UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ÚSTAV FARMAKOLOGIE

PŘÍRODNÍ POLYFENOLICKÉ LÁTKY V EXPERIMENTÁLNÍ FARMAKOLOGII METABOLICKÉHO SYNDROMU

DISERTAČNÍ PRÁCE

OLOMOUC 2018 PharmDr. Martin Poruba

PALACKY UNIVERSITY OLOMOUC
FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY
DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY

NATURAL POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY OF METABOLIC SYNDROME

DOCTORAL THESIS

OLOMOUC 2018 PharmDr. Martin Poruba

Prohlašuji, že předkládaná práce je původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Literatura a ostatní zdroje, ze kterých jsem čerpal informace, jsou v práci řádně ocitovány a jejich seznam je uveden v sekci literatura.

V Olomouci ……. ……..

Podpis

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

V Olomouci ……. ……..

Podpis

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Rostislavu Večeřovi, Ph.D. za laskavé vedení mého doktorandského studia. Za jeho cenné rady a připomínky při sepisování publikací a disertační práce. Děkuji prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc. za cenné rady a pomoc s dalším vědeckým směřováním. Dále děkuji přednostovi doc. MUDr. Karlu Urbánkovi, Ph.D. za příjemné pracovní prostředí a podmínky. Mgr. Zuzaně Matuškové, Ph.D. a Mgr. Barboře Liškové, Ph.D. děkuji za prvotní pomoc v laboratoři, za ochotu vysvětlovat metodiku a pomoc se sepisováním publikací. V neposlední řadě děkuji kolegům a kolegyním z pražského pracoviště v IKEM v čele s Ing. Ludmilou Kazdovou, CSc. za inspiraci a pomoc s podáváním grantových žádostí a trpělivou pomoc se sepisováním publikací.

Také děkuji kolegyni Mgr. Ivetě Zapletalové za pomoc a příkladné udržování pořádku v laboratoři.

Na závěr děkuji všem kolegům z ústavu farmakologie a manželce Pavlíně za trpělivost.

Finanční podpora

Práci podpořila Grantová agentura České Republiky (*GAČR 303/13-10813S* a *GAČR 303/17-08888S*) a Vnitřní grantová agentura University Palackého (*IGA UPOL LF_2015_004, IGA UPOL LF_2016_006, IGA UPOL LF_2017_012 a IGA UPOL LF_2018_011*).

OBSAH

1 SEZNAM ZKRATEK 9
2 ÚVOD 11
3 CÍL PRÁCE 13
4 TEORETICKÁ ČÁST 14
4.1 Metabolický syndrom 14
4.2 Diagnostika metabolického syndromu 14
4.3 Léčba metabolického syndromu 15
4.3.1 Ovlivnění hmotnosti u MS 16
4.3.2 Léčiva ovlivňující hladinu cholesterolu 16
4.3.3 Terapie hypertenze 17
4.3.4 Terapie diabetu/hyperglykémie 17
4.3.5 Doplňková léčba metabolického syndromu 17
4.4 Silymarin 18
4.4.1 Složení silymarinu 19
4.4.2 Extrakce silymarinu 19
4.4.3 Využití silymarinu a silybinu 21
4.5 N-3 polynenasycené mastné kyseliny (n-3 PUFA) 22
4.5.1 Biologické účinky EPA a DHA 23
4.6 Význam lipidů pro organismus 25
4.6.1 Homeostáza cholesterolu 25
4.6.2 Mastné kyseliny a triacylglyceroly 32
4.7 Cytochrom P450 35
4.7.1 CYP2E1 36
4.7.2 CYP4A 37
4.7.3 CYP7A1 37
4.8 Zvířecí modely metabolického syndromu 38

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 39
5.1 Zvířata a design experimentů 39
5.1.1 Zvířata 39
5.1.2 Design experimentů 39
5.2 Materiál a metody 40
5.2.1 Přístrojové vybavení 40
5.2.2 Kity 41
5.2.3 Primery 42
5.2.4 Protilátky 42
5.2.5 Chemikálie 42
5.2.6 Spotřební materiál 43
5.3 Metody 43
5.3.1 Real-time PCR 43
5.3.2 Příprava jaterního homogenátu 44
5.4 Lipidové a glykemické parametry 46
5.5 Statistické zpracování 46
6 VÝSLEDKY 47
6.1 Hmotnost zvířat, orgánů, lipidové parametry a glykémie 47
6.1.1 Hmotnost potkanů před dekapitací 47
6.1.2 Hmotnost jater po dekapitaci 48
6.1.3 Triacylglyceroly v séru 50
6.1.4 Celkový cholesterol v séru 51
6.1.5 HDL-cholesterol v séru 53
6.1.6 Neesterifikované mastné kyseliny v séru 54
6.1.7 Glykémie v séru 56
6.1.8 Insulinémie v séru 57
6.1.9 Triacylglyceroly v játrech 59
6.1.10 Cholesterol v játrech 60

