

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2020

Bc. Dominika Dohnalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv atorvastatinu a silymarinu na expresi mRNA genů řídící
homeostázu cholesterolu u potkaních modelů metabolického
syndromu**

Diplomová práce

Bc. Dominika Dohnalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Dominika DOHNALOVÁ
Osobní číslo: R18938
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Název tématu: Vliv atorvastatinu a silymarinu na expresi mRNA genů řídicí homeostázu cholesterolu u potkaních modelů metabolického syndromu
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem práce je seznámit se s biologickým materiálem a jeho zpracováním za účelem stanovení exprese mRNA genů řídicí homeostázu cholesterolu v organismu. V rámci teoretické části práce bude vypracována rešerše zaměřená na vlastnosti receptorů, enzymů a transportních proteinů řídicí homeostázu cholesterolu v organismu a možnosti jejich ovlivnění. V rámci praktické části bude stanovena exprese mRNA vybraných genů v tkáních HHTg a SHR-CRP potkanů pomocí real-time PCR. Výsledky budou porovnány mezi jednotlivými skupinami potkanů, lišícími se podávanou stravou, a statisticky vyhodnoceny.

- 1) Vypracujte stručný přehled problematiky receptorů, enzymů a transportních proteinů řídicí homeostázu cholesterolu v organismu, vliv na lidský organismus a možnosti jejich ovlivnění.
- 2) Důkladně se seznamte s metodou real-time PCR.
- 3) Stanovte expresi mRNA vybraných genů v tkáních HHTg a SHR-CRP potkanů.
- 4) Vyhodnoťte naměřené výsledky a diskutujte je s využitím literatury.
- 5) Sepište diplomovou práci

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- [1] Večeřa R, Zachařová A., Orolin J., Škottová N., Anzenbacher P. The effect of silymarin on expression of selected ABC transporters in the rat. Veterinární medicína 2011, 56(2): 59-62. [2] Poruba M, Matušková Z, Kazdová L, Oliyarnyk O, Malínská H, Tozzi di Angelo I, Večeřa R. Positive effects of different drug forms of silybin in the treatment of metabolic syndrome. Physiol. Res. 2015, 64(Suppl. 4): S507-S512. [3] Poruba M., Kazdová L., Oliyarnyk O., et al. Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. Xenobiotica 2015, 45(9):751-756. [4] 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): 1-16. [5] Češka R, Urbánek K. Atorvastatinum. Remedia 2004, 14: 110-120.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.

Ústav farmakologie

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2018

Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2020

doc. RNDr. Martin Kubała, Ph.D.
děkan

L.S.

UNIVERSITÄT PALACKÝHO V OLOMOUCI
Fakulta lékařská
Katedra farmakologie a toxikologie
Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 27. března 2017

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Bc. Dominika Dohnalová

Název práce: Vliv atorvastatinu a silymarinu na expresi mRNA genů řídící homeostázu cholesterolu u potkaních modelů metabolického syndromu

Typ práce: magisterská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: atorvastatin, silymarin, metabolický syndrom, cholesterol, SREBP, potkan, real-time PCR

Počet stran: xi s., 52 s

Počet příloh: 0

Jazyk: CZ

SOUHRN

V teoretické části byl vypracován přehled se zaměřením na cholesterol, jeho metabolismus a regulaci. Homeostáza cholesterolu je udržována jeho biosyntézou, vstřebáváním z potravy a vylučováním do žluče, které jsou zprostředkovávány transportéry, enzymy a proteiny. Porušení homeostázy cholesterolu může vést k dyslipidemii, což je rizikový faktor pro vývoj metabolického syndromu. Poslední teoretická část se soustředí na základní principy metody real-time PCR.

Experimentální část se věnuje stanovení exprese mRNA genů ovlivňující homeostázu cholesterolu ve střevní tkáni potkanů. Studie byla provedena na potkaních modelech metabolického syndromu – hereditárně hypertriglyceridemickém potkanovi a spontánně hypertenzním potkanovi s transgenně exprimovaným genem C-reaktivního proteinu. Těmto potkanům byla podávána strava obohacená o přírodní extrakt silymarin, který pozitivně ovlivňuje plazmatickou koncentraci triglyceridů a celkového cholesterolu, a léčivo atorvastatin, který je kompetitivním inhibitorem 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktasy, což je klíčový enzym pro syntézu cholesterolu.

Výsledky potvrzují mechanismus působení použitých látek. Atorvastatin sice inhibuje protein HMGCR, ovšem tato inhibice neměla výrazný vliv na expresi jeho genu. Naopak silymarin výrazně inhiboval gen Hmgcr u hereditárně hypertriglyceridemických potkanů zřejmě přes inhibici translokace SREBP. Kombinovaná dieta obsahující atorvastatin i silymarin zvýšila expresi Ldlr, který kóduje receptor LDL zajišťující snížení plazmatické koncentrace částic LDL, IDL a VLDL.

Současné podávání atorvastatinu a silymarinu se jeví jako vhodná kombinace při léčbě dyslipidémie, což je jeden z faktorů rozvoje metabolického syndromu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Dominika Dohnalová

Title: Effect of atorvastatin and silymarin on the mRNA expression of genes controlling cholesterol homeostasis in rat models of metabolic syndrome

Type of thesis: master

Department: Department of cell biology and genetics, Faculty of Science UP Olomouc

Supervisor: Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Keywords: atorvastatin, silymarin, metabolic syndrome, cholesterol, SREBP, rats, real-time PCR

Number of pages: xi p., 52 p.

Number of appendices: 0

Language: CZ

SUMMARY

The theoretical part is focused on cholesterol, its metabolism and regulation. Cholesterol homeostasis is maintained by its biosynthesis, absorption from food and its excretion into bile. These processes are mediated by transporters, enzymes and other proteins. Disruption of cholesterol homeostasis can lead to dyslipidemia that is a risk factor for development of metabolic syndrome. The last theoretical part summarises basic principles of real-time PCR method.

Experimental part is focused on the determination of mRNA expression of genes regulating homeostasis of cholesterol in the intestinal tissue of rats. Study was carried out on experimental rat models of metabolic syndrome – hereditary hypertriglyceridemic rat and spontaneously hypertensive rat with transgenically expressed human C-reactive protein gene. These rats were fed on a diet supplemented with natural extract silymarin which has a positive effect on plasma concentration of triglycerides and total cholesterol, and with drug atorvastatin that is a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase – a key enzyme in cholesterol synthesis.

Results confirm the mechanism of action of compounds used in this study. Although atorvastatin inhibits HMGCR protein, this inhibition did not affect Hmgcr gene expression. On the contrary, silymarin strongly inhibited Hmgcr gene in hereditary hypertriglyceridemic rats probably through inhibition of SREBP translocation. Combined diet containing atorvastatin and silymarin increased an expression of Ldlr that codes LDL receptor and provides a reduction in the plasma concentration of LDL, IDL, and VLDL particles.

The application of atorvastatin and silymarin together appears to be a suitable combination in the treatment of dyslipidemia as one of factors for development of metabolic syndrome.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci sepsala samostatně pod vedením Mgr. Zuzany Rácové, Ph.D., s použitím zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí své diplomové práce Mgr. Zuzaně Rácové, Ph.D., za ochotu, se kterou mi pomáhala při tvorbě této práce, její odborné konzultace a čas, který mi věnovala. Dále bych poděkovala Mgr. Ivetě Zapletalové za její čas a rady při práci v laboratoři a také PharmDr. Martinu Porubovi, Ph.D. za pomoc při zpracování experimentálních výsledků. Taktéž poděkování patří panu Ing. Michalu Pravencovi, CSc. z Fyziologického ústavu AV ČR za poskytnutí SHR-CRP potkanů a laboratořím v Centru experimentální medicíny IKEM za poskytnutí HHTg potkanů. Díky tomu mohl být experiment proveden a mohla jsem tak získat data do své diplomové práce. Jako poslední bych chtěla poděkovat Ústavu farmakologie LF Univerzity Palackého v Olomouci za možnost využití jejich laboratoří, a také grantům (IGA_LF_2020_009, 17-08888S) za finanční podporu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Cholesterol.....	3
3.1.1	Biosyntéza cholesterolu v organismu	4
3.1.2	Transport cholesterolu v organismu	5
3.1.3	Vylučování cholesterolu z organismu	6
3.1.4	Regulace homeostázy cholesterolu.....	6
3.1.4.1	SREBP transkripční faktory	7
3.1.4.2	ABC transportéry.....	10
3.1.4.2.1	ABCA1.....	11
3.1.4.2.2	ABCB1	12
3.1.4.2.3	ABCG5 a ABCG8.....	14
3.1.4.3	NPC1L1	14
3.2	Metabolický syndrom	16
3.2.1	Léčba metabolického syndromu	16
3.2.1.1	Atorvastatin	17
3.2.1.2	Silymarin	18
3.2.2	Zvířecí modely metabolického syndromu	18
3.2.2.1	HHTg potkan	19
3.2.2.2	SHR-CRP potkan.....	19
3.3	Metoda real-time PCR	20
4	MATERIÁL a METODY	23
4.1	Biologický materiál.....	23
4.2	Použité soupravy a chemikálie	23

4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	24
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	25
4.4.1	Izolace RNA	25
4.4.2	Reverzní transkripce	26
4.4.3	Real-time PCR	27
4.4.4	Vyhodnocení dat a statistická analýza	30
5	VÝSLEDKY	31
5.1	Izolace mRNA	31
5.2	Změny relativní exprese mRNA	34
5.2.1	Změny exprese mRNA u HHTg potkana	34
5.2.2	Změny exprese mRNA u SHR-CRP potkana.....	37
6	DISKUZE	39
7	ZÁVĚR	42
8	LITERATURA	43

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABC	ATP vázající protein (Adenosin triphosphate-binding cassette)
CCH	Celkový cholesterol
CRP	C-reaktivní protein
C_t	Hodnota C_t (treshold cycle)
ER	Endoplazmatické retikulum
GA	Golgiho aparát
HDL	Lipoproteiny s vysokou hustotou
HHTg	Hereditárně hypertriglyceridemický
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktasa
HMGCS	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A syntasa
HPRT	Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasa
LDL	Lipoproteiny s nízkou hustotou
LXR α	Jaterní X receptor α
NBD	Doména vázající nukleotid
NCP1L1	Niemann-Pick C1-like 1 protein
P-gp	P-glykoprotein
RT	Reverzní transkripce
SCAP	aktivační protein pro SREBP
SHR	Spontánně hypertenzní potkan
SREBP	Regulační protein (Sterol regulatory element binding protein)
STD	Standardní laboratorní dieta
TG	Triglyceridy
TMD	Transmembránová doména
VLDL	Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec cholesterolu.....	3
Obrázek 2: Homeostáza cholesterolu zprostředkovaná jeho endogenní syntézou a příjmem exogenního cholesterolu receptorem zprostředkovanou endocytózou.....	5
Obrázek 3: Struktura transkripčních faktorů SREBP.....	8
Obrázek 4: Vliv hladiny intracelulárního cholesterolu na proteolytickou aktivaci SREBP transkripčních faktorů.....	10
Obrázek 5: Mechanismus exkrece pomocí P-gp v tenkém střevě (A), v játrech (B) a v ledvinách (C).....	13
Obrázek 6: Transport cholesterolu transportéry NPC1L1 a ABCG5/8.....	15
Obrázek 7: Chemický strukturní vzorec atorvastatinu.....	17
Obrázek 8: Schéma hydrolyzační sondy TaqMan.....	21
Obrázek 9: Vliv diety na expresi střevních genů Abca1, Abcb1a, Abcb1b, Srebf-1 a Srebf-2 u potkana HHTg.....	35
Obrázek 10: Vliv diety na expresi střevních genů Hmgcr, Ldlr, Abcg5, Abcg8 a Npc111 u potkana HHTg.....	36
Obrázek 11: Vliv diety na expresi střevních genů Abca1, Abcb1a, Abcb1b, Srebf-1 a Srebf-2 u potkana SHR-CRP.....	37
Obrázek 12: Vliv diety na expresi střevních genů Hmgcr, Ldlr, Abcg5, Abcg8 a Npc111 u potkana SHR-CRP.....	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení směsi pro reverzní transkripci	26
Tabulka 2: Protokol inkubace syntézy cDNA	27
Tabulka 3: Výpočet objemu cDNA v jedné jamce 384jamkové desky pro vzorky izolované z tenkého střeva HHTg potkana	28
Tabulka 5: Výpočet objemu PCR směsi v jedné jamce 384jamkové desky pro vzorky izolované z tenkého střeva HHTg potkana	29
Tabulka 7: Podmínky real-time PCR	30
Tabulka 8: Koncentrace a míra čistoty izolované mRNA z tenkého střeva potkanů HHTg stanovené pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60	32
Tabulka 9: Koncentrace a míra čistoty izolované mRNA z tenkého střeva potkanů SHR-CRP stanovené pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60	33

1 ÚVOD

Homeostáza cholesterolu je v organismu udržována jeho endogenní syntézou, vstřebáváním z potravy a jeho vylučováním do žluče. Tyto děje jsou regulovány transportéry, transkripčními faktory, receptory, enzymy a dalšími proteiny (Andrade *et al.*, 2019). Pokud je tato rovnováha narušena, dochází k dyslipidemii. Dyslipidemie je jedním z rizikových faktorů metabolického syndromu, mezi něž patří i glukózová intolerance, viscerální obezita a hypertenze. Metabolický syndrom tak vede k vývoji kardiovaskulárních onemocnění a diabetu 2. typu (Galassi *et al.*, 2006). Jelikož neexistuje léčivo, které by ovlivnilo všechny tyto faktory najednou, léčba se zaměřuje na jednotlivé symptomy.

K léčbě vysoké koncentrace cholesterolu v krvi se využívají např. statiny, které kompetitivně inhibují 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktasu. Tento enzym je klíčový pro syntézu cholesterolu. Silymarin, extrakt ze semen ostropestřce mariánského, který je po staletí znám pro své hepatoprotektivní účinky, se taktéž může užít jako hypolipidemikum. Tento přírodní extrakt má v kombinaci s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami prokázaný vliv na expresi transportérů ABCG5/8, které eliminují cholesterol z organismu (Poruba *et al.*, 2019).

Pro studium metabolického syndromu jsou využívány experimentální zvířecí modely. Jedním z těchto modelů je hereditárně hypertriglyceridemický potkan, který má zvýšenou hladinu triglyceridů. Druhým modelem je spontánně hypertenzní potkan s exprimovaným transgenním lidským C-reaktivním proteinem.

Cílem této práce je zjistit, jak léčivo atorvastatin a přírodní extrakt silymarin nebo jejich kombinace ovlivňují expresi mRNA genů regulujících homeostázu cholesterolu v tenkém střevě u zmíněných zvířecích modelů metabolického syndromu a zda tato kombinovaná dieta může být vhodná v léčbě metabolického syndromu.

