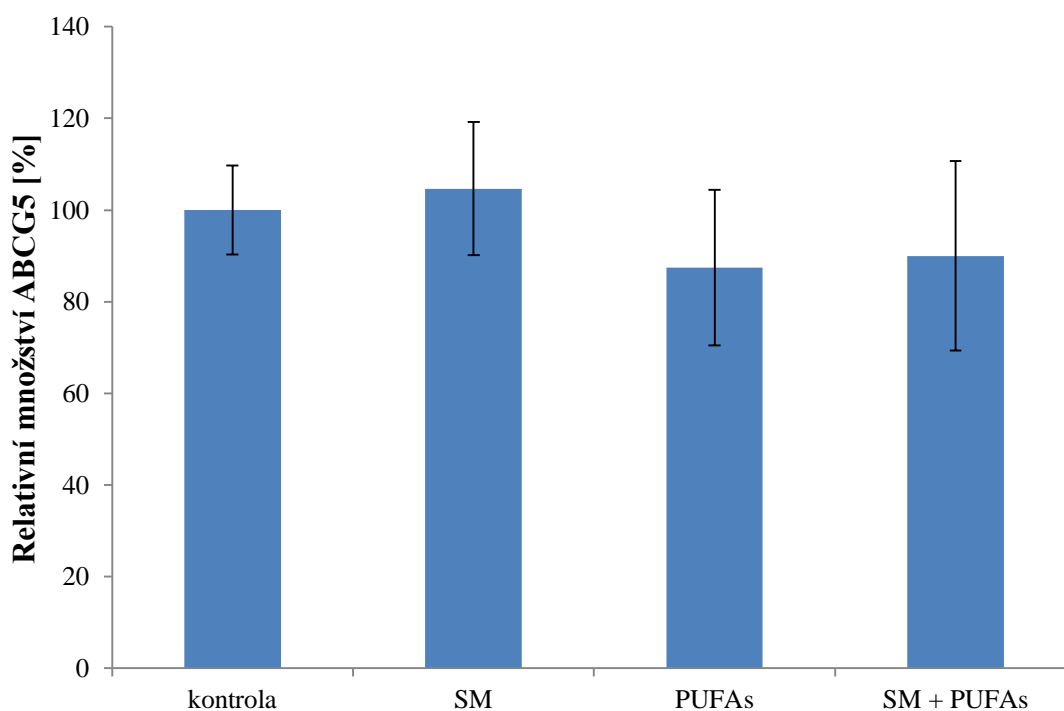
membrána	potkan	skupina	β -Tubulin	ABCG5	normalizace hustoty (ABCG5)	Porovnání mezi skupinami (r. j.)
3	3	kontrola	0,39	0,60	0,60	1,00
3	15	kontrola	0,50	0,75	0,59	0,98
3	6	SM	0,48	0,72	0,59	0,98
3	18	SM	0,32	0,62	0,75	1,26
3	9	PUFAs	0,49	0,63	0,50	0,84
3	21	PUFAs	0,53	0,69	0,51	0,86
3	12	SM + PUFAs	0,41	0,63	0,60	1,01
3	22	SM + PUFAs	0,60	0,59	0,39	0,65

Kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; PUFAs + SM – skupina s kombinovanou dietou.

Tabulka 8: Stanovení aritmetického průměru u jednotlivých skupin, porovnání mezi skupinami, výpočet směrodatné odchylky (SD) a standardní chyby (SE) u vzorků ABCG5 proteinu.