6.2 Real-Time PCR 62
6.2.1 Abca1 62
6.2.2 Abcg5 a Abcg8 63
6.2.3 Cyp2e1 65
6.2.4 Cyp4a 66
6.2.5 Cyp7a1 68
6.2.6 Pparα 69
6.2.7 Pparγ 71
6.2.8 Srebf1 72
6.2.9 Srebf2 73
6.2.10 Abcb1a a Abcb1b 75
6.3 Western blot 76
6.3.1 ABCA1 76
6.3.2 ABCG5 a ABCG8 77
6.3.3 CYP2E1 78
6.3.4 CYP7A1 79
6.3.5 ABCB1 81
7 DISKUZE 82
8 ZÁVĚR 89
9 SOUHRN 91
10 SUMMARY 92
11 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ 93
12 LITERATURA 97

1 SEZNAM ZKRATEK

S českým či anglickým výkladem

ABC	ATP-Binding Cassette
ACEi	inhibitory angiotensinkonvertujícího enzymu
ALA	alfa linolenová kyselina
ALT	alaninaminotransferasa
ANOVA	Analysis of Variance
ARB	blokátory receptoru pro angiotensin 2
AST	aspartataminotransferasa
ATP	adenosin trifosfát
ATP III	Adult Treatment Panel III
BMI	Body Mass Index
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CoA	koenzym A
Ct	Cycle of Treshold
Ctrl	kontrola
DHA	dokosahexaenová kyselina
EPA	eikosapentaenová kyselina
FAS	Fatty Acid Synthase
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HDL	High Density Lipoprotein
HHTg	hereditárně hypertriglyceridemický
HL	jaterní lipasa
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktasa
IDL	lipoproteiny o střední hustotě
IL-1B	Interleukin 1β
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	lipoproteinová lipasa
LXR	Liver X Receptor
MDR1	Multi Drug Resistence 1
MK	mastná kyselina
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
MS	metabolický syndrom

MSB	mikronizovaný silybin
MSM	mikronizovaný silymarin
N-3 PUFA	n-3 polynenasycené mastné kyseliny
NEMK	neesterifikované mastná kyselina
NCEP	National Cholesterol Education Program
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1
PCSK9	proprotein konvertasa sublitlisin/kexin typu 9
P-gp	P-glykoprotein
PPARα	jaderné receptory aktivované proliferátory peroxisomů α
PPRE	responsní elementy proliferátorů peroxisomů
PSB	fytosomovaný silybin
PSM	fytosomovaný silymarin
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoid X Receptor
SDS	dodecylsulfát sodný
SREBP	Sterol Elementary Binding Protein
SSB	standardizovaný silybin
SSM	standardizovaný silymarin
STD	standardní laboratorní dieta
TAG	triacylglycerol
TBS	Tris Base Solution
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

2 ÚVOD

Látky přírodního původu se uplatňují zejména v podpůrné léčbě různých nemocí. V případě metabolického syndromu se mohou uplatňovat látky jednak ovlivňující rizikové faktory metabolického syndromu jednak ovlivňující účinek či toxicitu konvenční léčby. Mnohé *in vitro* a *in vivo* studie potvrdily příznivé účinky přírodních látek, ale mnohdy není znám mechanismus jejich působení. Mezi dlouho studované látky patří n-3 polynenasycené mastné kyseliny, mezi něž řadíme zejména kyselinu eikosapentaenovou (EPA) a dokosahexaenovou (DHA). U těchto látek bylo jasně prokázáno příznivé působení na hladinu krevních lipidů, avšak recentní studie na pacientech plně nepotvrdily příznivý vliv na kardiovaskulární a celkovou mortalitu. Další nadějnou a studovanou látkou je silymarin. Směs polyfenolů a flavonoidů získávaná extrakcí ze semen ostropestřce mariánského. Silymarin se celosvětově osvědčil zejména jako hepatoprotektivum a látka s antioxidačním působením. V současné době má silybin – konkrétní látka, jež se nachází v silymarinu použití jako antidotum při otravě muchomůrkou zelenou. Ke konci 20. století se začaly objevovat studie, které potvrzovaly pozitivní vliv silymarinu na lipidové spektrum u různých zvířecích modelů. Na začátku 21. století již byly publikovány první klinické studie, které sledovaly vliv silymarinu na lipidové spektrum a glykémii u pacientů trpících metabolickým syndromem. V současnosti je silymarin užíván zejména pro již výše zmíněné hepatoprotektivní účinky.