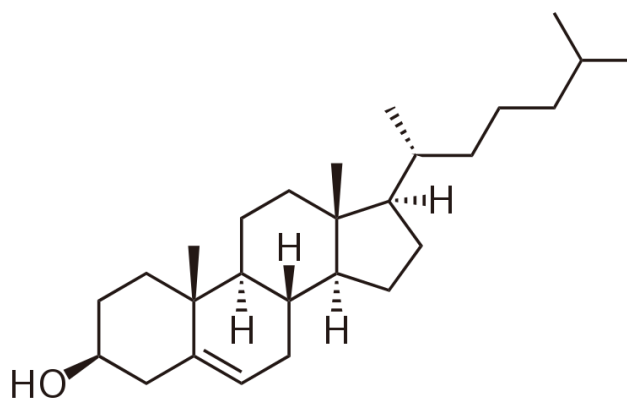
2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování přehledu problematiky receptorů, enzymů a transportních proteinů řídící homeostázu cholesterolu v organismu, jejich vlivu na lidský organizmus a možnosti jejich ovlivnění.
- Stanovení exprese mRNA vybraných genů ve střevních tkáních HHTg a SHR-CRP potkanů.
- Porovnání výsledků mezi jednotlivými skupinami potkanů, lišícími se podávanou stravou, statistické vyhodnocení a diskuze výsledků s literaturou.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Cholesterol

Cholesterol neboli cholest-5-en-3 β -ol je nejvýznamnějším živočišným isoprenoidem. Cholesterol je řazen mezi steroidy, jelikož je jeho uhlíkový skelet tvořen uhlovodíkem steranem (Obr. 1). Cholesterol a jeho metabolity jsou nezbytnou strukturální složkou buněčných membrán a mají zásadní roli pro embryonální vývoj, diferenciaci buněk a je prekurzorem biosyntézy steroidních hormonů, vitamínů a žlučových kyselin. V membránách snižuje jejich fluiditu, čímž jsou membrány méně propustné pro menší molekuly. V plazmě je cholesterol obsažen ve formě lipoproteinů, a to jak volný, tak ve formě esterů s vyššími mastnými kyselinami (Kodíček *et al.*, 2015).



Obrázek 1: Strukturální vzorec cholesterolu

Do organismu se cholesterol dostává zvenčí, kdy je vstřebáván ze zažívacího traktu – exogenní cholesterol, nebo je syntetizován *de novo* z acetylkoenzymu A – endogenní cholesterol. Estery cholesterolu a tuky jsou obecně v organismu transportovány v obalu lipoproteinových částic. Lipoproteiny jsou tvořeny tuky a bílkovinnou složkou, tzv. apolipoproteiny. Dle preparativní ultracentrifugace jsou rozlišovány lipoproteinové třídy:

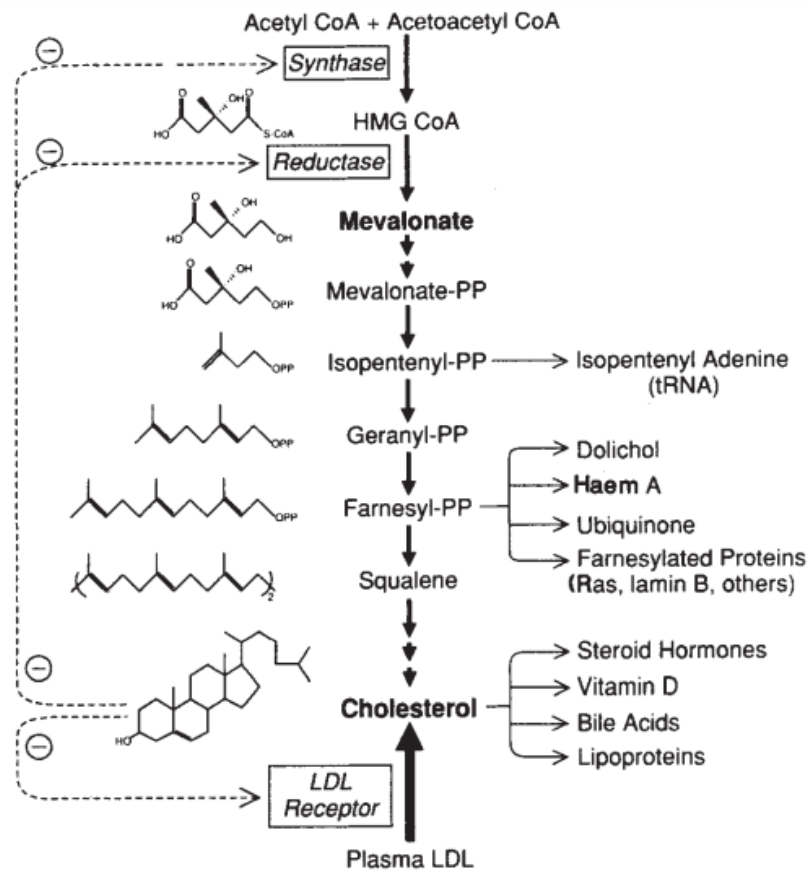
- CH – chylomikrony
- VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě
- LDL – lipoproteiny o nízké hustotě
- IDL – lipoproteiny o střední hustotě
- HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě

Příjem cholesterolu je pro lidské zdraví velmi důležitý, ale jeho nadbytek vede k patologickým změnám. Nekontrolované ukládání cholesterolu v buňkách může rozrušit buněčné membrány a vést k indukci apoptózy. Akumulace cholesterolu v krvi způsobuje hyperlipidemii a aterosklerotická kardiovaskulární onemocnění, která patří mezi nejčastější příčiny úmrtí na celém světě. Dle Světové zdravotnické organizace (WHO, ©2020) se odhaduje, že v roce 2016 zemřelo na kardiovaskulární onemocnění 17,9 milionů lidí, což je 31 % ze všech celosvětových úmrtí. I když je endogenního cholesterolu v organismu více než přijímaného exogenního, velký vliv má typ LDL částic, ve kterých se cholesterol nachází. Typ LDL částic může mít totiž zásadní význam v rozvoji aterosklerózy (Češka, 2012). Lipoproteinové částice se liší svou velikostí a hustotou. Rozlišujeme tři typy LDL částic: malé denzní částice (LDL-III), které jsou menší než 25 nm a mají hustotu $1,04\text{--}1,06\text{ kg}\cdot\text{l}^{-1}$, intermediární částice (LDL-II) o velikosti 25–26 nm a hustotě $1,03\text{--}1,04\text{ kg}\cdot\text{l}^{-1}$ a velké částice (LDL-I) s velikostí 26–27,5 nm a hustotě $1,02\text{--}1,03\text{ kg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Krauss *et* Burke, 1982; Griffin, 1997). Nejmenší částice mají nejvyšší aterogenní potenciál. Za rizikovou je považována i zvýšená koncentrace malých denzních HDL částic, které nemají obvyklé protektivní vlastnosti (Danyi, 2009). Malé denzní LDL částice mohou jednoduše proniknout mezi endotelové buňky a získat přístup k vnitřní stěně cév, kde mohou vést k tvorbě aterosklerotických plaků, zatímco částice o vyšší velikosti mezi endotelové buňky neproniknou (Anber *et al.*, 1996; Ivanova *et al.*, 2017).

3.1.1 Biosyntéza cholesterolu v organismu

Biosyntézy cholesterolu se účastní téměř všechny buňky. Hlavním orgánem syntézy jsou především játra. Biosyntéza cholesterolu začíná kondenzací dvou molekul acetylkoenzym A, z nichž vzniká acetoacetylkoenzym A. Acetoacetylkoenzym A je kondenzován s další molekulou acetylkoenzymu A a vzniká 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA). Tento krok je katalyzován 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A syntasou (HMGCS). 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A je redukován 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktasou (HMGCR) na mevalonát. Tento enzym je pro syntézu klíčový. Tato dráha je označována jako mevalonátová, schematicky zobrazeno na Obrázku 2. Mezi produkty mevalonátové dráhy patří především isoprenoidy, mezi které lze zařadit steroly, hem A nebo ubiquinon. Mevalonát je poté přeměněn na izopentenylidifosfát. Další fází syntézy cholesterolu je syntéza skvalenu a jako poslední dochází k cyklizaci skvalenu

a odštěpení tří methylových skupin. Takto vzniklý cholesterol může být dále metabolizován na steroidní hormony, vitamín D či žlučové kyseliny (Goldstein *et* Brown, 1990).



Obrázek 2: Homeostáza cholesterolu zprostředkovaná jeho endogenní syntézou a příjmem exogenního cholesterolu receptorem zprostředkovanou endocytózou (převzato z Goldstein *et* Brown, 1990)

3.1.2 Transport cholesterolu v organismu

Transport cholesterolu je velmi komplexní. Zahrnuje mnoho transportérů, regulační a katalyzující enzymy, lipoproteiny, receptory a mnoho dalších (Andrade *et al.*, 2019). Homeostáza cholesterolu je v těle udržována především *de novo* syntézou, intestinální absorpcí a exkrecí do žluči a stolice.

Zisk exogenního cholesterolu začíná štěpením potravy a jeho vstřebáváním ze střeva do organismu. Cholesterol a triglyceridy dávají vznik chylomikronům, které mohou pronikat lymfatickými cévami a krevním řečištěm do jater. V játrech je cholesterol inkorporován do VLDL nebo je odváděn žlučí.

Částice VLDL jsou secernovány játry do mimojaterních tkání, kde jsou dále metabolizovány nebo jsou uchovány ve formě zásob. Na VLDL částice působí lipoproteinová lipasa, která je štěpí za vzniku LDL. Částice LDL transportují až 70 % cholesterolu. (Češka, 2005).

Částice HDL jsou uvolňovány játry do krve ve formě „nascentních“ částic. Tyto prekurzory vznikají štěpením chylomikronů lipoproteinovou lipasou a mají tvar diskoidní částice obsahující estery cholesterolu, fosfolipidy a apolipoproteiny A-1. Částice HDL mají zásadní roli při reverzním transportu cholesterolu, protože na počátku své existence obsahují málo cholesterolu a jsou téměř prázdné. Tento transport slouží k přenosu cholesterolu z periferních tkání zpět do jater, kde může být odbourán (Kodíček *et al.*, 2015).

3.1.3 Vylučování cholesterolu z organismu

Lidé nemají enzym, který by přímo degradoval sterolové jádro cholesterolu. Cholesterol a jeho metabolity jsou vylučovány žlučí nebo odchází stolicí. Cholesterol se ve střevě účastní resorpce lipidů, jeho část je pak zpětně vstřebána enterohepatálním oběhem, zbytek je vyloučen stolicí (Koštíř, 1974).

3.1.4 Regulace homeostázy cholesterolu

U vyšších živočichů musí docházet k regulaci mevalonátové dráhy, protože se cholesterol syntetizuje uvnitř buňky a zároveň je přiváděn do buňky ve formě LDL-cholesterolu z plazmy endocytózou zprostředkovanou receptorem (Goldstein et Brown, 1990). Aby nedocházelo k nadměrnému hromadění cholesterolu v buňce, musí každá buňka regulovat vnitřní i vnější zdroje cholesterolu. Této rovnováhy je dosaženo díky feedback regulaci dvou sekvenčních enzymů v rámci mevalonátové dráhy, jedná se o HMGCS a HMGR. Taktéž LDL receptor hraje svou roli v regulaci homeostázy cholesterolu. Pokud není přítomen LDL-cholesterol v plazmě, dochází k syntéze cholesterolu mevalonátovou dráhou. V opačném případě je aktivita HMGCS a HMGR snížena až o 90 % a buňky pak produkují pouze malé množství mevalonátu potřebného pro konečné produkty nesterolového původu (Brown et Goldstein, 1980). Tento způsob regulace je velmi často využíván u léčiv ovlivňující dyslipidemii, zejména ke snížení hladiny LDL-cholesterolu (Švihovec *et al.*, 2018).

Homeostáza cholesterolu je regulována transkripčními faktory SREBP. Tyto transkripční faktory regulují transkripci klíčových enzymů jako je HMGCR nebo LDL receptor, který zprostředkovává příjem LDL-cholesterolu do jater.

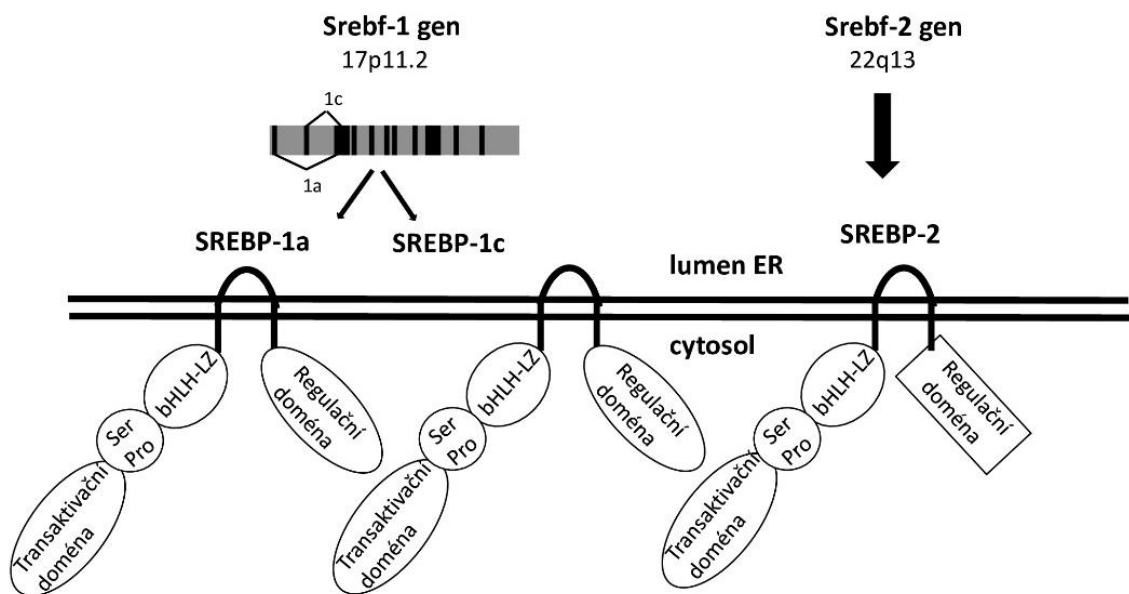
3.1.4.1 SREBP transkripční faktory

Jak již bylo výše zmíněno, u živočichů mají lipidy mnoho funkcí. Biosyntéza mastných kyselin a cholesterolu tak musí být kontrolována. Jejich kontrolu zprostředkovává rodina transkripčních faktorů, které jsou označovány jako SREBP (sterol regulatory element binding protein). Tyto transkripční faktory aktivují kaskádu enzymů potřebných pro endogenní syntézu cholesterolu, mastných kyselin, triglyceridů a fosfolipidů (Eberle *et al.*, 2004).

Existují celkem tři izoformy těchto transkripčních faktorů. První dva, SREBP-1a a -1c, jsou kódovány jedním genem *Srebf-1*. Tento gen se nachází na lidském chromozomu 17p11.2. Transkripty těchto genů jsou tvořeny z alternativních transkripčních počátků a liší se jejich prvním exonem. Třetí izoforma SREBP-2 je kódována genem *Srebf-2*, který se nachází na lidském chromozomu 22q13 (Hua *et al.*, 1995b). Proteiny SREBP-1 a SREBP-2 jsou ze 47 % homologní. Forma SREBP-1c je dominantní, exprimovaná především v játrech, bílé tukové tkáni, kosterním svalstvu a mozku. Naopak forma SREBP-1a je spíše exprimována ve slezině a tenkém střevě (Shimomura *et al.*, 1997). Bylo prokázáno, že myši postrádající funkci proteinu SREBP-1c (*SREBP-1c^{-/-}*) nebo SREBP-1a (*SREBP-1a^{-/-}*) měly zvýšenou expresi mRNA *Srebf-2*. Protein SREBP-2 tak kompenzoval nepřítomnost SREBP-1, což vedlo k nadměrně zvýšené syntéze cholesterolu. Naopak vyřazení funkce SREBP-2 (myši *SREBP-2^{-/-}*) mělo na zvíře smrtelný účinek, protože SREBP-1 nebyl schopen kompenzovat nefunkčnost SREBP-2, pravděpodobně díky jinému způsobu regulace (Shimano *et al.*, 1997b).