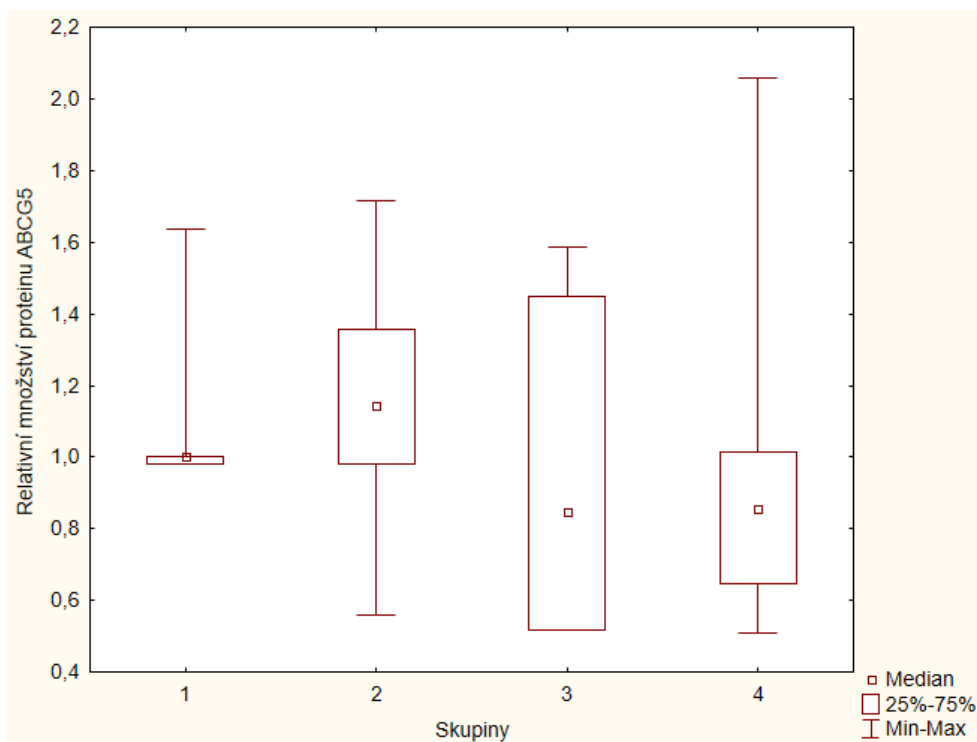
	Průměr [r.j.]	Porovnání mezi skupinami [%]	SD [r.j.]	SD [%]	SE [r.j.]	SE [%]
kontrola	1,10	100	0,26	24	0,11	10
SM	1,15	105	0,39	36	0,16	15
PUFAs	0,96	87	0,46	42	0,19	17
SM + PUFAs	0,99	90	0,56	51	0,23	21

kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; SM + PUFAs – skupina s kombinovanou dietou; SD – směrodatná odchylka; SE – standardní chyba.



Obrázek 8: Relativní množství ABCG5 proteinu u jednotlivých skupin.

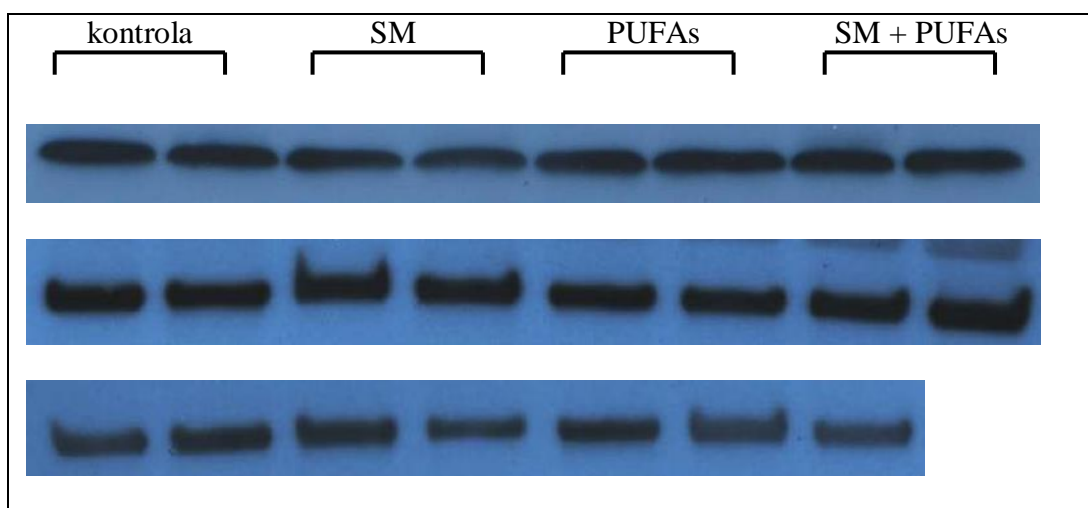
Kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega 3 polynenasycenými mastnými kyselinami; SM + PUFAs – skupina s kombinovanou dietou.



Obrázek 9: Krabicový graf. Grafické znázornění analýzy rozptylu dle Kruskal-Wallisova testu u ABCG5 proteinu.

1 – kontrolní skupina; 2 – skupina s mikronizovaným silymarinem; 3 – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; 4 – skupina s kombinovanou dietou.

- **Stanovení exprese ABCG8 proteinu u jednotlivých vzorků a porovnání mezi skupinami**



Obrázek 10: Reprezentativní Western blot proužky ABCG8 (70 kDa).

Kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; PUFAs + SM – skupina s kombinovanou dietou.