Pozitivní účinky jednotlivých látek jsou dobře známy. Na druhou stranu je zde stále spousty otazníků ohledně mechanismu jejich působení. Od objevení jejich pozitivních účinků se započalo také s intenzivním studiem možných účinků na molekulární úrovni, ale žádná studie dosud nepřinesla jednoznačné závěry, které by exaktně vysvětlily, jak tyto látky působí. Tato disertační práce by vedle ověření pozitivních výsledků studovaných látek na zvířecím modelu metabolického syndromu, měla přinést i vysvětlení účinků látek na enzymy, transportéry a různé receptory s velkým významem pro lipidový metabolismus.

Pacienti, kteří pravděpodobně mohou profitovat z podávání silymarinu a n-3 polynenasycených mastných kyselin jsou zejména polymorbidní pacienti s onemocněním nazvaným metabolický syndrom. Tento syndrom je novodobá epidemie charakterizována obezitou, poruchou metabolismu lipidů, hyperglykémií a rizikem kardiovaskulárních chorob. Vzhledem k tomu, že tito pacienti jsou pro zlepšení či udržení svého stavu nuceni užívat kombinace hypolipidemik, antidiabetik

a kardiovaskulárních léčiv, je vhodné hledat doplňky, které pomohou snížit spotřebu užívaných léčiv. Neméně důležitým problémem mohou být nežádoucí účinky standardních léčiv. S počtem užívaných léčiv roste také riziko nežádoucího účinku či lékových interakcí. A právě látky, které mohou snižovat spotřebu léčiv, mohou příznivě ovlivnit riziko vzniku nežádoucího účinku. Navíc látky s antioxidačním a hepatoprotektivním účinkem mohou snižovat riziko vzniku specifických nežádoucích účinků.

Ačkoliv není silymarin běžně doporučován k léčbě hypercholesterolémie či hyperglykémie, může sloužit jako vhodný doplněk ke standardní léčbě. V současné době je v České republice dostupných spousty doplňků stravy s obsahem silymarinu či n-3 polynenasycených mastných kyselin a jsou tedy běžně dostupné pro pacienty. Navíc v případě silymarinu existují také volně prodejná léčiva, která mají oproti doplňkům stravy garantované složení a kvalitu.

3 CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce bylo ověřit účinky silymarinu a silybinu v různých farmaceutických formách na biochemické parametry u modelu metabolického syndromu. Konkrétně se jednalo o to ověřit a porovnat účinnost standardizovaného extraktu, mikronizovaného extraktu a extraktu ve formě fytosomů. Ze sledovaných biochemických parametrů byla sledována hmotnost zvířat, hmotnost jater, koncentrace sérového celkového cholesterolu, HDL cholesterolu, triacylglycerolů (TAG), volných nenasycených mastných kyselin (NEMK), glykémie a inzulinémie. V játrech byl sledován obsah cholesterolu a triacylglycerolů.

Na základě získaných výsledků byl pro následné experimenty vybrán nejvhodnější typ extraktu - mikronizovaný. Cílem následných experimentů bylo ověřit vliv mikronizovaného silymarinu současně podávaného s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami či fenofibrátem.

Dalším neméně významným cílem disertační práce bylo objasnit vliv podávaných látek na transkripci genů a množství proteinu u enzymů, transportérů a transkripčních faktorů důležitých pro transport, metabolismus a regulaci lipidů v játrech HHTg potkana. Konkrétně na úrovni mRNA byly sledovány tyto cíle: ABCA1, ABCB1, ABCG5, ABCG8, CYP2E1, CYP4A1/2/3, CYP7A1, PPARα, PPARγ, SREBF1 a SREBF2. Na úrovni proteinu byly sledovány následující cíle: ABCB1, ABCG5, ABCG8, CYP2E1 a CYP7A1.

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom (MS) neboli syndrom inzulínové rezistence je významný proatherogenní patologický stav, který vede ke zvýšené kardiovaskulární morbiditě a mortalitě. Základním problémem bývá zejména centrální (abdominální) obezita, která má souvislost s inzulínovou rezistencí a často vede k diabetu 2. typu. Inzulínová rezistence společně s hyperinzulínémií, hyperglykémií může vést a v mnoha případech vede k endoteliální dysfunkci, abnormálnímu lipidovému profilu, hypertenzi, zánětu a následné manifestaci aterosklerózy se všemi známými kardiovaskulárními důsledky. O MS lze hovořit jako o epidemii počátku třetího tisíciletí (Reaven, 1988; DeFronzo and Ferrannini, 1991; Lindsay and Howard, 2004; Koh et al., 2005).