Proteiny SREBP jsou v neaktivní formě navázány na membránu endoplazmatického retikula (ER). Tyto proteiny mají zároveň hydrofobní část, díky níž mohou tvořit homo- nebo heterodimery (Murre *et al.*, 1994). Každý prekurzor SREBP obsahuje tři domény: NH₂-terminální doménu (obsahuje transaktivační doménu, oblast bohatou na serin a prolin, a dále oblast basic-helix-loop-helix-leucine zipper, zkr. bHLH-LZ, umožňující vazbu na DNA a dimerizaci), dva hydrofobní transmembránové segmenty (jsou přerušeny asi 30 aminokyselinovou smyčkou uvnitř ER) a COOH-terminální regulační doménu, jak je uvedeno na Obrázku 3. Obě terminální NH₂- a COOH- domény směřují

směrem do cytosolu. V ER je neaktivní transkripční faktor upevněn jako součást komplexu se SREBP aktivačními proteiny (SCAP) a s proteinem Insig (insulin induced gene), který je v membráně ER (Eberlé *et al.*, 2004). Proteiny Insig interagují se SCAP proteiny a podílí se na udržování neaktivního prekursoru v ER (Yabe *et al.*, 2002). Proteiny SCAP obsahují doménu senzitivní na steroly. Pokud je v buňce přítomen cholesterol, váže se na tuto doménu a mění konformaci komplexu SREBP-SCAP, čímž brání proteolytickému štěpení prekursoru SREBP (Brown *et al.*, 2002). Naopak, pokud dojde ke snížení obsahu cholesterolu v buňce, komplex SREBP-SCAP se přesune do Golgiho aparátu (GA), kde se následně uvolní NH₂-terminální doména prekursoru SREBP. Tím se SREBP stane zralou formou a ten je transportován do jádra buňky vazbou na importiny (Nagoshi, 1999; Lee *et al.*, 2003). Po translokaci SREBP do jádra dochází ke zvýšení exprese mnoha genů, podílejících se na syntéze cholesterolu a lipidů.



Obrázek 3: Struktura transkripčních faktorů SREBP (převzato z Eberlé *et al.*, 2004)

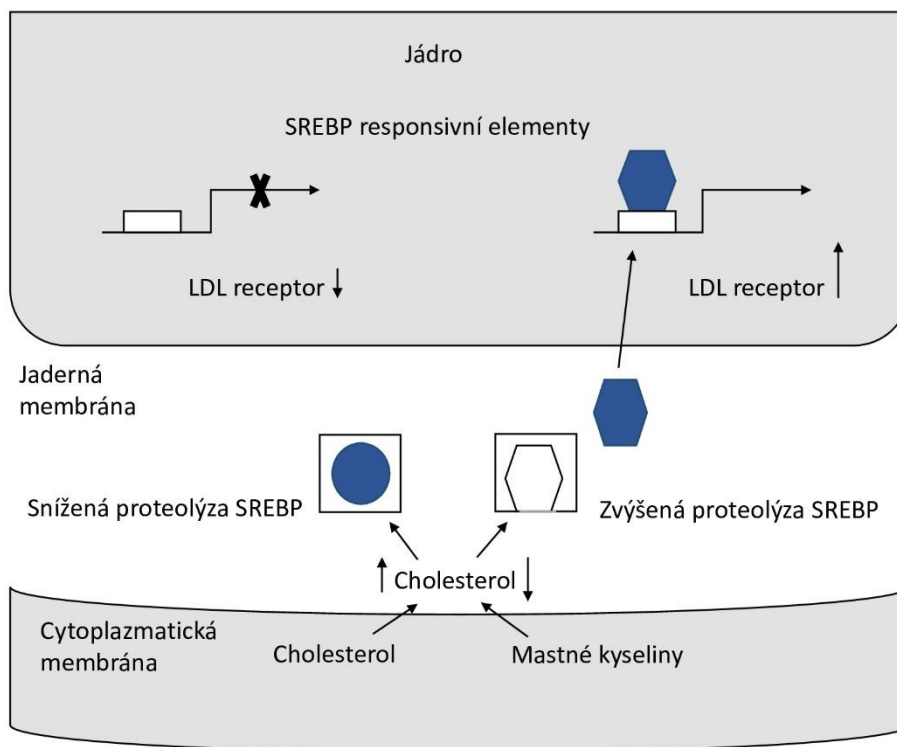
Přestože transkripční faktory SREBP mohou transaktivovat stejné cílové geny, v několika studiích bylo prokázáno, že jednotlivé izoformy mají svou specifickou funkci. Overexprese SREBP-1a v myších játrech vedla ke zvýšení exprese genů zprostředkovávající syntézu cholesterolu, např. HMGCR a HMGCS, a syntézu mastných kyselin, např. acetylkoenzymu A karboxylasy. To vedlo k akumulaci

cholesterolu a triglyceridů (Shimano *et al.*, 1996). U myši, u kterých byl exprimován především SREBP-1c, docházelo k indukci lipogenních genů, zatímco exprese genů podílejících se na syntéze cholesterolu zůstala beze změn (Shimano *et al.*, 1997a). Forma SREBP-1c indukuje také glukokinasu, která je nezbytná pro utilizaci glukózy v játrech a na transkripční úrovni je regulována inzulínem (Foretz *et al.*, 1999). Jaterní overexprese SREBP-2 u myši vedla k indukci genů podílejících se na syntéze cholesterolu a k pouze minimální aktivaci genů podílejících se na syntéze mastných kyselin (Horton *et al.*, 2003).

Transkripční faktory SREBP jsou regulovány na třech úrovních: na úrovni transkripce, proteolytického štěpení SREBP prekurzorů a posttranslační modifikace nSREBP.

Na transkripční úrovni je nejvíce regulován SREBP-1c. Transkripci zvyšuje přítomnost glukózy, inzulínu a jaterního X receptoru α , označovaný jako LXR α (Eberlé *et al.*, 2004). Indukcí inzulínem dochází ke zvýšení exprese jak v membráně vázaného prekurzoru SREBP v ER, tak i jaderné formy tohoto transkripčního faktoru (Azzout-Marniche *et al.*, 2000). Opačný efekt má glukagon díky zvýšené hladině cyklického adenosinmonofosfátu (Foretz *et al.*, 1999). Transkripce mRNA SREBP-1c může být také podpořena vazbou receptoru LXR α na retinoidní X receptor (RXR) za vzniku heterodimeru LXR/RXR. Tím se zvýší koncentrace aktivní jaderné formy proteinu SREBP-1c a zvýší se syntéza mastných kyselin (Repa *et al.*, 2000).

Na úrovni proteolytického štěpení prekurzorů jsou především regulovány SREBP-1a a SREBP-2. Tato regulace je ovlivněna celkovým obsahem sterolů v buňce. Pokud je v buňce vysoká koncentrace sterolů, komplex SREBP/SCAP zůstává uchycen v membráně ER. Dochází tak ke snížení syntézy HMGCR a LDL receptoru. Pokud dojde ke snížení koncentrace sterolů, komplex SREBP/SCAP se přesune do GA. V GA dochází k proteolytickému štěpení, při němž je uvolněna NH₂ doména (zralá forma SREBP), která může vstoupit do jádra (Brown *et Goldstein*, 1991). V jádře se aktivní SREBP váže do promotoru LDL receptoru, kde aktivuje jeho transkripci. Zvýšená exprese receptoru LDL urychluje vstřebávání LDL-cholesterolu endocytózou zprostředkovanou receptory (Obrázek 4). Transkripční faktory SREBP interagují i s genem pro HMGCR, to znamená, že zvyšují expresi tohoto enzymu, a dochází tedy i ke zvýšení biosyntézy cholesterolu (Arnold *et Kwiterovich*, 2003).



Obrázek 4: Vliv hladiny intracelulárního cholesterolu na proteolytickou aktivaci SREBP transkripčních faktorů (převzato a upraveno dle Arnold *et* Kwiterovich, 2003)

Proteiny SREBP jsou posttranskripčně modifikovány různými mechanismy zahrnující fosforylaci, ubikvitinaci, sumoylaci a acetylaci. Například lysinové zbytky nSREBP jsou degradovány ubikvitinací v 26S proteasomu. Tuto degradaci lze blokovat acylací těchto zbytků (Park *et al.*, 2008).

Transkripční faktory SREBP jsou spojeny s vývojem lidských metabolických poruch, jako jsou právě obezita, diabetes druhého typu, dyslipidemie a ateroskleróza. Eberlé *et al.* (2004) dokonce objevili jednonukleotidový polymorfismus (SNP) v genu *Srebf-1*, který je asociován s obezitou a diabetem druhého typu.

3.1.4.2 ABC transportéry

Transportéry ABC, jejichž zkratka pochází z anglického ATP-binding cassette, jsou transmembránové proteiny, které získávají energii z adenosintrifosfátu (ATP) a mohou tak transportovat substráty přes buněčnou membránu (Dean *et al.*, 2001). Transportéry

ABC se skládají z domény vázající ATP neboli domény vázající nukleotid (NBD), a dvou transmembránových domén (TMD). Doména vázající nukleotid obsahuje tři konzervativní oblasti, které jsou označovány jako motivy „Walker A a B“, a oblast C, která odlišuje ABC transportéry od jiných proteinů vázajících se na ATP (Hyde *et al.*, 1990).

Geny ABC transportérů jsou rozprostřeny po celém genomu a jsou organizovány buď jako úplné transportéry obsahující dvě TMD a dvě NBD, anebo jako neúplné transportéry, které mají tyto domény pouze v jedné kopii (Hyde *et al.*, 1990). Aby mohly být tyto transportéry plně funkční, musí fungovat jako homodimery nebo heterodimery. Fylogenetická analýza rozdělila ABC geny do 7 podrodin, které jsou označovány písmenem A–G (Dean *et al.*, 2001).

3.1.4.2.1 ABCA1

Transportér ABCA1 je zakládající člen nadrodiny transportérů ABC podrodiny A. Na rozdíl od ostatních ABC transportérů mají proteiny ABCA regulační doménu. Regulační doména se nachází uprostřed šroubovicových transmembránových domén a obsahuje hydrofobní segment. Předpokládá se, že tento segment přímo interaguje s cytoplazmatickou membránou (Walker *et al.*, 1982). Transportér ABCA1 je asociován s reverzním transportem cholesterolu, je esenciální pro tvorbu HDL částic a prevenci akumulace cholesterolu v periferních tkáních (Oram *et al.*, 2001).

Transportéry ABCA1 se nachází jak na povrchu buněk, tak na membráně GA. Proteiny ABCA1 jsou výrazně exprimovány v makrofázích. Makrofágy mohou díky vychytávacím receptorům akumulovat velké množství modifikovaných lipoproteinů a slouží jako donory cholesterolu a fosfolipidů, kde akceptorem jsou extracelulární HDL částice (Schmitz *et al.*, 2000). Apolipoprotein A1, což je hlavní bílkovinná složka HDL částic, interaguje s transportérem ABCA1 na povrchu buňky bohaté na cholesterol. Transportér ABCA1 může sloužit jako „hydrofobní vysavač“, který přilákává lipidy uvnitř buňky a přenáší je na apolipoprotein A1, nebo funguje jako flipasa. Tento transport pak zprostředkovává další přenos triglyceridů a vzniká velká sférická HDL částice (Schmitz *et al.*, 2001). Částice HDL mají antiaterosklerotický účinek především v odstraňování cholesterolu ze stěn cév, čímž zabráňují vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Oram *et al.*, 1996).

Existuje více regulačních mechanismů exprese genu *Abca1*. Posttranslační regulace je zajištěna fosforylací regulační domény díky proteinkinasi A s následnou stimulací cyklického adenosinmonofosfátu (Becq *et al.*, 1997). Na transkripční úrovni je transportér ABCA1 regulován cholesterol-senzitivními transkripčními faktory – LXR, RXR.

Mutace v genu kódující tento transportér vede k tzv. Tangierově chorobě. Lidé trpící touto chorobou anebo jinými HDL deficiencemi mají téměř nulovou plazmatickou koncentraci HDL, nízkou sérovou koncentraci celkového cholesterolu a snížený eflux cholesterolu i fosfolipidů z buněk (Schmitz *et Langmann*, 2001).

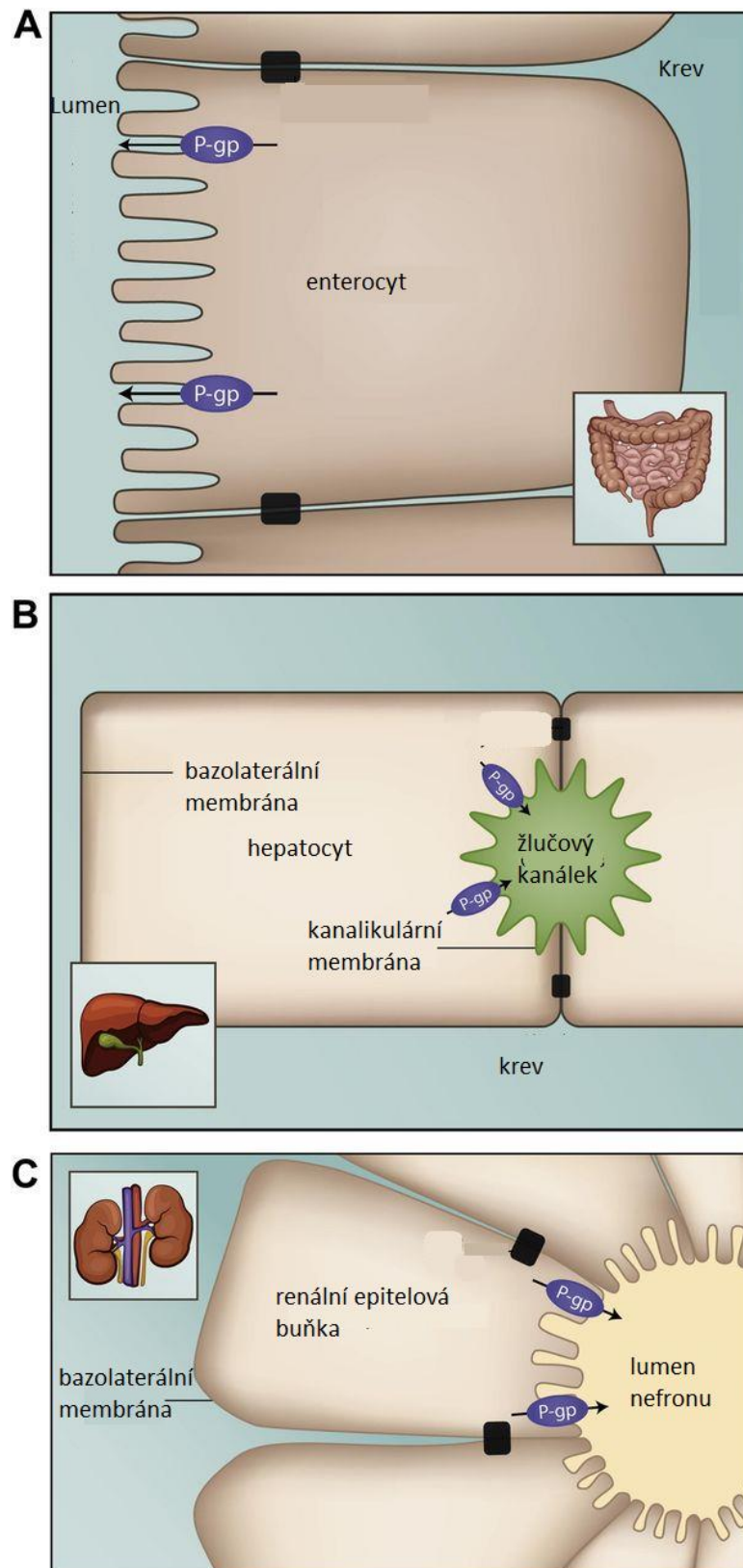
3.1.4.2.2 ABCB1

Protein ABCB1 je intracelulární tkáňově specifický transportér, který patří do nadrodiny ABC transportérů podrodiny B (Christians *et al.*, 2005). Tento protein je označován také jako P-glykoprotein, P-gp, nebo MDR1. Gen *Abcb1* byl objeven u proteinu, jehož exprese byla velmi zvýšena v některých nádorových buňkách rezistentních na chemoterapeutické látky. Díky tomu byly zjištěny dva geny mnohočetné lékové rezistence *Mdr1* a *Mdr3*, přičemž gen *Mdr1* kóduje právě P-gp (Dean *et al.*, 2001).