Tabulka 9: Stanovení intenzity proužků u jednotlivých vzorků pro ABCG8 protein a kontrolní β -Tubulin, normalizace dat pro ABCG8 protein a porovnání mezi skupinami.

membrána	potkan	skupina	β -Tubulin	ABCG8	normalizace hustoty (ABCG8)	Porovnání mezi skupinami (r.j.)
1	22	SM + PUFAs	0,87	0,71	0,71	0,29
1	10	SM + PUFAs	0,54	0,72	1,17	0,47
1	19	PUFAs	1,01	0,82	0,71	0,28
1	7	PUFAs	0,97	0,79	0,72	0,29
1	16	SM	0,39	0,67	1,48	0,60
1	4	SM	0,87	0,72	0,72	0,29
1	13	kontrola	0,47	0,86	1,58	0,63
1	1	kontrola	0,35	0,99	2,49	1,00
2	2	kontrola	0,47	1,09	1,09	1,00
2	14	kontrola	0,31	1,17	1,79	1,65
2	5	SM	0,42	1,09	1,23	1,13
2	17	SM	0,39	1,13	1,36	1,25
2	8	PUFAs	0,40	1,08	1,28	1,18
2	20	PUFAs	0,30	1,13	1,75	1,61
2	11	SM + PUFAs	0,25	1,24	2,32	2,13
2	23	SM + PUFAs	0,70	1,47	0,98	0,90

Tabulka 9: Stanovení intenzity proužků u jednotlivých vzorků pro ABCG8 protein a kontrolní β -Tubulin, normalizace dat pro ABCG8 protein a porovnání mezi skupinami.

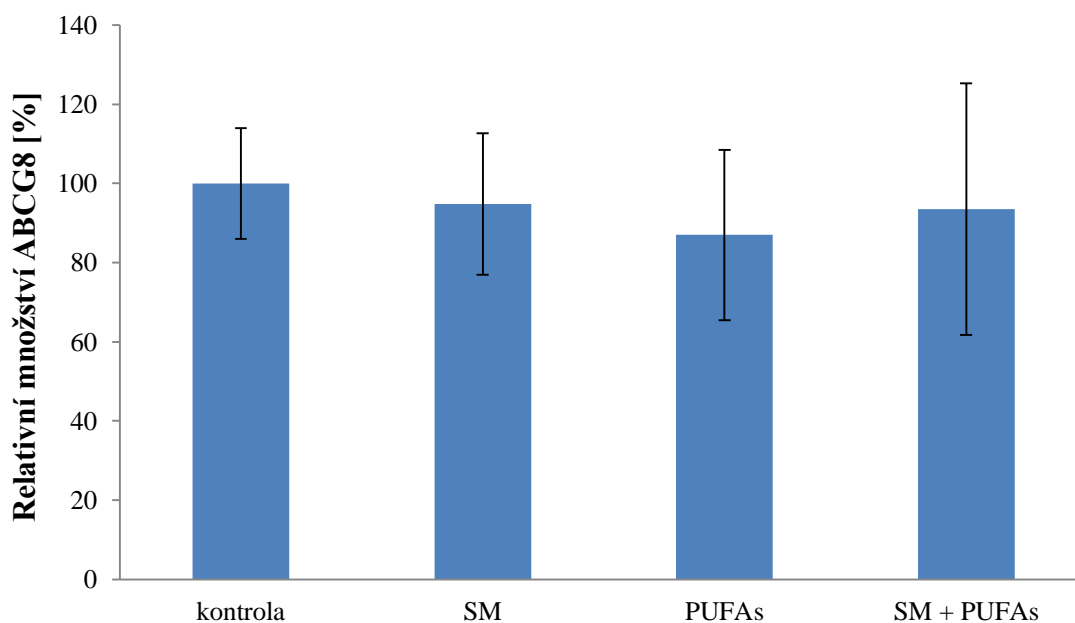
membrána	potkan	skupina	β-Tubulin	ABCG8	normalizace hustoty (ABCG8)	Porovnání mezi skupinami (r.j.)
3	3	kontrola	0,39	1,06	1,06	1,00
3	15	kontrola	0,50	1,07	0,83	0,78
3	6	SM	0,48	1,28	1,04	0,98
3	18	SM	0,32	1,31	1,59	1,50
3	9	PUFAs	0,49	1,54	1,23	1,16
3	21	PUFAs	0,53	1,09	0,81	0,76
3	12	SM + PUFAs	0,41	1,04	0,99	0,94

Kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; PUFAs + SM – skupina s kombinovanou dietou.

Tabulka 10: Stanovení aritmetického průměru u jednotlivých skupin, porovnání mezi skupinami, výpočet směrodatné odchylky (SD) a standardní chyby (SE) u vzorků ABCG8 proteinu.