Definicí metabolického syndromu existuje celá řada. V roce 2001 byla vydána doporučení National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III) k diagnóze MS (2001). Kritéria byla v roce 2005 upravena, neboť kritéria z roku 2001 nezahrnovala přítomnost poruch glukosy. Nejčastěji je tedy užívána definice dle National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III) z roku 2005 (Alberti et al., 2009).

4.2 Diagnostika metabolického syndromu

Od roku 2005 se dle National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III) potvrzení přítomnosti MS opírá o přítomnost alespoň tří abnormálních hodnot jednotlivých komponent syndromu. Mezi sledovaná kritéria patří centrální obezita s obvodem pasu ≥ 102 cm u mužů a ≥ 88 cm u žen. Muži s obvodem pasu ≥ 94 cm a ženy s obvodem ≥ 80 cm jsou ve zvýšeném kardiovaskulárním riziku. Z laboratorních parametrů pro stanovení diagnózy MS jsou měřeny triacylglyceroly, u nichž za zvýšenou a rizikovou je považována koncentrace ≥ 1,7 mmol/l (150 mg/dl) anebo užívání léčiv snižujících triacylgyceroly, redukovaný HDL-cholesterol u mužů < 1,0 mmol/l (40 mg/dl), u žen < 1,3 mmol/l (50 mg/dl) anebo užívání léčiv zvyšujících HDL a zvýšená lačná glykémie nad hodnotu ≥ 5,6 mmol/l (100 mg/dl) anebo užívání antidiabetik. V diagnostice se dále uplatňuje

zvýšený krevní tlak nad hodnotu 130/85 mm Hg anebo užívání antihypertenziv (Alberti et al., 2009).

Mezinárodní federace diabetu (International Diabetes Federation) v roce 2006 aktualizovala svá diagnostická kritéria, v nichž označila přítomnost centrální obezity za zásadní komponentu MS. V kritériích tedy musí být vždy přítomna centrální obezita s hodnotou obvodu pasu přesahující doporučenou hodnotu v závislosti na etniku (u evropské populace jsou tato kritéria přísnější - muži s obvodem pasu ≥ 94 cm a ženy s obvodem ≥ 80 cm) a následně přítomnost alespoň dvou kritérií z následujících:

- Triaclyglyceroly ≥ 1,7 mmol/l (150 mg/dl) anebo užívání léčiv snižujících TAG;
- HDL-cholesterol u mužů < 1,0 mmol/l (40 mg/dl), u žen < 1,3 mmol/l (50 mg/dl) anebo užívání léčiv zvyšujících HDL;
- Krevní tlak nad hodnotu 130/85 mm Hg anebo užívání antihypertenziv;
- Lačná glykémie nad ≥ 5,6 mmol/l (100 mg/dl) anebo předešlá diagnóza diabetu 2. typu (Alberti et al., 2006).

4.3 Léčba metabolického syndromu

Cílem léčby MS je minimalizovat kardiovaskulární rizika a veškerá rizika vycházející z výše zmíněných kritérií. Základní terapeutické cíle doporučené Adult Treatment Panel III (ATP III) byla definována již v roce 2001 a následně implikována v rámci různých guidelines (2001; Grundy et al., 2004; Rosenzweig et al., 2008). Terapeutické cíle u osob s vysokým kardiovaskulárním rizikem jsou následující:

- BMI < 25 kg/m^2;
- LDL-cholesterol < 2,6 mmol/l (100 mg/dl);
- Non-HDL-cholesterol < 3,4 mmol/l (130 mg/dl);
- Krevní tlak < 140/90 mmHg (u diabetiků < 130/80 mmHg);
- HbA1c < 7 %.

4.3.1 Ovlivnění hmotnosti u MS

Do současnosti nebylo do klinické praxe zavedeno léčivo, které by ovlivnilo veškeré komponenty MS. Z toho důvodu je léčba MS komplexní a léčba vyžaduje využívání kombinací různých léčivých látek. Pro snížení hmotnosti je vhodné volit nefarmakologická opatření, jako je vhodná dieta, cvičení a tělesný pohyb. Případně lze pacientům podávat antiobezitika centrálně působící – phentermin, případně látky inhibující pankreatické lipázy – orlistat.