U lidí je tento protein kódován pouze jedním genem, *Abcb1*, zatímco u hlodavců je tento gen duplikován. Geny hlodavců, *Abcb1a* a *Abcb1b*, se nacházejí blízko u sebe a kódují izoformy ABCB1A a ABCB1B tohoto proteinu (Ambudkar *et al.*, 2003). Substrátová specifita se u těchto dvou izoform překlývá a svou distribucí a funkcí jsou podobné lidskému ABCB1 transportéru (Devault *et Gros*, 1990).

P-glykoprotein je efluxní protein nacházející se v gastrointestinálním traktu, placentě, ledvinách, mozku a v játrech (Obr. 5). Transportér P-gp zprostředkovává odvod léčiv z buněk těchto tkání, čímž chrání tělo před cizími látkami (Dean *et al.*, 2001).

Transportní protein ABCB1 je regulován především na transkripční úrovni, a to několika jadernými receptory, jako je jaterní X receptor (LXR), pregnanový X receptor (PXR) či receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR) (Borst *et Elferink*, 2002).



Obrázek 5: Mechanismus exkrece pomocí P-gp v tenkém střevě (A), v játrech (B) a v ledvinách (C) (převzato a upraveno dle Wessler *et al.*, 2013)

Inhibice nebo indukce P-gp může ovlivnit pohyb jeho substrátů. Existuje široké spektrum léčiv, jako jsou např. protinádorové léky, steroidy i léky na kardiovaskulární systém, které jsou známé jako substráty a/nebo inhibitory P-gp (Wessler *et al.*, 2013). Mezi jeho substráty patří i některé statiny, jako je atorvastatin, který je i jeho silným inhibitorem na molekulární úrovni (Holtzman *et al.*, 2006).

3.1.4.2.3 ABCG5 a ABCG8

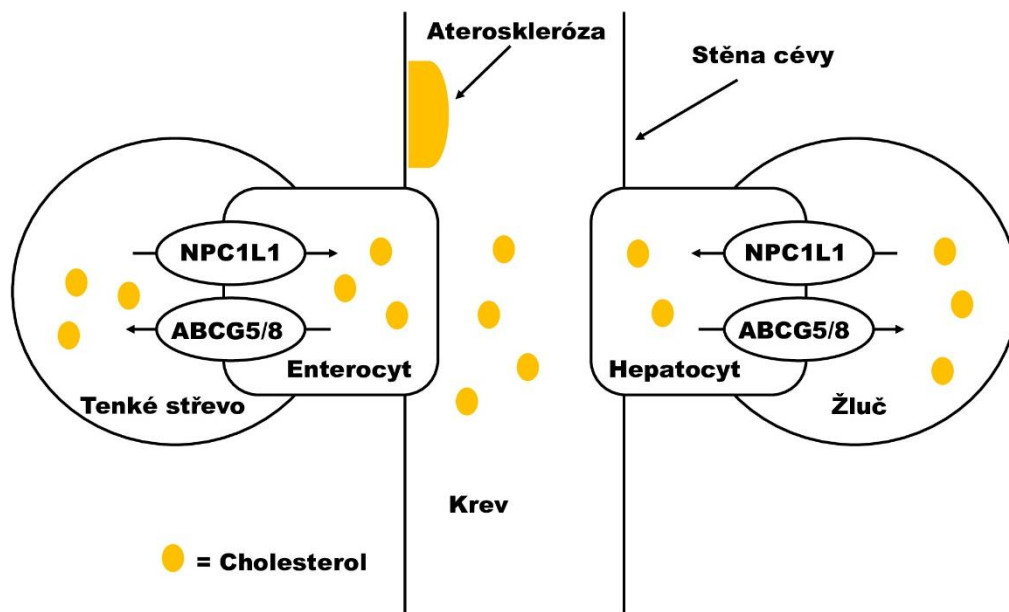
Heterodimery ABC transportérů G5 a G8 jsou efluxní pumpy zprostředkovávající eliminaci cholesterolu a rostlinných sterolů. Geny *Abcg5* a *Abcg8* se nachází na chromozomu 2 a kódují dva různé proteiny, ABCG5 (sterolin-1) a ABCG8 (sterolin-2). Samostatně jsou proteiny nefukční, jelikož musí vytvořit heterodimery, aby získaly transportní aktivitu (Brown *et al.*, 2010). Tyto heterodimery slouží jako obrana před akumulací cholesterolu z potravy. Nachází se na „kartáčovém“ lemu enterocytů, kanalikulární membráně hepatocytů a apikální membráně epitelových buněk žlučníku (Klett *et al.*, 2004). Působením těchto transportérů dochází tedy k eliminaci sterolů zpět do lumen střev a v játrech jsou steroly transportovány do žluče (Brown *et al.*, 2009).

Exprese těchto transportérů je regulována primárně na úrovni transkripce. Jaterní X receptor α , ligandem aktivovaný transkripční faktor, je hlavní regulátor mRNA exprese genů *Abcg5/8*. Jelikož heterodimer ABCG5/8 hraje klíčovou roli v eliminaci cholesterolu z těla, předpokládá se, že jeho overexprese bude inhibovat aterosklerózu (Yu *et al.*, 2014).

Pokud dojde k mutaci genů kódující tyto transportéry, dochází k výraznému zvýšení plazmatické koncentrace rostlinných sterolů a malému zvýšení koncentrace cholesterolu. To je způsobeno nadměrnou absorpcí fytoosterolů z tenkého střeva a jejich sníženou exkrecí do žluče. Toto vzácné autozomálně recesivní onemocnění se nazývá sitosterolémie (Berge *et al.*, 2000).

3.1.4.3 NPC1L1

Protikladem transportérů ABCG5/8 je transportér Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1). Jeho funkcí je absorpce cholesterolu ze střev a reabsorpce cholesterolu ze žluče. Tento transportér se nachází na apikálním „kartáčovém“ lemu enterocytů a kanalikulární membráně hepatocytů, a tímto způsobem brání ztrátám cholesterolu těmito cestami, jak je znázorněno na Obrázku 6 (Yu, 2008).



Obrázek 6: Transport cholesterolu transportéry NPC1L1 a ABCG5/8 (převzato z publikace Stender *et al.*, 2014)

Tento protein se skládá z několika transmembránových domén a jedna z nich je i doména citlivá na steroly, stejně tak jako u SCAP proteinů nebo HMGCR (jak již bylo zmíněno výše). Pokud se cholesterol naváže na NPC1L1, dojde k endocytóze cholesterolu, tedy k absorpci cholesterolu do buňky. V buňce, konkrétně v ER, dochází k esterifikaci cholesterolu pomocí acylkoenzymu A cholesterol acyltransferasy 2. Transportní protein NPC1L1 se poté dostává zpět na membránu enterocytů, kde vyčkává na další molekulu cholesterolu a další substráty (Ge *et al.*, 2008). Tuto cestu intestinální absorpce lze inhibovat ezetimibem, což je léčivo, které snižuje absorpci cholesterolu, snižuje plazmatickou koncentraci celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu (Davis *et Veltri*, 2007).

Tang *et al.* (2006) zjistili, že pokud myším není podán cholesterol, mají zvýšenou jaterní i intestinální expresi NPC1L1. Naopak u myší, které měly dietu obohacenou o cholesterol, bylo zjištěno, že mají sníženou expresi NPC1L1 (Davis *et al.*, 2004). Tuto skutečnost taktéž prokázali Alrefai *et al.* (2007), kteří také objevili, že exprese mRNA NPC1L1 je regulována přes SREBP-2.

3.2 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom je souhrn rizikových faktorů způsobující vývoj kardiovaskulárních onemocnění a diabetes druhého typu. Tento syndrom je asociován s dyslipidemií, hypertenzí, viscerální obezitou a endotelní dysfunkcí (Alberti *et al.*, 2005). První představy o metabolickém syndromu formuloval Raven v roce 1998, který tento syndrom nazval jako syndrom X.

V současnosti je metabolický syndrom diagnostikován u lidí, u nichž jsou zaznamenány tři nebo více z těchto pěti komponent (Češka, 2005):

- Centrální obezita (obvod pasu > 102 cm (muži); > 88 cm (ženy))
- Zvýšená koncentrace TG (> 1,7 mmol·l⁻¹)
- Snížená koncentrace HDL-cholesterolu (< 1,04 (muži); < 1,29 (ženy) mmol·l⁻¹)
- Arteriální hypertenze (TK > 135/85 mm Hg)
- Zvýšená plazmatická koncentrace glukózy nalačno (> 6,1 mmol·l⁻¹)

U této definice se musí zohledňovat odlišné antropometrické rozdíly v různých částech světa. Proto je centrální obezita měřená obvodem pasu odlišná u lidí pocházejících z Evropy či Asie. Celosvětově je prevalence metabolického syndromu 10–84 % v závislosti na regionu, environmentálních podmínkách, pohlaví, věku a etnicitě. Vyšší socioekonomický status, sedavé zaměstnání a vyšší BMI jsou asociovány s metabolickým syndromem (Kaur, 2014).

Jedním z nejčastějších rizikových faktorů metabolického syndromu je dyslipidemie, která je charakterizována zvýšenou plazmatickou koncentrací TG, celkového cholesterolu, LDL částic a sníženou koncentrací HDL (Poruba *et al.*, 2015a).

3.2.1 Léčba metabolického syndromu

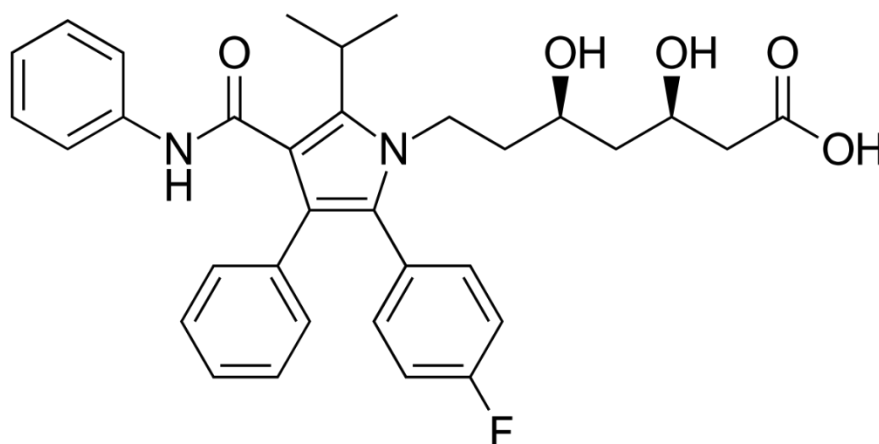
Metabolický syndrom je chronický a patologický stav způsobující patologické změny. Pacienti s metabolickým syndromem by především měli změnit svůj životní styl, snížit svoji hmotnost, změnit stravu a začít s pravidelným pohybem. Momentálně není žádná metoda či lék, který by ovlivnil metabolický syndrom jako celek, ale pouze jeho dílčí části – léky na snížení krevního tlaku, krevní glukózy nebo cholesterolu (Kaur, 2014). Mezi nejčastěji užívané léky na snížení koncentrace cholesterolu jsou statiny, kam patří i atorvastatin.

Další možností terapeutického využití jsou přírodní látky bohaté na polyfenolické látky. Jednou z takových látek je silymarin, který je získáván ze semen ostropestřce mariánského, *Silybum marianum* (Valenzuela *et* Garrido, 1994).

3.2.1.1 Atorvastatin

Atorvastatin je hypolipidemikum ze skupiny statinů. V současné době jsou statiny nejvýznamnějšími hypolipidemiky snižující především koncentraci LDL-cholesterolu. V roce 2018 bylo v České republice prodáno 3,38 mil. balení atorvastatinu, což je 58 % ze všech statinů (AISLP, ©2020). Statiny jsou kompetitivní inhibitory HMGCR, čímž zabraňují redukcí HMG-CoA na mevalonát, ze kterého by dále vznikal cholesterol (Mangravite *et al.*, 2010). Inhibicí této syntézy dochází ke zvýšení exprese receptoru LDL, následně je LDL-cholesterol vychytáván z plazmy, a tím dochází ke snížení plazmatické koncentrace LDL částic a LDL-cholesterolu (Malthora *et* Goa, 2001). Pokles cholesterolu a LDL částic v plazmě vede také ke snížení tvorby částic VLDL bohatých na triglyceridy. Pozitivní efekt statinů není pouze v ovlivnění dyslipidemie, ale i ve snížení výskytu kardiovaskulárních chorob a aterotrombotických příhod (Švihovec *et al.*, 2018).

Chemický název atorvastatinu je (3R,5R)-7-[3-fenyl-4-(fenylkarbamoyl)-2-(4-fluorofenyl)-5-isopropylpyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanová kyselina (Obr. 7). Atorvastatin je kompetitivní inhibitor HMGCR. Inhibice HMGCR nemá vliv na regulaci hladiny triglyceridů. Pravděpodobnou příčinou snížení jejich koncentrace je nedostatek cholesterolu v plazmě, který je využíván pro syntézu lipoproteinů bohatých na triglyceridy (Bakker-Arkema *et al.*, 1996).



Obrázek 7: Chemický strukturní vzorec atorvastatinu

Atorvastatin má oproti starším statinům vyšší hypolipidemickou účinnost, která je nejspíš způsobena delším inhibičním působením vůči HMGCR. Mezi další účinky atorvastatinu patří snížení tvorby volných kyslíkových radikálů, jelikož aktivní metabolity snižují oxidovatelnost LDL lipoproteinů (Češka *et* Urbánek, 2004) a snižují plazmatickou koncentraci C-reaktivního proteinu (CRP) (Malthora *et* Goa, 2001).

3.2.1.2 Silymarin

Silymarin je extrakt získaný ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) a užívá se na potíže s trávením a na léčbu jaterních onemocnění. Jeho hepatoprotektivní aktivita je způsobena jeho antioxidačními vlastnostmi (Valenzuela *et* Garrido, 1994). V současnosti je využíván standardizovaný extrakt z ostropestřce mariánského, který obsahuje cca 60 % silymarinu.

Silymarin patří mezi flavonoidy. Skládá se ze 4 strukturních izomerů: silibininu (50–60%), isosilibininu (5 %), silikristinu (20 %) a silidianinu (10 %). Dále obsahuje i jiné složky jako např. taxifolin (přibližně 5 %). Hlavní aktivní složkou silymarinu je silibinin (Saller *et al.*, 2007). Nevýhodou silymarinu je jeho nízká biologická dostupnost (jen 2 % z původní dávky). Řešením tohoto problému je použití mikronizovaného silymarinu, jehož biologická dostupnost je asi o 85 % vyšší než v případě nemikronizované formy. Mikronizace látek zvyšuje jejich vstřebatelnost (Poruba *et al.*, 2015b). Poruba *et al.* (2019) prokázali zajímavý efekt kombinované diety obsahující silymarin a n-3 polynenasycené mastné kyseliny na transportéry ABCG5/8. Tato kombinovaná dieta způsobila u potkanů s metabolickým syndromem zvýšení exprese ABCG5/8, čímž se vyloučilo více cholesterolu do žluče a lumen střev. Vlivem toho se snížila celková koncentrace TG a cholesterolu a zvýšilo se množství antiaterogenních HDL částic.

3.2.2 Zvířecí modely metabolického syndromu

Hypertenze je jeden z faktorů metabolického syndromu, proto lze ke studiu metabolického syndromu použít zvířecí model s hypertenzí. Nejčastěji užívaným modelem hypertenze je kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR), který byl vyšlechtěn v Japonsku (Okamoto *et* Aoki, 1963). Dalším modelem kombinující hypertenzi, insulinovou rezistenci a hypertriglyceridemii je kmen hereditárně

hypertriglyceridemických (HHTg) potkanů, který byl vyšlechtěn v Praze autory Vrána *et al.* (1990) v Centru experimentální medicíny IKEM.