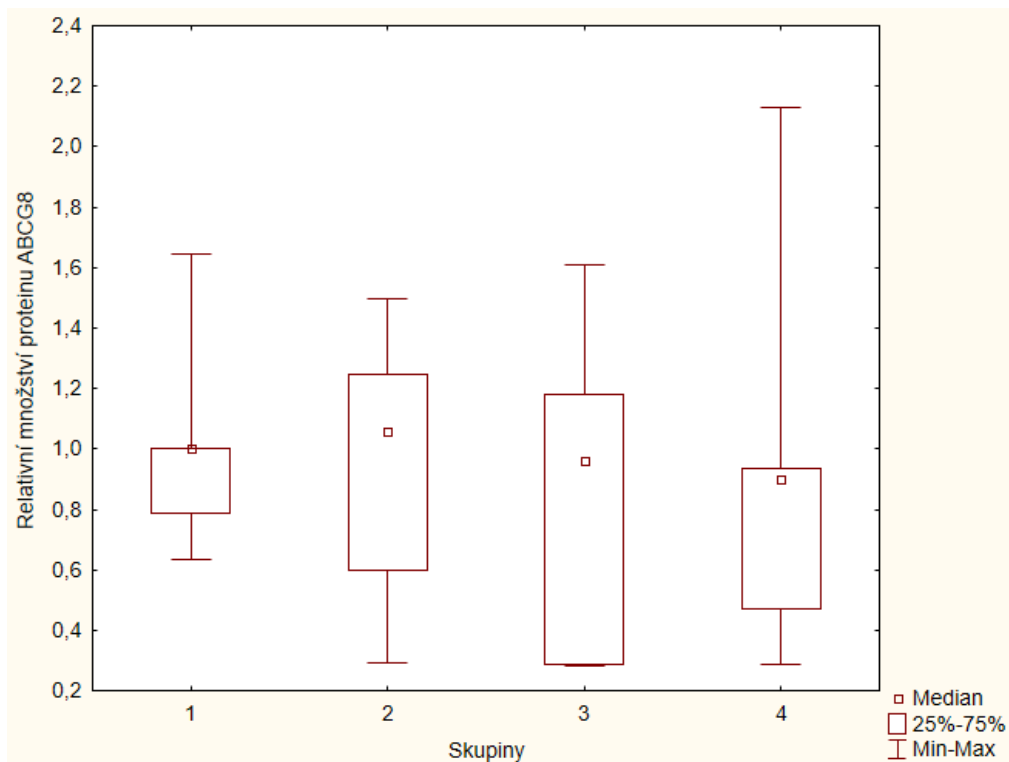
	Průměr [r.j.]	Porovnání mezi skupinami [%]	SD [r.j.]	SD [%]	SE [r.j.]	SE [%]
kontrola	1,01	100	0,35	34	0,14	14
SM	0,96	95	0,44	44	0,18	18
PUFAs	0,88	87	0,53	53	0,22	21
SM + PUFAs	0,95	93	0,72	71	0,32	32

kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; SM + PUFAs – skupina s kombinovanou dietou; SD – směrodatná odchylka; SE – standardní chyba.



Obrázek 11: Relativní množství ABCG8 proteinu u jednotlivých skupin.

Kontrola – kontrolní skupina; SM – skupina s mikronizovaným silymarinem; PUFAs – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; SM + PUFAs – skupina s kombinovanou dietou.



Obrázek 12: Krabicový graf. Grafické znázornění analýzy rozpylu dle Kruskal-Wallisova testu u ABCG8 proteinu.

1 – kontrolní skupina; 2 – skupina s mikronizovaným silymarinem; 3 – skupina s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami; 4 – skupina s kombinovanou dietou.

6 DISKUZE

V této bakalářské práci jsem stanovoval expresi transportérů ABCG5 a ABCG8 na úrovni proteinů u HHTg potkanů za účelem zjistit, zda vybrané přírodní látky obsažené v dietě mohou ovlivnit expresi těchto studovaných transportérů. Potkanům HHTg byl podáván SM nebo PUFAs nebo směs obou. Jako kontrola byla skupina HHTg potkanů, kterým byla podávána STD bez obsahu vybraných přírodních látek.

Vecera *et al.*, (2011) studovali, zda strava s vysokým obsahem cholesterolu nebo vysokocholesterolová dieta s obsahem 1% nebo 3% silymarinu má vliv na expresi potkaních jaterních genů *Abcg5* a *Abcg8* na úrovni mRNA. Vysokocholesterolová strava doplněná o 1% nebo 3% silymarin výrazně zvýšila hladinu mRNA *Abcg5* i *Abcg8* ve srovnání se stravou obohacenou o samotný cholesterol. Poruba *et al.*, (2015b) studovali účinky tří forem silybinu (tedy hlavní složky silymarinu) na hladinu HDL cholesterolu v krevním séru u potkanů. Byly porovnávány účinky standardizovaného silybinu, mikronizovaného silybinu a silybinu ve formě fytosomů. Porovnáním všech forem, účinek mikronizovaného silybinu způsobil u potkanů zvýšenou koncentraci HDL cholesterolu v krevním séru. Poruba *et al.*, (2015a) studovali efekty taktéž tří forem silymarinu (standardizovaného, mikronizovaného, fytosomy) na expresi proteinů ABCG5 a ABCG8 v játrech u HHTg potkanů. Zjistili, že zvýšená exprese proteinů ABCG5 a ABCG8 byla stanovena u potkanů, kteří byli stravováni SM nebo silymarinem ve formě fytosomů. Důvodem je lepší biologická dostupnost těchto forem (Poruba *et al.*, 2015a). Proto byl v této práci použit mikronizovaný silymarin.