4.3.2 Léčiva ovlivňující hladinu cholesterolu

Z léčiv ovlivňujících hladinu cholesterolu, lze využít skupinu statinů (např. atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, simvastatin), tedy léčiv inhibujících enzym 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktasu (HMGCR) a tedy *de novo* syntézu cholesterolu v játrech (Istvan and Deisenhofer, 2001). V závislosti na použitém konkrétním zástupci a dávce, statiny snižují hodnotu LDL-cholesterolu o 30 – 63 % (Illingworth et al., 1994; Jones et al., 1998; Rosenson, 2003). Statiny mají schopnost mírně zvyšovat hodnotu HDL-cholesterolu, ale není zde závislost mezi podanou dávkou a změnou HDL-cholesterolu (Barter et al., 2010).

Z ostatních látek jsou k dispozici fibráty (fenofibrát a ciprofibrát), ezetimib, pryskyřice a nově inhibitory PCSK9. Ačkoliv fibráty mají potenciál snižovat LDL-cholesterol i zvyšovat HDL-cholesterol, jejich užívání není v současnosti plně doporučované. Fibráty neovlivňují kardiovaskulární mortalitu a naopak jejich užívání zvyšuje riziko smrti z jakékoliv příčiny (Saha et al., 2007; Jun et al., 2010). Jejich využití je zejména u pacientů trpících hypertriacylglycerolémií a smíšenou dyslipidémií. Častou komplikací léčby fibráty je elevace ALT a AST a samozřejmě trávicí obtíže (Dohmen et al., 2005; Gandhi et al., 2014). Z tohoto důvodu může být vhodné fibráty podávat současně s hepatoprotektivně působícími látkami.

Ezetimib je látka snižující absorpci cholesterolu z potravy, konkrétně inhibuje transportní enzym Niemann-Pick C1 Like 1 protein (NPC1L1) (Xie et al., 2012). Pryskyřice jsou zástupci dalších léčiv působících pouze v trávicím traktu a zabraňují enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin. Žlučové kyseliny vznikají v játrech z cholesterolu za činnosti CYP7A1. Inhibice jejich reabsorpce vede k jejich zvýšené syntéze a eliminaci cholesterolu játry (Shepherd et al., 1979; Davidson et al., 1999).

Poslední zmiňovanou skupinou jsou inhibitory PCSK9. Jedná se o inhibitory proprotein konvertázy subtilisin/kexin 9 (PCSK9), která je odpovědná za degradaci LDL receptoru. Inhibice PCSK9 vede ke zvýšené expresi LDL receptoru a zvýšené vychytávání LDL-cholesterolu játry (Zhang et al., 2007; Lo Surdo et al., 2011; Mullard, 2012).

4.3.3 Terapie hypertenze

Obecně pro léčbu hypertenze jsou užívána antihypertenziva, z nichž lze volit mezi základními i doplňkovými. Mezi základní lze řadit thiazidová diuretika, inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi), případně blokátory receptorů pro angiotenzin 1 (ARB), betablokátory, anebo blokátory vápníkových iontových kanálů. V této práci je antihypertenzní terapie pouze zmíněna, protože v rámci disertační práce není hypertenze řešena.

4.3.4 Terapie diabetu/hyperglykémie

U poruch glukózové tolerance a diabetu patří metformin k léčivům volby, není-li kontraindikován (Knowler et al., 2002; Ratner et al., 2008). Při nedostatečném účinku lze k metforminu anebo místo metforminu využít antidiabetikum z jiné skupiny. Cílem terapie hyperglykémie není pouze ovlivnění glykémie samotné, nýbrž především ovlivnění mortality.

4.3.5 Doplňková léčba metabolického syndromu

Ačkoliv farmakoterapie by měla sloužit jako doplněk úpravy jídelníčku a vhodné pohybové aktivity, je často vnímána jako základ léčby, k níž jsou využívány další možnosti. K těmto možnostem můžeme řadit různá nutraceutika, která mohou u predisponujících stavů zpomalit případně zastavit propuknutí nemoci, anebo mohou sloužit jako vhodný doplněk farmakoterapie.

Mezi nutraceutika vhodná u pacientů s metabolickým syndromem můžeme řadit silymarin, n-3 polynenasycené mastné kyseliny a samozřejmě další látky.

V úvodu této práce se zaměřím zejména na silymarin a n-3 polynenasycené mastné kyseliny.