3.2.2.1 HHTg potkan

Potkani kmene HHTg byly vyšlechtěny v roce 1990 v Praze z potkanů kmene Wistar, kterým byla podávána dieta s vysokým obsahem sacharózy. Tato dieta způsobovala velký nárůst TG a změny v utilizaci glukózy. Jelikož byla koncentrace TG u Wistar potkanů příliš vysoká, použili ke křížení tři páry s nejnižší plazmatickou koncentrací TG a tři páry s nejvyšší koncentrací TG. Díky tomuto křížení vznikla „normotriglyceridemická“ a „hypertriglyceridemická“ linie (Vrána *et Kazdová*, 1990). Plazmatická koncentrace TG je téměř 4x vyšší u 15. generace HHTg potkanů v porovnání s normotriglycerideckými kontrolami. Kontrolní linie nebyla příliš fertilní a postupně docházelo k jejímu vymírání, a proto se jako kontrolní potkani používají potkani kmene Wistar (Vrána *et al.*, 1993).

Kromě hypertriglyceridemie má kmen HHTg potkanů poruchu tolerance glukózy, inzulínovou rezistenci, které nejsou způsobeny přijímanou potravou. Koncentrace cholesterolu se u HHTg potkanů nijak neliší od jeho plazmatické koncentrace a lipoproteinové frakce u kontrolních kmenů. Přes všechny tyto symptomy je tělesná hmotnost těchto potkanů nižší než u kontrolních Wistar potkanů, tudíž HHTg potkani nejsou obézní (Klimeš *et al.*, 1993). Tito potkani mají také zvýšený systolický, diastolický a střední tlak, který je a o 20–30 mm Hg vyšší než u kontrolního kmene Wistar (Štolba *et al.*, 1992).

3.2.2.2 SHR-CRP potkan

Nejčastěji užívaným zvířecím modelem lidské hypertenze je kmen spontánně hypertenzních potkanů. Tento model vznikl v Japonsku, kde autoři Okamoto *et Oaki* (1963) zkřížili potkany kmene Wistar vykazující hypertenzi. Ke zvýšení krevního tlaku dochází kolem 5. – 6. týdne od narození a systolický tlak dosahuje až 180–200 mm Hg. U kmene SHR dochází k hypertrofii srdečního svalů, jeho selhání a renální dysfunkci (Pinto *et al.*, 1998).

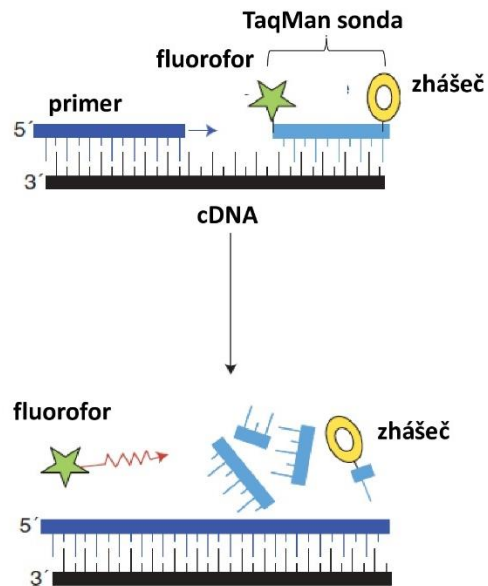
C-reaktivní protein pravděpodobně způsobuje jednotlivé symptomy metabolického syndromu nebo je pouze sekundární odpovědí na zánětlivé procesy, které jsou způsobeny těmito symptomy. Zvýšené koncentrace CRP korelují s vysokým rizikem vývoje kardiovaskulárních onemocnění, diabetu a mnoha symptomů metabolického

syndromu, jako je obezita, inzulínová rezistence, dyslipidemie a vysoký krevní tlak (Lavie *et al.*, 2009). Z těchto důvodů autoři Pravenec *et al.* (2011) transgenně exprimovali lidský CRP v kmenu potkanů SHR. Transgenní SHR kmen byl vyvinut za pomoci mikroinjekcí genového konstruktů s cDNA lidského CRP do zygot SHR potkanů. Je prokázáno, že transgenní SHR kmeny mají ještě vyšší krevní tlak než původní SHR kmen. Exprese lidského CRP v kmenu potkanů SHR ovlivňuje další symptomy metabolického syndromu – inzulínovou rezistenci a hypertriglyceridémii. Protein CRP zvyšuje oxidační stres ve tkáních způsobujících vývoj kardiovaskulárních onemocnění a diabetu druhého typu. Oxidační stres v ledvinách může způsobovat hypertenzi a může poškozovat její tkáň, stejně tak i v játrech (Pravenec *et al.*, 2011).

3.3 Metoda real-time PCR

Variantou polymerázové řetězové reakce (PCR) umožňující přímé sledování nárůstu PCR produktů mezi jednotlivými cykly je kvantitativní real-time PCR. Jelikož je nárůst PCR produktů přímo úměrný množství templátové DNA, real-time PCR je využívána ke sledování exprese mRNA, výpočtu kopií genomické nebo virové DNA a mnoha dalším účelům (Kariyazono *et al.*, 2001).

Nárůst PCR produktů je vizualizován narůstající intenzitou fluorescence, která je zaznamenávána speciálním real-time termocyklem. Pro detekci produktu v průběhu reakce se využívají tři obecné postupy značení: interkalační barviva vázající se na DNA; fluorescenčně značené sondy vážící se na střední část ampliconu a fluorescenčně značené primery (Šmarda *et al.*, 2005). Jedním z běžně používaných fluorescenčních barviv je SYBRGreen, které po vazbě na menší žlábek dsDNA fluoreskuje. Naopak hydrolyzační sonda Taqman využívá 5'-exonukleázové aktivity *Taq* polymerasy. Tyto oligonukleotidové sondy mají na konci 5' reportérové fluorescenční barvivo a na konci 3' zhášecí. Pokud je cílová sekvence přítomna a sonda se naváže, *Taq* polymerasa ji během amplifikace hydrolyzuje. Hydrolyzací dojde k oddělení zhášecí od reportéru a přístroj detekuje fluorescenci (Obr. 8) (Heid *et al.*, 1996).



Obrázek 8: Schéma hydrolyzační sondy TaqMan (převzato a upraveno dle Arya *et al.*, 2005)

Počítačový software sestaví z emitující fluorescence amplifikační křivku, která je rozdělena do tří fází. Fáze pozadí (baseline) označuje první cykly PCR, během nichž je detekován fluorescenční signál, ale jeho intenzita není natolik velká, aby ji přístroj detekoval. V exponenciální fázi dochází k exponenciálnímu růstu PCR produktů, tudíž i fluorescence. V této fázi je měřena základní hodnota real-time PCR, kterou je tzv. C_t (threshold cycle). Jedná se o cyklus, ve kterém signál fluorescence překročí prahovou hodnotu. Tato hodnota je naměřena během cyklů, kdy systém ještě není nasycen, a proto jsou C_t hodnoty pro další pokusy reprodukovatelné (Higuchi *et al.*, 1993). Přítomnost většího množství templátu na počátku reakce vede k rychlejší akumulaci PCR produktů, která způsobí, že fluorescence překročí prahovou hodnotu za menší počet cyklů. Postupně je systém nasycen a nastává třetí fáze – „plató“ fáze. Rychlost amplifikace se snižuje a postupně se přestávají tvořit nové PCR produkty (Arya *et al.*, 2005).

Co se týče vyhodnocení, existují dvě metody kvantifikace výsledků – absolutní a relativní. Absolutní kvantifikace slouží ke stanovení počtu kopií templátu v reakci. Pro tyto účely je potřeba vytvořit kalibrační řadu o známém množství kopií, do které jsou dosazovány získané C_t hodnoty neznámého vzorku.

Naopak relativní kvantifikace nevyžaduje tvorbu kalibrační křivky. Nejčastěji je využívána komparativní metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Tato metoda slouží k relativnímu stanovení změny exprese sledovaného genu vůči endogennímu housekeeping genu (Livak *et Schmittgen*, 2001). Nejčastěji používané housekeeping geny pro normalizaci výsledků jsou β -aktin, albumin, Hprt. Tyto geny jsou teoreticky exprimované konstantně v celém organismu, v různých vývojových stádiích a jejich hladina exprese by se neměla měnit během různých experimentálních podmínek (Gilliland *et al.*, 1990).

4 MATERIÁL a METODY

4.1 Biologický materiál

K tomuto experimentu byly použity tkáň tenkého střeva samců potkana kmene HHTg a SHR-CRP. V experimentu s HHTg potkany bylo zařazeno 32 zvířat, které byly rozděleny do čtyř skupin (N = 8). Potkani byli chováni za standardních laboratorních podmínek s volným přístupem ke krmivu a vodě. První kontrolní skupina byla krmena standardní laboratorní stravou (STD) a zbylé tři skupiny měli dietu obohacenou o atorvastatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{den}^{-1}$), mikronizovaný silymarin (1 % v STD) nebo kombinací obou, jak atorvastatinu, tak i silymarinu.

V experimentu s SHR-CRP potkany bylo zařazeno 27 zvířat. V kontrolní skupině bylo 7 jedinců, kteří byli krmeni STD. Experimentální skupiny ($N \leq 7$) měly stravu obohacenou o atorvastatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{den}^{-1}$), mikronizovaný silymarin (1 % v STD) nebo kombinaci atorvastatinu a silymarinu.

Po čtyřech týdnech byla zvířata dekapitována, exsanguinována a části odebraných orgánů byly ihned vloženy do stabilizačního pufru. Poté byly zamraženy na $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ pro další experimenty.

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.

4.2 Použité soupravy a chemikálie

Použité chemikálie

- ABCA1 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn01557865_m1)
- ABCB1A TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn01565540_m1)
- ABCB1B TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn00568840_m1)

- ABCG5 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn01499073_m1)
- ABCG8 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn00590367_m1)
- HMGCR TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn00565598_m1)
- HPRT TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn01527840_m1)
- LDLR TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn01425340_m1)
- NPC1L1 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn01443503_m1)
- Silymarin mikronizovaný (Favea, Kopřivnice, ČR)
- SREBF-1 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn00252680_m1)
- SREBF-2 TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat. č. Rn01529840_m1)

Použité soupravy

- EvoScript Universal cDNA Master kit (Roche – Diagnostická divize, Praha, ČR, kat. č. 07912455001)
- Homogenizační zkumavky Precellys Evolution (Bertin Industries, Rockville, MD, USA)
- LightCycler® 1536 DNA Probes Master Kit (Roche – Diagnostická divize, Praha, ČR, kat. č. 05502381001)
- RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, D, kat. č. 74134 a 74136)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Hamburk, D)
- Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf, Hamburk, D)
- Centrifuga Multi-spin (Biosan, Riga, LV)
- DNA/RNA UV-cleaner box, UVC/T-AR (Biosan, Riga, LV)
- Homogenizátor tkání Precellys Evolution (Bertin Industries, Rockville, MD, USA)
- Kapalinový manipulátor Echo 550 (Labcyte, San José, CA, USA)

- Laminární box biohazard (Merci, Brno, ČR)
- Mikropipety research 200; 100; 20; 10; 2,5 µl (Eppendorf, Hamburk, D)
- Spektrofotometr NanoPhotometr® N60 (Implen, Mnichov, D)
- Termocykler Epgradient S (Eppendorf, Hamburk, D)
- Termocykler LightCycler 1536 Instrument (Roche – Diagnostická divize, Praha, ČR)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace RNA

Z tkání tenkého střeva HHTg a SHR-CRP potkanů byla izolována mRNA pomocí RNeasy® Plus Mini Kitu dle návodu dodavatele.

1. Krátce před izolací byla připravena směs RLT pufru (komerční pufr z kitu) a 2-merkptoethanolu, na 1 ml RLT pufru je 10 µl 2-merkptoethanolu (100:1).
2. 600 µl připravené směsi bylo napipetováno do homogenizačních zkumavek, poté bylo přidáno asi 20 mg střevní tkáně.
3. Tkáň byla homogenizována v přístroji Precellys při 6500 ot·min⁻¹ 3 x 20 s.
4. Zkumavky s homogenátem byly centrifugovány 1 min při 11400 g.
5. Lyzát byl přenesen na QIAshredder spin kolonku umístěnou ve 2ml mikrozukmavce. Mikrozukmavka se spin kolonkou byla centrifugována 75 s při 11400 g.
6. Původní kolonka byla vyhozena a k filtrátu bylo přidáno 600 µl 70% ethanolu. Po promísení bylo odebráno 600 µl roztoku, který byl napipetován na RNeasy MinElute spin kolonku umístěnou v nové 2ml zkumavce.
7. Mikrozukmavka s kolonkou byla centrifugována při 7000 g 15 s, filtrát byl odstraněn a na kolonku byl nanesen zbytek připraveného roztoku se 70% ethanolem, ten byl opět centrifugován a filtrát byl opět odstraněn.
8. Na kolonku s izolovanou RNA bylo napipetováno 600 µl RW1 pufru (komerční pufr z RNeasy® Plus Mini kitu), mikrozukmavka s kolonkou byla centrifugována při 7000 g 15 s. Filtrát byl odstraněn.
9. Na kolonku bylo přidáno 500 µl RPE pufru (komerční pufr z kitu), mikrozukmavka byla centrifugována při 7000 g 15 s. Filtrát byl odstraněn.

10. Opět bylo přidáno 500 μ l RPE pufru a mikrozkuhavka s kolonkou byla centrifugována při 7000 g 2 min. Mikrozkuhavka s filtrátem byla odstraněna a kolonka byla vložena do čisté mikrozkuhavky.
11. Mikrozkuhavka s kolonkou byla centrifugována při 14000 g 60 s, aby došlo k odstranění zbytkového ethanolu na membráně.
12. Mikrozkuhavka byla odstraněna a kolonka byla vložena do čisté popsané mikrozkuhavky. Na kolonku bylo přidáno 25 μ l vody zbavené RNáz (součást kitu).
13. Mikrozkuhavka s kolonkou byla centrifugována při 8000 g 60 s.
14. Kolonka byla vyhozena a v získaném filtrátu byla změřena koncentrace izolované RNA.
15. Vzorky byly uchovány při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 Reverzní transkripce

Syntéza cDNA z izolované mRNA byla provedena pomocí EvoScript Universal cDNA Master kitu dle postupu dodavatele. Celkový objem směsi byl 20 μ l a bylo použito 1 μ g mRNA.

1. Rozpuštěné a zcentrifugované reagenty byly rozpipetovány do 0,2ml PCR zkumavek dle Tabulky 1.

Tabulka 1: Složení směsi pro reverzní transkripci

Reagenty	Objem [μ l]
Voda, PCR mix (v kitu označené č. 1)	14 - x
Reakční pufr, 5x koncentrovaný (č. 2)	4
Templátová RNA	x
Celkový objem	18

2. Směs byla zcentrifugována a nechala se 5 min inkubovat na ledu.
3. Byly přidány 2 μ l mixu s enzymem, v kitu označeno č. 1.
4. Směs se nechala inkubovat v Termocykleru Eppendorf S dle protokolu inkubace (Tabulka 2).

Tabulka 2: Protokol inkubace syntézy cDNA

Teplota [° C]	Čas [min]
42	15
85	5
65	15
4	2

5. cDNA byla uchována při teplotách -15 až -25 ° C.

4.4.3 Real-time PCR

Se vzorky cDNA byla provedena real-time PCR pomocí LightCycler® 1536 DNA Probes Master Kitu dle protokolu dodavatele. Předtím než byla provedena real-time PCR v 1536jamkové destičce, byla připravena 384jamková deska, která sloužila jako zdroj pro kapalinový manipulátor Echo 550. Ten pak rozpipetoval potřebné 0,5µl objemy do 1536jamkové desky. Vždy byly připraveny dvě 384jamkové desky, jedna pro cDNA a druhá pro směs primerů.