Dřívější studie (data nepublikována) ukázala, že PUFAs v kombinaci se silymarinem způsobuje statisticky významné zvýšení v expresi ABCG5 i ABCG8, a to o 78 % ($p < 0.05$) v případě ABCG5 a o 232 % ($p < 0.001$) v případě ABCG8. Samotné PUFAs ovlivnily jen expresi proteinu ABCG8, a to zvýšením exprese o 151 % ($p < 0.01$). Tato studie byla provedena na HHTg potkanech a experimentální skupiny byly porovnány s kontrolní skupinou potkanů, kteří nebyly na dietě s vybranými přírodními látkami.

Cílem této práce bylo potvrdit, zda SM, PUFAs a jejich kombinace ovlivňují expresi i střevních transportérů ABCG5/8 na úrovni proteinu u potkaního modelu metabolického syndromu. Výsledky v této práci ukazují na mírné změny v expresi střevních proteinů ABCG5 a ABCG8 u potkanů v experimentálních skupinách, nicméně

tyto změny nejsou statisticky signifikantní. Výsledky tedy nepotvrdily efekt v játrech potkanů. Důvodů může být několik, např. mohou zde hrát velkou roli různé typy střevních bakterií, které přírodní látky mohou metabolizovat a vzniklé metabolity již nemusí mít tentýž efekt jako původní látka. Nebo naopak v játrech vznikají metabolity ze SM nebo PUFAs, které mají právě vliv na expresi proteinů ABCG5/8. Vysvětlení rozdílných účinků vybraných přírodních látek na expresi ABCG5/8 v játrech a ve střevech není jednoduché, proto je zapotřebí provést další experimenty, které jsou v budoucnu v plánu.

7 ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo potvrdit, zda vybrané přírodní látky mají vliv na expresi transportérů ABCG5/8 ve střevní tkáni HHTg potkanů, jak již bylo pozorováno v jaterní tkáni u stejných potkanů. Bylo zjištěno, že největší změna exprese ABCG5/8 probíhala u potkanů, kteří byli na dietě obohacené o SM. Nicméně výsledky nejsou statisticky významné. Exprese střevních ABCG5/8 na úrovni proteinů se mezi skupinami zásadně neliší, a tudíž SM a PUFAs nemají vliv na expresi sledovaných proteinů ve střevní tkáni HHTg potkanů.

V budoucnu by se dle mého názoru měla věda orientovat na výzkum exprese těchto proteinů i v dalších částech těla, neboť většině lidí stoupá hladina cholesterolu v celém organismu v důsledku jejich špatné životosprávy. Zvýšená regulace transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 může hrát klíčovou roli ve snížení hladiny cholesterolu a tím přispět k uzdravení organismu trpící např. kardiovaskulárním onemocněním.

8 LITERATURA

- Barter, P. J., Puranik, R., Rye, K. A. (2007). New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease. *Current cardiology reports*, 9(6), 493.
- Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., Hobbs, H. H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, 290(5497), 1771-1775.
- Bonde, Y., Plösch, T., Kuipers, F., Angelin, B., Rudling, M. (2012). Stimulation of murine biliary cholesterol secretion by thyroid hormone is dependent on a functional ABCG5/G8 complex. *Hepatology*, 56(5), 1828-1837.
- Borst, P., Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 537-592.
- Brisset, A. C., Isakson, B. E., Kwak, B. R. (2009). Connexins in vascular physiology and pathology. *Antioxidants & redox signaling*, 11(2), 267-282.
- Brown, A., Reynolds, L. R., Bruemmer, D. (2010). Intensive glycemic control and cardiovascular disease: an update. *Nature Reviews Cardiology*, 7(7), 369.
- Brown, J. M., Yu, L. (2009). Opposing gatekeepers of apical sterol transport: Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8). *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)*, 9(1), 18-29.
- Brown, J. M., Yu, L. (2010). Protein mediators of sterol transport across intestinal brush border membrane. In *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*: (pp. 337-380). Springer, Dordrecht.
- de Souza, M. O., e Silva, L. S., de Brito Magalhães, C. L., de Figueiredo, B. B., Costa, D. C., Silva, M. E., Pedrosa, M. L. (2012). The hypocholesterolemic activity of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutrition research*, 32(12), 976-984.

- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 42(7), 1007-1017.
- Devynck, M. A., Zicha, J., Kunes, J. (1998). Cell membrane function, hypertriglyceridemia and hypertension. *EXPERIMENTAL AND CLINICAL CARDIOLOGY*, 3, 162-170.
- Dijkers, A., Tietge, U. J. (2010). Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(47), 5936.
- Dlugosova, K., Weismann, P., Bernatova, I., Sotnikova, R., Slezak, J., Okruhlicova, L. (2009). Omega-3 fatty acids and atorvastatin affect connexin 43 expression in the aorta of hereditary hypertriglyceridemic rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 87(12), 1074-1082.
- Elferink, R. O., Groen, A. K. (2002). Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1586(2), 129-145.
- Enjalbert, F., Rapior, S., Nouguiet-Soule, J., Guillon, S., Amouroux, N., Cabot, C. (2002). Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 40(6), 715-757.
- Federspil, G., Nisoli, E., Vettor, R. (2006). A critical reflection on the definition of metabolic syndrome. *Pharmacological research*, 53(6), 449-456.
- Figuroa, X. F., Duling, B. R. (2009). Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxidants & redox signaling*, 11(2), 251-266.
- Frimmel, K., Sotnikova, R., Navarova, J., Bernatova, I., Krizak, J., Haviarova, Z., Kura, B., Slezak, J., Okruhlicová, L. (2016). Omega-3 Fatty Acids Reduce Lipopolysaccharide-Induced Abnormalities in Expression of Connexin-40 in Aorta of Hereditary Hypertriglyceridemic Rats. *Physiological research*, 65, S65.
- Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B., Dawber, T. R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *The American journal of medicine*, 62(5), 707-714.
- Graf, G. A., Yu, L., Li, W. P., Gerard, R., Tuma, P. L., Cohen, J. C., Hobbs, H. H. (2003). ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48275-48282.

- Grundy, S. M., Hansen, B., Smith, S. C., Cleeman, J. I., Kahn, R. A. (2004). Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation*, *109*(4), 551-556.
- Habtemariam, S., Varghese, G. K. (2014). The antidiabetic therapeutic potential of dietary polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *15*(4), 391-400.
- Innes, J. K., Calder, P. C. (2018). The Differential Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Cardiometabolic Risk Factors: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, *19*(2), 532.
- Khovidhunkit, W., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C., Feingold, K. R. (2003). Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages differential role of LXR. *Journal of lipid research*, *44*(9), 1728-1736.
- Kim, B., Park, Y., Wegner, C. J., Bolling, B. W., Lee, J. (2013). Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in Caco-2 cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, *24*(9), 1564-1570.
- Kim, E. H., Bae, J. S., Hahm, K. B., Cha, J. Y. (2012). Endogenously synthesized n-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Biochemical pharmacology*, *84*(10), 1359-1365.
- Klimes, I., Vrana, A., Kunes, J., Sebökova, E., Dobešova, Z., Štolba, P., & Zicha, J. (1995). Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Pressure*, *4*(3), 137-142.
- Klimes, I., Weston, K., Kovacs, P., Gasperikova, D., Jezova, D., Kvetnansky, R., Thompson J. R., Sebokova, E., Samani, N. J. (2003). Mapping of genetic loci predisposing to hypertriglyceridaemia in the hereditary hypertriglyceridaemic rat: analysis of genetic association with related traits of the insulin resistance syndrome. *Diabetologia*, *46*(3), 352-358.
- Kunes, J., Dobešova, Z., Zicha, J. (1995). High blood pressure of hypertriglyceridaemic rats is related to metabolic disturbances. *Physiol Res*, *44*, 421-424.