4.4 Silymarin

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) z čeledi *Asteraceae*, je jednoletá případně dvouletá rostlina původem ze středomoří a severní Afriky, která je využívána především pro své plody a semena (Khan et al., 2009). Existuje fialově kvetoucí varianta, která obsahuje od taxifolinu odvozené flavonolignany s hydroxylovou skupinou na pozici C-3 a bíle kvetoucí varianta s flavonolignany bez hydroxylové skupiny na pozici C-3 (Biedermann et al., 2014; Chambers et al., 2017).

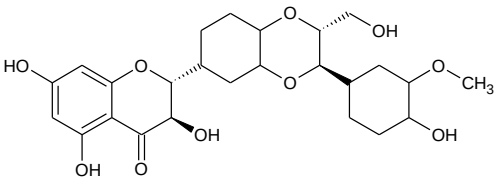
Obrázek č. 1: Nákres rostliny ostropestřce mariánského. Volná licence Wikipedia

4.4.1 Složení silymarinu

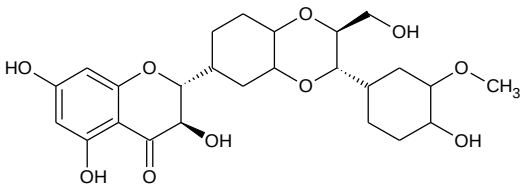
Plod ostropestřce obsahuje pouze jedno semeno, v němž se nachází směs flavonolignanů a polyfenolů nazývaných silymarin a dále tuky (Wallace et al., 2003; Rainone, 2005; Khan et al., 2009; Kuki et al., 2012; Graf et al., 2016; Chambers et al., 2017). Mezi nejvíce zastoupené flavonolignany patří silybin, který se vyskytuje ve formě dvou stereoisomerů (A a B) a tvoří až 70 % silymarinu. Z dalších se ještě v silymarinu nachází isosilybin, silychristin, silydianin, silymonin, isosilychristin, cisilybin, isocisilybin a další. Lipidy tvoří až 22 % obsahu semen ostropestřce a svým složením jsou obdobné ostatním rostlinným olejům (Hassan El-Mallah et al., 2003). Olej je bohatý na obsah vitamínu E, kyseliny linolenové, kyseliny olejové a terpeny, např. α-pinen, který nalezl své využití v rostlinných směsích pro léčbu chorob žlučníku či ledvin (Malekzadeh et al., 2011; Mhamdi et al., 2016).

4.4.2 Extrakce silymarinu

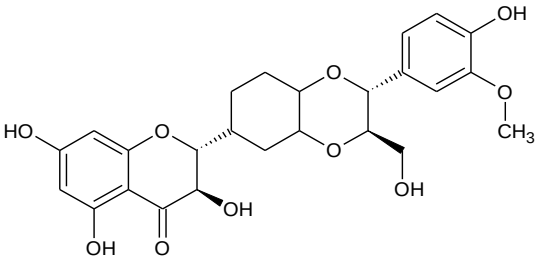
Silymarin je obvykle získáván extrakcí po rozemletí plodů ostropestřce, ale může být také získán z celé rostliny (El Sherif et al., 2013). Množství silymarinu a zastoupení jednotlivých jeho složek se může významně lišit v závislosti na několika faktorech. Mezi významné faktory ovlivňující výnos silymarinu patří zvolený kultivar rostliny, podnebí, vlastnosti půdy, čas setí, závlaze, hnojení a času sklizně (Martin et al., 2006; Radjabian and Fallah Huseini, 2010; Poppe and Petersen, 2016). Dalším významným faktorem ovlivňujícím množství získaného silymarinu a jeho kompozici je metoda extrakce. Během klasické metody extrakce je nejprve rostlinný materiál zbaven tuků pomocí nepolárních rozpouštědel jako je hexan či petrolether a následně je silymarin extrahován pomocí ethylacetátu, methanolu či acetonu. Existují také mnohé zjednodušené metody např. za zvýšeného tlaku či za použití automatizovaných extraktorů (Wianowska and Wisniewski, 2015; AbouZid et al., 2016). Velikost rozemletých částic může významně měnit zastoupení jednotlivých složek silymarinu. Při rozemletí semen až na nanočástice lze získat vyšší procentuální zastoupení silychristinu, silydianinu, silybinu A, silybinu B a isosilybinu B, ale menší množství isosilybinu A, než v případě rozemletí semen na standardní velikost (Saleh et al., 2015).