1. Byl vypočítán objem cDNA na jednu jamku zdrojové desky (Tabulka 3 a 4) a stejně tak objem směsi primerů (Tabulka 5 a 6) pro vzorky izolované ze střev HHTg potkanů (31 jedinců + NTC: negativní kontrola). Stejným způsobem byly připraveny zdrojové desky pro vzorky izolované ze střev SHR-CRP potkanů.

Tabulka 3: Výpočet objemu cDNA v jedné jamce 384jamkové desky pro vzorky izolované z tenkého střeva HHTg potkana

Objem cDNA [μl]	0,5
Počet řádků	1
Počet sloupců	48
Počet jamek celkem	48
Objem cDNA [μl] celkem	24
Mrtvý objem [μl]	15
Rezerva [μl]	4
Objem na 1 jamku [μl]	43

Tabulka 4: Příprava cDNA na jednu jamku zdrojové desky

Reagencie	Objem [μl]
cDNA	4,3
voda	34,4
Setup Control 20x	4,3

Tabulka 5: Výpočet objemu PCR směsi v jedné jamce 384jamkové desky pro vzorky izolované z tenkého střeva HHTg potkana

Objem PCR směsi [μl]	0,5
Počet řádků	32
Počet sloupců	6
Počet jamek celkem	192
Objem PCR směsi [μl] celkem	96
Mrtvý objem [μl]	15
Rezerva [μl]	5
Objem na 3 jamky [μl]	116
Objem na 1 jamku [μl]	52

Tabulka 6: Příprava PCR směsi na jednu jamku zdrojové desky

Reagencie	Objem [μl]
Master mix	20,8
Taqman gene expression assay 20x	5,2
PCR voda	26,0

2. Do jamky pro NTC byla napipetována voda místo cDNA.
3. Dle výpočtů byla rozpipetována cDNA a PCR směs do destiček.
4. Pomocí automatického kapalinového manipulátoru byl přenesen obsah do 1536jamkové desky.
5. 1536jamková deska byla zalaminována, aby se zabránilo odpařování a byla centrifugována 2 min při 1500 g.
6. Poté byla deska vložena do přístroje LightCycler 1536, kde byl spuštěn příslušný program (Tabulka 7).

Tabulka 7: Podmínky real-time PCR

	Teplota [° C]	Čas [s]	Počet cyklů
Pre-denaturace	95	60	1
Denaturace	95	5	45
Hybridizace	60	30	
Elongace	60		
Ochlazení	40	10	1

4.4.4 Vyhodnocení dat a statistická analýza

Ze změřených dat byla stanovena relativní genová exprese komparativní metodou $\Delta\Delta C_t$. Data byla normalizována k expresi referenčního Hprt genu pomocí výpočtu

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t, \text{cílový gen}} - C_{t, \text{referenční gen}})_{\text{čas } x} - (C_{t, \text{cílový gen}} - C_{t, \text{referenční gen}})_{\text{čas } 0}$$

kde čas x je jakýkoliv časový bod během testovacích podmínek a čas 0 je počáteční doba genové exprese. Pro referenční gen je $\Delta\Delta C_t$ rovna nule a 2^0 je jedna, proto jsou změny v relativní expresi genů k referenčním genům počítány jako $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak *et* Schmittgen, 2001). Každý vzorek byl proměřen v šesti paralelkách, proto se pro každý vzorek počítal průměr z šesti paralelek. Tato zprůměrovaná data z jednotlivých skupin byla mezi sebou relativně porovnána. Získaná data byla analyzována pomocí statistického programu Statistica 12 (TIBCO software, Palo Alto, CA, USA). Pro porovnání dat z jednotlivých skupin byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test, který porovná všechny skupiny mezi sebou. Statistická analýza byla provedena na hladině významnosti 0,05.

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace mRNA

mRNA byla izolována z tkání tenkého střeva HHTg a SHR-CRP potkanů pomocí RNeasy® Plus Mini Kitu a její koncentrace byla změřena pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60 (Tabulka 8 a 9).

Tabulka 8: Koncentrace a míra čistoty izolované mRNA z tenkého střeva potkanů HHTg stanovené pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60

Skupina	Číslo vzorku	A _{260/280}	A _{260/230}	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]
Kontrola	1	2,18	2,18	1268,80
	2	2,17	2,13	462,28
	3	2,18	2,23	514,84
	4	2,20	2,24	859,16
	17	2,19	2,31	789,08
	18	2,16	2,17	452,96
	19	2,13	2,26	496,72
	20	2,08	2,30	1837,90
Atorvastatin	5	2,24	2,27	1083,40
	6	2,17	2,30	771,10
	7	2,26	2,05	1119,00
	8	2,19	2,24	847,56
	21	2,17	2,26	695,76
	22	2,13	2,28	1181,80
	23	2,20	2,33	907,24
	24	2,19	2,11	738,92
Silymarin	9	2,17	2,08	747,08
	10	2,18	2,30	840,52
	11	2,23	2,39	1125,80
	12	2,18	2,05	535,80
	25	2,24	2,33	958,60
	26	2,22	2,23	1017,00
	27	2,16	2,30	778,36
	28	2,21	1,94	762,48
Atorvastatin + Silymarin	13	2,16	2,26	283,08
	14	2,22	2,35	953,44
	15	2,10	2,36	1098,20
	16	2,15	2,29	484,32
	29	2,17	1,87	491,28
	30	2,10	2,37	1362,30
	31	2,06	2,38	1250,30
	32	2,08	2,18	1097,10

Tabulka 9: Koncentrace a míra čistoty izolované mRNA z tenkého střeva potkanů SHR-CRP stanovené pomocí spektrofotometru NanoPhotometr® N60

Skupina	Číslo vzorku	A _{260/280}	A _{260/230}	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]
Kontrola	1	2,15	2,08	224,40
	2	2,18	1,90	743,60
	3	2,18	1,94	340,04
	15	1,98	2,22	1205,60
	16	2,10	2,35	1472,10
	17	2,19	2,26	564,24
	18	2,19	2,16	503,36
Silymarin	4	2,17	2,32	610,96
	5	2,12	1,95	475,96
	6	2,13	2,35	1422,00
	7	2,13	2,19	583,36
	19	2,19	1,96	827,80
	20	2,08	2,31	1450,90
	21	2,07	2,43	1411,70
Atorvastatin	8	2,11	2,36	1320,00
	9	2,17	2,17	619,00
	10	2,30	2,28	1045,00
	22	2,12	2,24	559,04
	23	2,23	2,23	1050,70
	24	2,22	2,34	1036,80
	25	2,14	2,24	1133,10
Atorvastatin + Silymarin	11	2,04	2,31	1618,50
	12	2,16	2,31	689,76
	13	2,11	1,88	367,28
	14	2,17	2,19	660,32
	26	2,13	2,29	470,92
	27	2,19	2,00	824,00

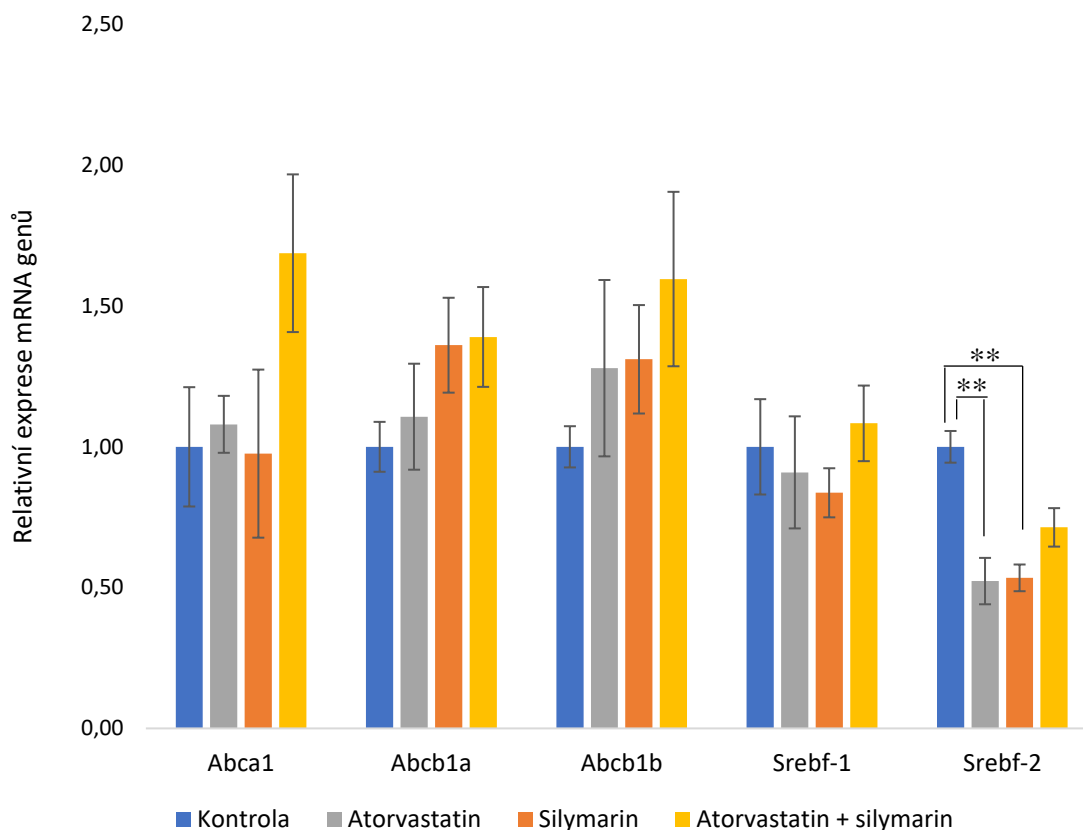
Přepis mRNA do cDNA byl proveden pomocí EvoScript Universal cDNA Master kitu. Získané hodnoty byly přepočítány tak, aby byl použit 1 µg mRNA. Nasyntetizované vzorky cDNA byly amplifikovány pomocí LightCycler® 1536 DNA Probes Master Kitu. Přístroj změřil změny v nárůstu fluorescence a naměřené hodnoty C_t zaznamenal do souboru Excel.

5.2 Změny relativní exprese mRNA

Získaná data byla zpracována komparativní metodou $\Delta\Delta C_t$ a spočítána metodou $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dle autorů Livak *et* Schmittgen (2001). Výsledky byly normalizovány a vztaženy k referenčnímu genu Hprt.

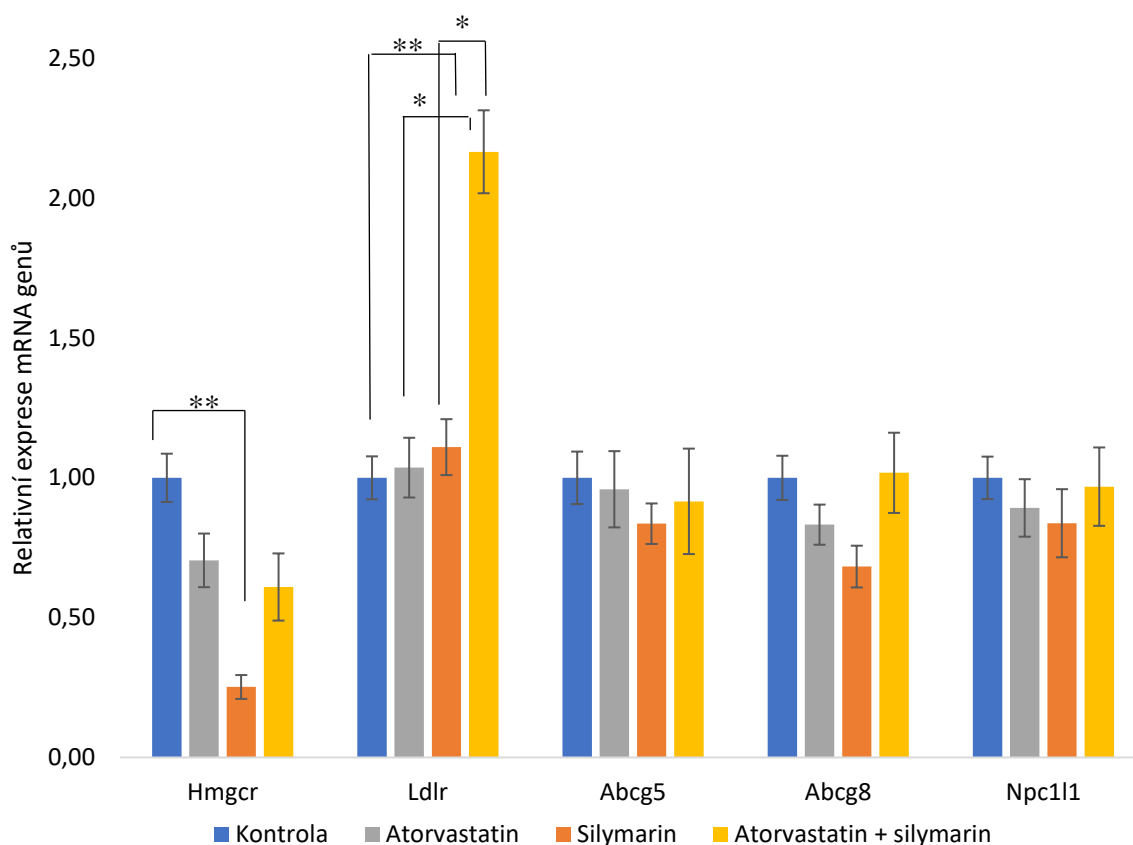
5.2.1 Změny exprese mRNA u HHTg potkana

Výsledky změn exprese vybraných genů jsou vyjádřeny relativně a jsou uvedeny v grafech jako průměr \pm standardní chyba průměrů (SE), zobrazeno na Obrázku 9 a 10.



Obrázek 9: Vliv diety na expresi střevních genů Abca1, Abcb1a, Abcb1b, Srebf-1 a Srebf-2 u potkana HHTg. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SE; N = 8, **statisticky významné rozdíly vs. kontrolní skupina na hladině významnosti $p < 0,01$.

Na Obrázku 9 je vidět mírný trend nárůstu genové exprese u genů Abca1, Abcb1a a Abcb1b. Exprese genu Abca1 se zvýšila především u skupiny, která byla krmena STD obohacenou o silymarin i atorvastatin. Exprese homologních genů Abcb1a a Abcb1b postupně vzrůstá a největší změna je také u kombinace atorvastatinu se silymarinem. Tyto změny však nejsou statisticky významné. Naopak u genu Srebf-1 došlo mírnému poklesu exprese u skupin krmené atorvastatinem nebo silymarinem, u kombinované diety tyto změny zaznamenány nebyly. Tyto změny nebyly statisticky významné. Statisticky významné změny dle neparametrického Kruskal-Wallisova testu byly pozorovány u exprese genu Srebf-2, kde byl výrazný pokles exprese tohoto genu (o 48 a 47 %) pozorován u skupiny krmené atorvastatinem ($p < 0,01$) a skupiny krmené silymarinem ($p < 0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou. Snížení v expresi mRNA Srebf-2 byl také zjištěn u poslední skupiny, nicméně toto snížení nebylo statisticky významné.