- Kunes, J., Talib, H. K. B., Dobesova, Z., Vrana, A., Zicha, J. (1994). Erythrocyte ion transport alterations in hypertriglyceridaemic rats. *Clinical Science*, 86(1), 11-13.
- Kurien, B. T., Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293.
- Kwak, B. R., Mulhaupt, F., Veillard, N., Gros, D. B., Mach, F. (2002). Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(2), 225-230.
- Liu, S., Tetzlaff, M. T., Cui, R., Xu, X. (2012). miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1. *The American journal of pathology*, 181(5), 1823-1835.
- Lodowska, J., Wolny, D., Węglarz, L. (2013). The sugar 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) as a characteristic component of bacterial endotoxin-a review of its biosynthesis, function, and placement in the lipopolysaccharide core. *Canadian journal of microbiology*, 59(10), 645-655.
- Mahmood, T., Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429.
- Miettinen, T. A. (1980). Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *European journal of clinical investigation*, 10(S1), 27-35.
- Morazzoni, P., Montalbetti, A., Malandrino, S. (1992). Comparative biliary excretion of silybin after single oral doses of sililipide and silymarin in rats. First Intl. In *Symposium on Natural Drugs and the Digestive Tract, Naples, Italy*. Seattle, WA: Indena USA Inc.
- Morazzoni, P., Montalbetti, A., Malandrino, S., Pifferi, G. (1993). Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 18(3), 289-297.
- Perkins, G. A., Goodenough, D. A., Sosinsky, G. E. (1998). Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30° rotation for interdigitating two apposing connexons1. *Journal of molecular biology*, 277(2), 171-177.
- Pernollet, M. G., Kunes, J., Zicha, J., Devynck, M. A. (2001). Cyclic nucleotides in platelets of genetically hypertriglyceridemic and hypertensive rats: thrombin and nitric oxide responses are unrelated to plasma triglyceride levels. *Thrombosis research*, 104(1), 29-37.

- Pirillo, A., Catapano, A. L. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of atherogenic dyslipidemia. *Atherosclerosis Supplements*, 14(2), 237-242.
- Portincasa, P., Moschetta, A., Palasciano, G. (2006). Cholesterol gallstone disease. *The Lancet*, 368(9531), 230-239.
- Poruba, M., Kazdová, L., Oliyarnyk, O., Malinska, H., Matuskova, Z., Tozzi di Angelo, I., Vecera, R. (2015a). Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. *Xenobiotica*, 45(9), 751-756.
- Poruba, M., Matuskova, Z., Kazdova, L., Oliyarnyk, O., Malinska, H., di Angelo, I. T., Vecera, R. (2015b). Positive effects of different drug forms of silybin in the treatment of metabolic syndrome. *Physiological research*, 64, S507.
- Rainwater, D. L., Almasy, L., Blangero, J., Cole, S. A., VandeBerg, J. L., MacCluer, J. W., Hixson, J. E. (1999). A genome search identifies major quantitative trait loci on human chromosomes 3 and 4 that influence cholesterol concentrations in small LDL particles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(3), 777-783.
- Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.
- Repa, J. J., Berge, K. E., Pomajzl, C., Richardson, J. A., Hobbs, H., Mangelsdorf, D. J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors α and β . *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18793-18800.
- Robichon, C., Dugail, I. (2007). De novo cholesterol synthesis at the crossroads of adaptive response to extracellular stress through SREBP. *Biochimie*, 89(2), 260-264.
- Ruderman, N., Chisholm, D., Pi-Sunyer, X., Schneider, S. (1998). The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*, 47(5), 699-713.
- Salen, G., Shefer, S., Nguyen, L., Ness, G. C., Tint, G. S., Shore, V. (1992). Sitosterolemia. *Journal of Lipid Research*, 33(7), 945-955.
- Sarafidis, P. A., Nilsson, P. M. (2006). The metabolic syndrome: a glance at its history. *Journal of hypertension*, 24(4), 621-626.
- Seboekova, E., Klimes, I., Hermann, M., Hromadova, M., Bohov, P., Mitkova, A., Hüttinger, M. (1992). Fish oil modifies lipid composition and liver LDL receptor activity in hypertriglyceridemic rats. *Diabetes, nutrition & metabolism*, 5(4), 249-257.

- Skottova, N., Vecera, R., Urbanek, K., Vana, P., Walterova, D., Cvak, L. (2003). Effects of polyphenolic fraction of silymarin on lipoprotein profile in rats fed cholesterol-rich diets. *Pharmacological research*, 47(1), 17-26.
- Sobolova, L., Skottova, N., Vecera, R., Urbanek, K. (2006). Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharmacological research*, 53(2), 104-112.
- Stolba, P., Dobesova, Z., Husek, P., Opltova, H., Zicha, J., Vrana, A., Kunes, J. (1992). The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes. *Life sciences*, 51(10), 733-740.
- Stolba, P., Dobesová, Z., Husek, P., Opltova, H., Zicha, J., Vrana, A., Kuneš, J. (1992). The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes. *Life sciences*, 51(10), 733-740.
- Sumi, K., Tanaka, T., Uchida, A., Magoori, K., Urashima, Y., Ohashi, R., Ohguchi, H., Okamura, M., Kudo, H., Daigo, K., Maejima, T., Kojima, N., Sakakibara, I., Jiang, S., Hasegawa, G., Kim, I., Osborne, T. F., Naito, M., Gonzalez, F. J., Hamakubo, T., Kodarma, T., Sakai, J. (2007). Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4 α and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8. *Molecular and cellular biology*, 27(12), 4248-4260.
- Skottova, N., Kazdova, L., Oliyarnyk, O., Vecera, R., Sobolova, L., Ulrichova, J. (2004). Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacological research*, 50(2), 123-130.
- Takahashi, Y. (2011). Soy protein and fish oil independently decrease serum lipid concentrations but interactively reduce hepatic enzymatic activity and gene expression involved in fatty acid synthesis in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 57(1), 56-64.
- Török, J., Babal, P., Matuskova, J., Luptak, I., Klimes, I., Simko, F. (2002). Impaired endothelial function of thoracic aorta in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967(1), 469-475.