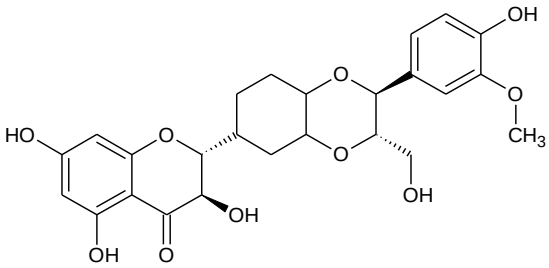
Silybin A



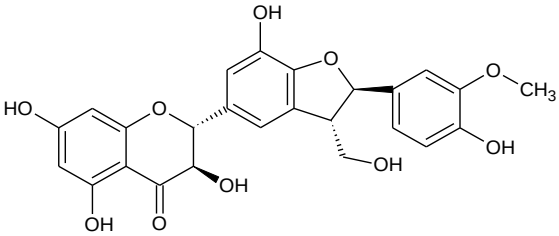
Silybin B



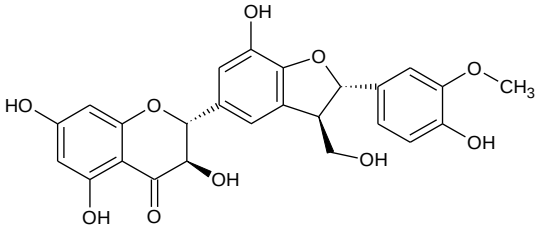
Isosilybin A



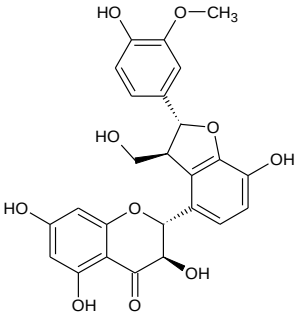
Isosilybin B



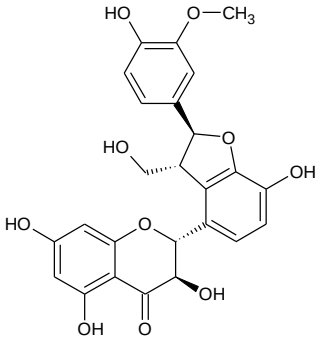
Silychristin A



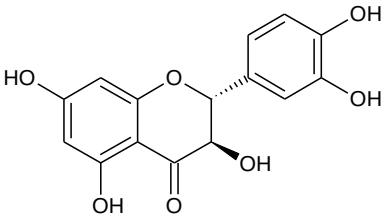
Silychristin B



Isosilychristin A



Isosilychristin B



Taxifolin

Obrázek č. 2: Strukturní vzorce silybinu A a B, isosilybinu A a B, silychristinu A a B, isosilychristinu A a B a taxifolinu.

4.4.3 Využití silymarinu a silybinu

Ostropestřec mariánský, silymarin i silybin mají své nezastupitelné místo jak v lidovém léčitelství, tak také v moderní medicíně. Již po staletí je ostropestřec využíván pro léčbu trávicích poruch. Silymarin je současnou medicínou využíván jako hepatoprotektivum při různých poškozeních jater. Například u nealkoholického ztučnění jater užívání silymarinu v kombinaci s dalšími látkami vede k významné redukci markerů poškození jater a k úpravě insulinové rezistence (Loguercio et al., 2007; Loguercio et al., 2012). Na druhou stranu při alkoholickém poškození jater užívání silymarinu nepřináší významné klinické zlepšení těchto pacientů (Pares et al., 1998; Lucena et al., 2002).

Jaterní poškození mohou způsobovat mnohé viry, např. virus hepatitidy C (HCV). Před nástupem moderních antivirotik, intravenózní podávání silybinu vedlo ke klinickému zlepšení u pacientů neodpovídajících na kombinovanou léčbu pegylovaného interferonu a ribavirinu u hepatitidy C (Ferenci et al., 2008). Podobné pozitivní výsledky byly zaznamenány u pacientů s hepatitidou C po transplantaci jater (Ferenci and Beinhardt, 2013).

Asi nejznámější využití silymarinu/silybinu je při terapii otrav různými hepatotoxickými látkami. Silybin v intravenózní lékové formě je v tomto směru využíván při otravě muchomůrkou zelenou – naše nejjedovatější houba (Roberts et al., 2013). Silymarin působí pozitivně také u otrav různými chemickými látkami či léčivy, např. tetrachlormethanem anebo paracetamolem (Jia et al., 2013; Papackova et al., 2018).

Pokusy na animálních modelech prokázaly u silymarinu hypolipidemické vlastnosti (Skottova and Krecman, 1998; Skottova et al., 2003), na druhou stranu se zatím nepodařilo hypolipidemické účinky plně potvrdit u pacientů s diabetem mellitem 2. typu (Voroneanu et al., 2016). Naproti tomu užívání silymarinu u diabetiků 2. typu vedlo k signifikantnímu poklesu lačné glykémie (Voroneanu et al., 2016).