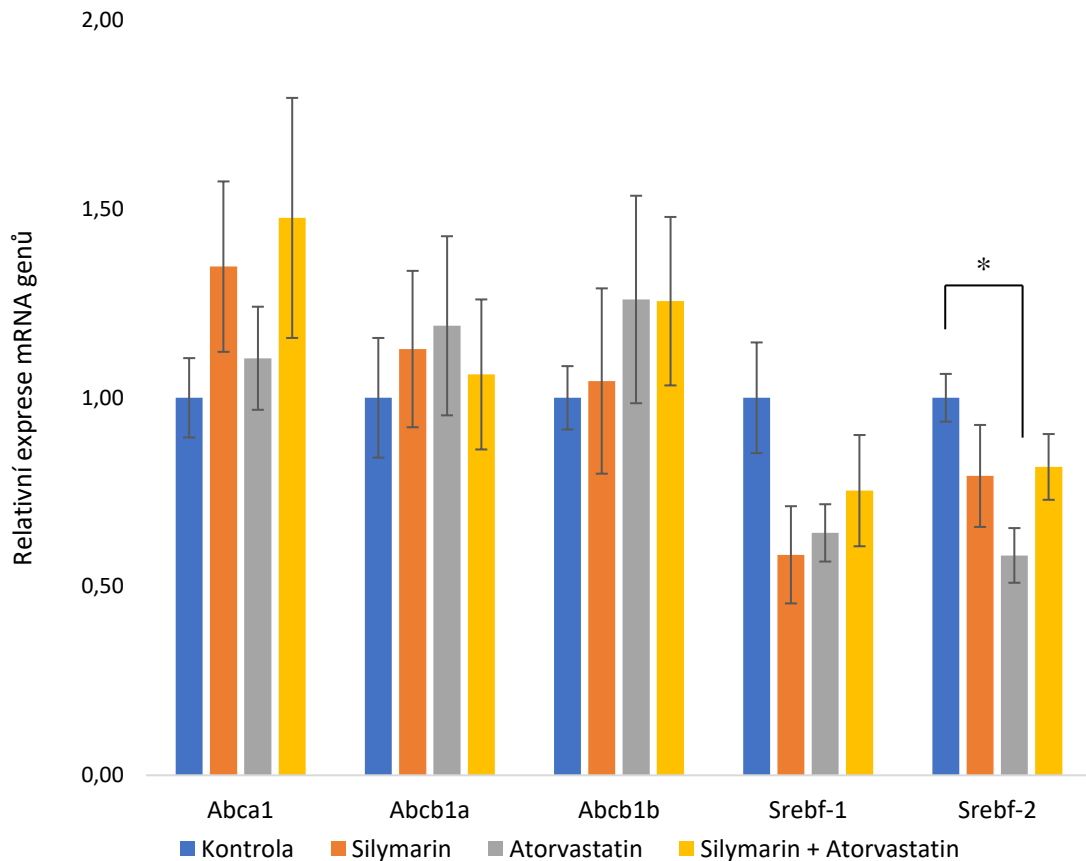


Obrázek 10: Vliv diety na expresi střevních genů Hmgcr, Ldlr, Abcg5, Abcg8 a Npc111 u potkana HHTg. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SE; N = 8. Statisticky významné rozdíly na hladině významnosti: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Expresí genu Hmgcr se snížila (o 75 %) po podání atorvastatinu, k výraznějšímu snížení došlo po podání silymarinu (snížení více než o polovinu, $p < 0,01$). Naopak u genu Ldlr došlo k výraznému zvýšení exprese mRNA (o 117 %) u skupin krmených atorvastatinem i silymarinem, tedy jejich kombinací, v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,01$). Toto zvýšení v expresi mRNA bylo také statisticky odlišné od skupin krmených atorvastatinem ($p < 0,05$) nebo silymarinem ($p < 0,05$). Zbylé tři sledované geny (Abcg5, Abcg8 a Npc111) vykazovaly společný trend změny exprese. U skupiny krmené STD obsahující atorvastatin došlo k mírnému snížení exprese genů Abcg5, Abcg8 i Npc111. Toto snížení bylo výraznější u skupiny krmené STD se silymarinem. Naopak u skupiny krmené kombinací obou látek došlo ke zvýšení exprese všech těchto tří genů oproti dietě obsahující atorvastatin nebo silymarin, exprese byla téměř srovnatelná s expresí genů kontrolních skupin.

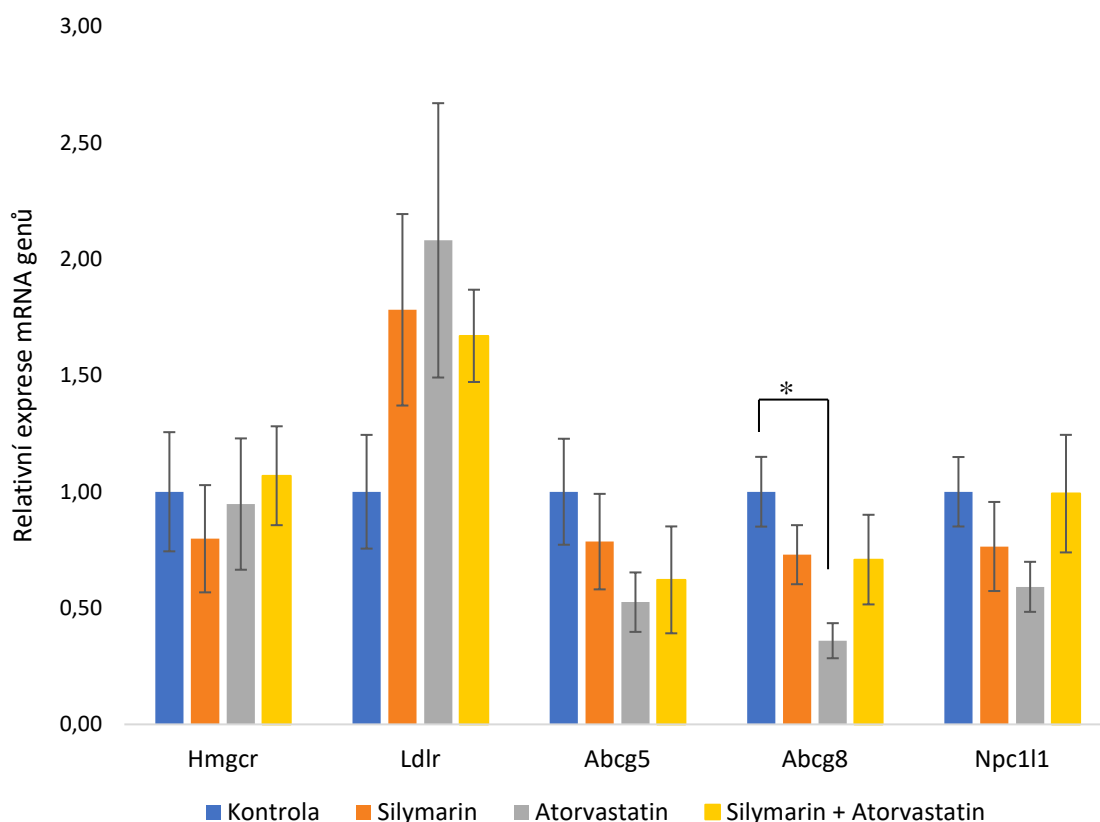
5.2.2 Změny exprese mRNA u SHR-CRP potkana

Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm standardní chyba průměrů (SE) a vyneseny do grafů (Obrázek 11 a 12).



Obrázek 11: Vliv diety na expresi střevních genů Abca1, Abcb1a, Abcb1b, Srebf-1 a Srebf-2 u potkana SHR-CRP. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SE; $N \leq 7$, *statisticky významné rozdíly vs. kontrolní skupina na hladině významnosti $p < 0,05$.

Dieta obohacená o atorvastatin nebo silymarin neměla u potkana SHR-CRP výrazný vliv na změny exprese genů Abca1, Abcb1a, Abcb1b a Srebf-1, lze pozorovat pouze statisticky nevýznamné trendy těchto změn. Naopak u exprese genu Srebf-2 došlo ke statisticky výraznému poklesu (o 42 %) u skupiny, která byla krmena samotným atorvastatinem ($p < 0,05$) v porovnání s kontrolními potkany. U zbylých dvou skupin krměných silymarinem nebo kombinací silymarinu a atorvastatinu byl pozorován mírný pokles v expresi mRNA Srebf-2.



Obrázek 12: Vliv diety na expresi střevních genů Hmgcr, Ldlr, Abcg5, Abcg8 a Npc111 u potkana SHR-CRP. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SE; $N \leq 7$, *statisticky významné rozdíly vs. kontrolní skupina na hladině významnosti $p < 0,05$.

Expresí genu Hmgcr se výrazně nezměnila mezi jednotlivými skupinami potkanů. Naopak, u genu Ldlr došlo u všech experimentálních skupin k velkému nárůstu exprese (o 67–108 %) v porovnání s kontrolní skupinou. Vzhledem k velké interindividuální variabilitě zvířat nebyly tyto změny statisticky významné. Expresí genů Abcg5, Abcg8 a Npc111 opět vykazovaly trend poklesu exprese u skupin, kterým byla podávána strava obohacená o silymarin nebo atorvastatin v porovnání s kontrolní skupinou. Kombinace obou látek naopak expresí genů Abcg5, Abcg8 a Npc111 mírně zvýšila oproti skupinám krmených dietou obohacenou o jednu složku. Výrazný pokles exprese genu Abcg8 (o 64 %) byl pozorován u skupiny krmené stravou obohacenou o atorvastatin ($p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní skupinou.

6 DISKUZE

Tato práce se zabývá účinky dvou současně podaných hypolipidemických látek a zda tato kombinace může mít příznivý vliv na léčbu metabolického syndromu. Atorvastatin je léčivo, jehož mechanismus účinku spočívá v inhibici HMGCR, tedy jeho vazbou do aktivního místa proteinu HMGCR (Niar *et* Wang, 2013). Ovšem to neznamena, že tento jev musí způsobit sníženou expresi genu pro tento enzym. Jak výsledky ukazují, dieta obsahující atorvastatin neměla výrazný vliv na expresi mRNA tohoto enzymu u obou zvířecích modelů metabolického syndromu. Inhibice HMGCR vede ke snížení koncentrace intracelulárního cholesterolu, čímž dochází k uvolnění SREBP z ER do buněčného jádra, kde poté nastává zvýšená genová exprese pro LDL receptor. Tento efekt byl pozorován po podání kombinované diety obsahující atorvastatin a silymarin u HHTg potkanů, v jejichž střevních tkáních byla změřena výrazně zvýšená exprese Ldlr v porovnání s kontrolní dietou ($p < 0,01$) i s dietou obsahující atorvastatin ($p < 0,05$) nebo silymarin ($p < 0,05$). Zdá se, že kombinace silymarinu a atorvastatinu má příznivý vliv v léčbě dyslipidemie, protože zvýšení exprese genu pro LDL receptor vede ke snížení plazmatické koncentrace částic LDL, IDL a VLDL (Niar *et* Wang, 2013). Tremblay *et al.* (2011) sledovali také nárůst exprese Ldlr u hyperlipidemických pacientů, a to až o 50 %. U potkanů SHR-CRP nebyl tento efekt tak výrazný zřejmě proto, že u potkanů tohoto kmene je přítomno více faktorů podporující metabolický syndrom (jako zánět a hypertenze), které mohou hrát roli v regulaci homeostázy cholesterolu. Zároveň nemají zvýšenou koncentraci TG v plazmě jako je tomu u HHTg potkanů.

Zajímavé je, že k výraznému snížení exprese Hmgcr genu došlo po podání samotným silymarinem u HHTg potkanů ve srovnání s kontrolní dietou ($p < 0,01$), nikoliv však u potkanů SHR-CRP. Tato inhibice by mohla být způsobená inhibicí translokace proteinu SREBP do buněčného jádra. Nambiar *et al.* (2014) totiž zjistili, že silibinin (tedy hlavní složka silymarinu) spouští proteinovou kinasu aktivovanou 5' adenosinmonofosfátem (AMPK). Tato aktivace zvyšuje fosforylaci SREBP-1, čímž dochází k inhibici jeho translokace. Sníží se tak jaderná koncentrace SREBP-1, což vede k inhibici exprese genu Hmgcr. Tento účinek budou mít zřejmě i jiné přírodní látky flavonoidní struktury, jako je luteolin. Wong *et al.* (2015) zjistili, že luteolin také moduluje transkripci Hmgcr přes inhibici exprese a jaderné translokace proteinu SREBP-2.

V této práci byla také měřena exprese genů *Srebf-1* a *Srebf-2*, které kódují již zmíněné proteiny SREBP. Exprese genu *Srebf-1* nebyla výrazně ovlivněna u obou zvířecích modelů metabolického syndromu po podání experimentální diety obsahující atorvastatin nebo silymarin ve srovnání s kontrolní dietou. Na druhou stranu bylo pozorováno snížení v expresi u genu *Srebf-2*. Tento efekt byl zjištěn po podání jak samotného atorvastatinu u potkanů SHR-CRP ($p < 0,05$) i HHTg ($p < 0,01$), tak i samotného silymarinu u HHTg potkanů ($p < 0,01$). Gen *Srebf-2* reguluje mimo jiné expresi genu *Npc111* (Alrefai *et al.*, 2007). Navzdory snížené expresi genu *Srebf-2* po podání silymarinu nebo atorvastatinu u zvířecích modelů metabolického syndromu, statisticky významné snížení exprese *Npc111* nebylo ve srovnání s kontrolní skupinou pozorováno. Obě podávané látky tedy nemají vliv na transport cholesterolu zprostředkovaný NPC1L1. Předešlé studie již prokázaly pozitivní účinky silymarinu na plazmatický profil lipoproteinů, nejen redukcí absorpce cholesterolu ze střev, ale také jeho možnou up-regulací ABC transportérů, které ovlivňují metabolismus lipidů (Sobolová *et al.*, 2006). Vliv silymarinu na ABC transportéry, konkrétně ABCG5/8, byl studován u HHTg potkanů již v bakalářské práci (Dohnalová, 2018), kde bylo zjištěno, že podáváním silymarinu a n-3 polynenasycených mastných kyselin došlo k mírnému zvýšení exprese mRNA těchto transportérů ve střevní tkáni. Ovšem Poruba *et al.* (2019) prokázali výrazné zvýšení exprese mRNA těchto transportérů v játrech po podání této kombinované diety, a to až 9násobně ($p < 0,01$). Výsledky této práce ukazují, že samotný silymarin nemá výrazný vliv na expresi střevních genů *Abcg5/8* u obou zvířecích modelů metabolického syndromu. Naopak je tomu u atorvastatinu, který způsobil statisticky významné snížení exprese *Abcg8* ve srovnání s kontrolní dietou ($p < 0,05$). Tremblay *et al.* (2011) zjistili, že atorvastatin snižuje expresi tohoto genu u hyperlipidemických pacientů až o 14 %. Ovšem tento efekt nebyl pozorován u kombinované diety obsahující atorvastatin i silymarin. Snížení syntézy cholesterolu statiny vede ke snížení tvorby isoprenoidů, které regulují aktivaci receptoru LXR. Dochází také ke snížení exprese LXR, které vede k down-regulaci ABC transportérů. Většina ABC transportérů je regulována právě LXR (Dean *et al.*, 2001), a zřejmě proto byla pozorována snížená exprese *Abcg8* po podání atorvastatinu. Běžně předepisované statiny mohou down-regulovat expresi dalších cílových genů pro LXR, jako je *Abca1* (Wong *et al.*, 2004). Výsledkem snížené exprese těchto genů je snížený efflux cholesterolu z buňky. Výsledky této práce ukazují, že dieta obsahující silymarin nebo atorvastatin nebo jejich kombinace nemají zásadní vliv na expresi genů *Abca1* i *Abcb1*

u obou zvířecích modelů metabolického syndromu. Mírné zvýšení v expresi genu *Abca1* pozorovali Večera *et al.* (2011) po podání silymarinu v kombinaci s vysokocholesterolovou dietou u potkanů kmene Wistar. Naše výsledky ukazují, že pouze kombinovaná dieta obsahující silymarin a atorvastatin způsobila mírné zvýšení v expresi genu *Abca1* v porovnání s kontrolou u HHTg potkanů. Ovšem díky interindividuální variabilitě u použitých laboratorních zvířat je tato změna statisticky nevýznamná. Gen *Abca1* kóduje protein ABCA1, který je součástí reverzního transportu cholesterolu. Zprostředkovává transport volného cholesterolu a fosfolipidů přes plazmatickou membránu do HDL částic (Wang *et Smith*, 2014). Jak výsledky ukazují, experimentální strava nemá zásadní vliv na transport cholesterolu zprostředkovaný *Abca1*. Stejný efekt byl pozorován u *Abcb1*, který kóduje efluxní transportér P-gp a je asociován s eliminací lipidů a léčiv (Klein *et al.*, 1999). Je sice známo, že atorvastatin je silným inhibítozem P-gp, a proto může docházet ke zvýšené biologické dostupnosti současně podaných léčiv (Wessler *et al.*, 2013), ale jak ukazují výsledky této práce, tato inhibice není na úrovni exprese genu *Abcb1*.