- Ueno, T., Tremblay, J., Kunes, J., Zicha, J., Dobesova, Z., Pausova, Z., Deng, A. Y., Sun, Y-L., Jacob, H. J., Hamet, P. (2003). Resolving the composite trait of hypertension into its pharmacogenetic determinants by acute pharmacological modulation of blood pressure regulatory systems. *Journal of molecular medicine*, 81(1), 51-60.
- Valenzuela, A., Garrido, A. (1994). Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological Research*, 27, 105-105.
- van der Veen, J. N., Havinga, R., Bloks, V. W., Groen, A. K., Kuipers, F. (2007). Cholesterol feeding strongly reduces hepatic VLDL-triglyceride production in mice lacking the liver X receptor α . *Journal of lipid research*, 48(2), 337-347.
- van Kempen, M. J., Jongsma, H. J. (1999). Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochemistry and cell biology*, 112(6), 479-486.
- Vecera, R., Zacharova, A., Orolin, J., Skottova, N., Anzenbacher, P. (2011). The effect of silymarin on expression of selected ABC transporters in the rat. *Vet Med*, 56(2), 59-62.
- Vincent, M., Sacquet, J., Sassard, J. (1984). *Thy Lyon strains of hypertensive, normotensive and low-blood-pressure rats. Handbook of Hypertension. Vol. 4: Experimental and Genetic Model sof Hypertension*, pp 314-327
- Vrana, A., Kazdova, L. (1990). The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. In *Transplantation proceedings*(Vol. 22, No. 6).
- Vrana, A., Kazdova, L., Dobešová, Z., Kuneš, J., Křen, V., Bila, V., Stolba, P., Klimeš, I. (1993). Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 683(1), 57-68.
- Wang, J., Mitsche, M. A., Luetjohann, D., Cohen, J. C., Xie, X. S., Hobbs, H. H. (2015). Relative roles of ABCG5/ABCG8 in liver and intestine. *Journal of lipid research*, 56(2), 319-330.
- Wellington, C. L. (2004). Cholesterol at the crossroads: Alzheimer's disease and lipid metabolism. *Clinical genetics*, 66(1), 1-16.

- Wellington, K., Jarvis, B. (2001). Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*, 15(7), 465-489.
- Yamazaki, Y., Hashizume, T., Morioka, H., Sadamitsu, S., Ikari, A., Miwa, M., Sugatani, J. (2011). Diet-induced lipid accumulation in liver enhances ATP-binding cassette transporter g5/g8 expression in bile canaliculi. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 26(5), 442-450.
- Yu, L., Hammer, R. E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J. C., Hobbs, H. H. (2002a). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16237-16242.
- Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R. E., Berge, K. E., Horton, J. D., Cohen, J. C., Hobbs, H. H. (2002b). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *The Journal of clinical investigation*, 110(5), 671-680.
- Yu, L., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Hobbs, H. H., Cohen, J. C. (2004). Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *Journal of lipid research*, 45(2), 301-307.
- Yu, X. H., Qian, K., Jiang, N., Zheng, X. L., Cayabyab, F. S., Tang, C. K. (2014). ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 428, 82-88.
- Zhang, Y., Mangelsdorf, D. J. (2002). Luxuries of lipid homeostasis: the unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing. *Molecular interventions*, 2(2), 78.
- Zicha, J., Dobesova, Z., Kunes, J. (1995). Plasma triglycerides cosegregate with erythrocyte sodium content in F2 rats of HTG x Lewis cross. *Physiological research*, 44, 425-428.
- Zicha, J., Dobesová, Z., Kunes, J. (1997). Plasma triglycerides and red cell ion transport alterations in genetically hypertensive rats. *Hypertension*, 30(3), 636-640.
- Zicha, J., Pechanova, O., Cacanyiova, S., Cebova, M., Kristek, F., Török, J., Simko, F., Dobesova, Z., Kubes, J. (2006). Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome?. *Physiological research*, 55, S49.