Přestože silymarin a atorvastatin mají prokázané hypolipidemické účinky, každá z těchto látek ovlivňuje jiné geny a působí tedy jiným mechanismem. Silymarin i atorvastatin vykazují hypolipidemický, hypocholesterolemický efekt a způsobují zvýšenou koncentraci HDL cholesterolu v krevní plazmě (Česka *et Urbánek*, 2004; Poruba *et al.*, 2015a, 2019; Večera *et al.*, 2011). Silymarin inhibuje translokaci SREBP, který vede ke snížení exprese *Hmgcr*, zatímco atorvastatin přímo inhibuje HMGCR. V této práci jsou zaznamenány velké rozdíly v expresích u jednotlivých zvířat v rámci skupiny. Je to dáno velkou interindividuální variabilitou zvířat. Abychom dosáhli zajímavějších statisticky významných výsledků, bylo by zapotřebí použít více zvířat ve skupinách. Nicméně, dle zákona České republiky č. 359/2012 Sb. se snažíme dodržovat tzv. koncepci 3R (Replacement, Reduction, Refinement), kde R znamenají použití zvířat v pokusu pouze tehdy, neexistuje-li žádná jiná alternativa, dále snaha o použití co nejnižšího počtu zvířat v pokusu a zamezení zbytečnému opakování pokusů, a také zjemnění experimentu pomocí neinvazivních technik, anestezie a analgezie.

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit, zda atorvastatin a silymarin ovlivňují expresi mRNA genů řídící homeostázu cholesterolu u potkaních modelů metabolického syndromu – potkan kmene HHTg a potkan kmene SHR-CRP. Strava obohacená o tyto látky měla podobný efekt na expresi vybraných genů u obou zvířecích modelů. Rozdíl byl jen u exprese Hmgcr a Ldlr, které byly zaznamenány po podání experimentální diety jen HHTg potkanů. Důvodem může být, že HHTg potkani na rozdíl od potkanů SHR-CRP trpí zvýšenou plazmatickou koncentrací TG.

Tato práce potvrdila účinky samotných látek na expresi Hmgcr. Atorvastatin sice inhibuje protein HMGCR, ovšem tato inhibice neměla výrazný vliv na expresi jeho genu. Naopak silymarin výrazně inhibuje gen Hmgcr zřejmě přes inhibici translokace SREBP. Kombinace obou látek, atorvastatinu a extraktu silymarinu, způsobila u HHTg potkanů výrazné zvýšení exprese Ldlr, který kóduje LDL receptor zajišťující přenos extracelulárních částic LDL, IDL a VLDL do buněk. Tato kombinovaná dieta by tedy mohla pomoci v léčbě dyslipidémie, která je jedním z faktorů metabolického syndromu.

8 LITERATURA

AISLP – Automatizovaný informační systém léčivých přípravků. [online]. Copyright © INOHARMEX, spol. s r. o., 2020 [navštíveno 13. 5. 2020]. Dostupné z: <https://www.aislp.cz/>

Alberti, K. G. M., Zimmet, P., Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet*, 366(9491), 1059-1062.

Alrefai, W. A., Annaba, F., Sarwar, Z., Dwivedi, A., Saksena, S., Singla, A., Gill, R. K. (2007). Modulation of human Niemann-Pick C1-like 1 gene expression by sterol: Role of sterol regulatory element binding protein 2. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G369-G376.

Anber, V., Griffin, B. A., McConnell, M., Packard, C. J., Shepherd, J. (1996). Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis*, 124(2), 261-271.

Andrade, I., Santos, L., Ramos, F. (2019). An Overview of Cholesterol Absorption. In *The Molecular Nutrition of Fats* (pp. 65-76). Academic Press.

Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., Gottesman, M. M. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 22(47), 7468.

Arnold, D. R., Kwiterovich Jr, P. O. (2003). Cholesterol Absorption, Function, and Metabolism. 1226-1237.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209-219.

Azzout-Marniche, D., Bécard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferré, P., Foufelle, F. (2000). Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochemical Journal*, 350(2), 389-393.

Bakker-Arkema, R. G., Davidson, M. H., Goldstein, R. J., Davignon, J., Isaacsohn, J. L., Weiss, S. R., Keilson, L. M., Brown, W. V., Miller, V. T., Shurzinske L. J., Black, D. M. (1996). Efficacy and safety of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia. *Jama*, 275(2), 128-133.

- Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B., Chimini, G. (1997). ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2695-2699.
- Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J. Hobbs, H. H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, 290(5497), 1771-1775.
- Borst, P., Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 537-592.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *Journal of lipid research*, 21(5), 505-517.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11041-11048.
- Brown, A. J., Sun, L., Feramisco, J. D., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Molecular cell*, 10(2), 237-245.
- 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.
- Češka, R. (2005). *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. Triton. Vyd. 1., Praha: Triton, 2005. 343 s.
- Češka, R. (2012). *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. Vyd. 4., Praha: Triton, 2012. 406 s.
- Češka, R., Urbánek, K. (2004). Atorvastatinum. *Remedia*, 2, 110-120.

- Danyi, P. (2009). Reziduální kardiovaskulární riziko u pacientů s inzulinovou rezistencí. [online] [navštíveno 9. 4. 2020] Dostupné z <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/metabolicky-syndrom-rezidualni-riziko-a-aterogenni-index-plazmy-422563>
- Davis, H. R., Veltri, E. P. (2007). Zetia: inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 14(3), 99-108.
- Davis, H. R., Zhu, L. J., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J. Detmers, P. A. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33586-33592.
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 42(7), 1007-1017.
- Devault, A., Gros, P. (1990). Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Molecular and cellular biology*, 10(4), 1652-1663.
- Dohnalová D. (2018): Stanovení exprese mRNA transportních proteinů ABCG5 a ABCG8 u HHTg potkanů na dietě obohacené o přírodní látky. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86(11), 839-848.
- Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., Foufelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12737-12742.
- Galassi, A., Reynolds, K., He, J. (2006). Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *The American journal of medicine*, 119(10), 812-819.
- Ge, L., Wang, J., Qi, W., Miao, H. H., Cao, J., Qu, Y. X., Li, B-L, Song, B. L. (2008). The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell metabolism*, 7(6), 508-519.

- Gilliland, G., Perrin, S., Bunn, H. F. (1990). Competitive PCR for quantitation of mRNA. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, 60-69.
- Griffin, B. A. (1997). Low-density lipoprotein subclasses: mechanisms of formation and modulation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56(2), 693-702.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257), 425.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026-1030.
- Holtzman, C. W., Wiggins, B. S., Spinler, S. A. (2006). Role of P-glycoprotein in statin drug interactions. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 26(11), 1601-1607.
- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12027-12032.
- Hua, X., Sakai, J., Ho, Y. K., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1995a). Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29422-29427.
- Hua, X., Wu, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Hobbs, H. H. (1995b). Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11. 2 and 22q13. *Genomics*, 25(3), 667-673.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R. Higgins, C. F. (1990). Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346(6282), 362.
- Christians, U., Schmitz, V., Haschke, M. (2005). Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism. *Expert opinion on drug metabolism and toxicology*, 1(4), 641-654.

- Ivanova, E. A., Myasoedova, V. A., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V., Orekhov, A. N. (2017). Small dense low-density lipoprotein as biomarker for atherosclerotic diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, Vol. 17, 1-10.
- Kariyazono, H., Ohno, T., Ihara, K., Igarashi, H., Joh-o, K., Ishikawa, S., Hara, T. (2001). Rapid detection of the 22q11. 2 deletion with quantitative real-time PCR. *Molecular and cellular probes*, 15(2), 71-73.
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*. 1-22.
- Klein, I., Sarkadi, B., Váradí, A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1461(2), 237-262.
- Klett, E. L., Lee, M. H., Adams, D. B., Chavin, K. D., Patel, S. B. (2004). Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC gastroenterology*, 4(1), 4-21.
- Klimeš, I., Vrana, A., Kuneš, J., Šebokova, 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.
- Kodíček, M., Valentová, O., Hynek, R. (2015). *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Koštíř, J. V. (1974). *Biochemie: Vysokoškolská učebnice*. Avicenum, str. 281.
- Krauss, R. M., Burke, D. J. (1982). Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *Journal of lipid research*, 23(1), 97-104.
- Lavie, C. J., Milani, R. V., Verma, A., O'Keefe, J. H. (2009). C-reactive protein and cardiovascular diseases—is it ready for primetime? *The American journal of the medical sciences*, 338(6), 486-492.
- Lee, S. J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoneda, Y. (2003). The structure of importin- β bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science*, 302(5650), 1571-1575.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Malhotra, H. S., Goa, K. L. (2001). Atorvastatin. *Drugs*, 61(12), 1835-1881.

- Mangravite, L. M., Medina, M. W., Cui, J., Pressman, S., Smith, J. D., Rieder, M. J., Krauss, R. M. (2010). Combined influence of LDLR and HMGCR sequence variation on lipid-lowering response to simvastatin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(7), 1485-1492.
- Murre, C., Bain, G., van Dijk, M. A., Engel, I., Furnari, B. A., Massari, M. E., Stuiver, M. H. (1994). Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1218(2), 129-135.
- Nagoshi, E., Imamoto, N., Sato, R., Yoneda, Y. (1999). Nuclear Import of Sterol Regulatory Element-binding Protein-2, a Basic Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper (bHLH-Zip)-containing Transcription Factor, Occurs through the Direct Interaction of Importin β with HLH-Zip. *Molecular biology of the cell*, 10(7), 2221-2233.
- Nair, S. V., Wang, Y. (2013). A New Perspective on the Development of Cholesterol-Lowering Products. *Using Old Solutions to New Problems: Natural Drug Discovery in the 21st Century*, 181.
- Nambiar, D. K., Deep, G., Singh, R. P., Agarwal, C., Agarwal, R. (2014). Silibinin inhibits aberrant lipid metabolism, proliferation and emergence of androgen-independence in prostate cancer cells via primarily targeting the sterol response element binding protein 1. *Oncotarget*, 5(20), 10017-10033.
- Okamoto, K., Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*, 27(3), 282-293.
- Oram, J. F., Lawn, R. M. (2001). ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *Journal of lipid research*, 42(8), 1173-1179.
- Oram, J. F., Yokoyama, S. (1996). Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *Journal of lipid research*, 37(12), 2473-2491.
- Park, H. J., Georgescu, S. P., Du, C., Madias, C., Aronovitz, M. J., Welzig, C. M., Patten, R. D. (2008). Parasympathetic response in chick myocytes and mouse heart is controlled by SREBP. *The Journal of clinical investigation*, 118(1), 259-271.
- Pinto, Y. M., Paul, M., Ganten, D. (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular research*, 39(1), 77-88.
- Poruba, M., Anzenbacher, P., Racova, Z., Oliyarnyk, O., Hüttl, M., Malinska, H., Vecera, R. (2019). The effect of combined diet containing n-3 polyunsaturated fatty

acids and silymarin on metabolic syndrome in rats. *Physiological research*, 68(Suppl 1), S39-S50.

Poruba, M., Kazdová, L., Oliyarnyk, O., Malinská, H., Matušková, Z., Tozzi di Angelo, I. Večeřa, 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(Suppl 4), S507-S512.

Pravenec, M., Kajiya, T., Zídek, V., Landa, V., Mlejnek, P., Šimáková, M., Fan, J. (2011). Effects of human C-reactive protein on pathogenesis of features of the metabolic syndrome. *Hypertension*, 57(4), 731-737.

Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.

Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M. A., Shimomura, I., Mangelsdorf, D. J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes and development*, 14(22), 2819-2830.

Rodrigues, A. C. (2010). Efflux and uptake transporters as determinants of statin response. *Expert opinion on drug metabolism and toxicology*, 6(5), 621-632.

Saller, R., Melzer, J., Reichling, J., Brignoli, R., Meier, R. (2007). An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Complementary Medicine Research*, 14(2), 70-80.

Shimano, H., Horton, J. D., Hammer, R. E., Shimomura, I., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *The Journal of clinical investigation*, 98(7), 1575-1584.

Shimano, H., Horton, J. D., Shimomura, I., Hammer, R. E., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1997a). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *The Journal of clinical investigation*, 99(5), 846-854.

- Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R. E., Herz, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Horton, J. D. (1997b). Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *The Journal of clinical investigation*, 100(8), 2115-2124.
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *The Journal of clinical investigation*, 99(5), 838-845. (b)
- Schmitz, G., Kaminski, W. E., Orsó, E. (2000). ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Current opinion in lipidology*, 11(5), 493-501.
- Schmitz, G., Langmann, T. (2001). Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Current opinion in lipidology*, 12(2), 129-140.
- Sobolová, L., Škottová, N., Večeřa, R., Urbánek, K. (2006). Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharmacological research*, 53(2), 104-112.
- Sone, H., Shimano, H., Shu, M., Nakakuki, M., Takahashi, A., Sakai, M., Nakagawa, Y. (2004). Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 316(3), 790-794.
- Stender, S., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G., Tybjaerg-Hansen, A. (2014). The ABCG5/8 cholesterol transporter and myocardial infarction versus gallstone disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(20), 2121-2128.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005). *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 188.
- Štolba, P., Dobešová, Z., Hušek, P., Opltová, H., Zicha, J., Vrána, A., Kuneš, J. (1992). The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes. *Life sciences*, 51(10), 733-740.
- Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M. (2018). *Farmakologie*. Grada Publishing. 1. vydání.
- Tang, W., Ma, Y., Yu, L. (2006). Plasma cholesterol is hyperresponsive to statin in ABCG5/ABCG8 transgenic mice. *Hepatology*, 44(5), 1259-1266.

- Tremblay, A. J., Lamarche, B., Lemelin, V., Hoos, L., Benjannet, S., Seidah, N. G., Couture, P. (2011). Atorvastatin increases intestinal expression of NPC1L1 in hyperlipidemic men. *Journal of lipid research*, 52(3), 558-565.
- Valenzuela, A., and Garrido, A. (1994). Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological research*, 27, 105-105.
- Večeřa, R., Zacharová, A., Orolin, J., Škottová, N., Anzenbacher, P. (2011). The effect of silymarin on expression of selected ABC transporters in the rat. *Veterinární Medicína*, 56, 59-62.
- Vrána, A., Kazdova, L. (1990). The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplantation proceedings*, 22(6), 2579-2592.
- Vrána, A., Kazdova, L., Dobešová, Z., Kuneš, J., Křen, V., Bila, V., Klimeš, I. (1993). Triglyceridemia, Glucoregulation, and Blood Pressure in Various Rat Strains: Effects of Dietary Carbohydrates a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 683(1), 57-68.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*, 1(8), 945-951.
- Wang, S., Smith, J. D. (2014). ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *Biofactors*, 40(6), 547-554.
- Wellington, C. L. (2004). Cholesterol at the crossroads: Alzheimer's disease and lipid metabolism. *Clinical genetics*, 66(1), 1-16.
- Wessler, J. D., Grip, L. T., Mendell, J., Giugliano, R. P. (2013). The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(25), 2495-2502.
- WHO, World Health Organization. [online] [navštíveno 9. 4. 2020] Dostupné z https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
- Wong, T. Y., Lin, S. M., Leung, L. K. (2015). The flavone luteolin suppresses SREBP-2 expression and post-translational activation in hepatic cells. *PloS one*, 10(8). 1-18.

Wong, J., Quinn, C. M., Brown, A. J. (2004). Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver x receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(12), 2365-2371.

Yabe, D., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12753-12758.

Yu, L. (2008). The structure and function of Niemann–Pick C1-like 1 protein. *Current opinion in lipidology*, 19(3), 263-269.

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.