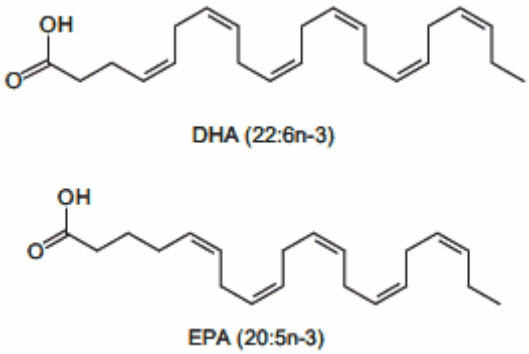
Problémem silymarinu i silybinu je jejich obtížná rozpustnost ve vodě a následná nízká biologická dostupnost. Z tohoto hlediska je na tom nejhůře standardizovaný extrakt silymarinu bez následných farmaceutických úprav. Při použití náročnějších farmaceutických forem jako je mikronizace lze biologickou dostupnost zvýšit.

4.5 N-3 polynenasycené mastné kyseliny (n-3 PUFA)

Jedná se o organické látky s karboxylovou skupinou a dlouhým řetězcem, které mohou být rostlinného i živočišného původu, zejména z ryb (Friedman and Moe, 2006; Whelan and Rust, 2006; Namiki, 2007). Z chemického hlediska jsou to látky s délkou 16 až 24 uhlíků obvykle se třemi až šesti dvojnými vazbami. Typická konfigurace dvojných vazeb je *cis*. K významným kyselinám patří alfa-linolenová (ALA), eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová kyselina (DHA).

Zájem o studium jejich účinků začal narůstat po publikování výsledků studie zabývající se závislostí stravy a incidence kardiovaskulárních chorob u Eskymáků (Sinclair, 2007). Od té doby byly u n-3 polynenasycených mastných kyselin objeveny mnohé příznivé účinky na lidské zdraví.

N-3 polynenasycené mastné kyseliny jsou po perorálním podání vstřebávány ve formě triacylglycerolů a následně transportovány jako součást chylomikronů do jater. Z jater jsou následně uvolňovány stále ve formě triacylglycerolů do lipoproteinových částic a také jako plasmatické fosfolipidy. Menší část je uvolněna jako neesterifikované mastné kyseliny ve formě vázané na albumin. Během cirkulace v krevním řečišti se n-3 PUFA inkorporují do plasmatických membrán všech buněk a uskladňují do tukové tkáně. Maximum inkorporace mastných kyselin bývá dosaženo již během 14 dní (Masson et al., 2007). Ačkoliv nejčastěji jsou pozitivní účinky připisovány zejména EPA a DHA i ostatní n-3 polynenasycené mastné kyseliny mohou příznivě působit na lidské zdraví. Na druhou stranu se v rybím oleji nachází v minimálním množství. EPA může být také přeměňována na biologicky aktivní prostaglandin E3 - prozánětlivě a proagregačně působící eikosanoid. Částečně se EPA může metabolizovat na DHA zejména u těhotných žen (Burdge and Calder, 2005). Ačkoliv pro vývoj mozku se zdá být DHA důležitější, studie zatím neodpověděly na to, jaký je ideální poměr EPA k DHA (Martinez, 1992; Lewin et al., 2005; McCann and Ames, 2005).



Obrázek č. 3: eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová (DHA) kyselina.

4.5.1 Biologické účinky EPA a DHA

4.5.1.1 Vliv na kardiovaskulární rizikové faktory

Pozitivní účinky EPA a DHA se projevují v průběhu několika týdnů jejich pravidelné konzumace. Účinky pravděpodobně vyplývají ze změn fluidity plazmatických membrán a ovlivnění receptorové odpovědi (Harris and Bulchandani, 2006; Mozaffarian et al., 2006a).

4.5.1.2 Plazmatické lipidy

Pravidelná konzumace rybího oleje snižuje plazmatické koncentrace triacylglycerolů podobně jako ostatní hypolipidemika o 25 až 30 % (Harris, 1997; Wang et al., 2004; Balk et al., 2006). Vliv na triacylglyceroly je lineárně závislý na dávce. Dle meta-analýzy každý 1 gram rybího oleje bohatého na EPA a DHA snižuje triacylglyceroly o 0,07 mmol/l (5,9 mg/dl) (Mozaffarian et al., 2006b). Rybí olej také zvyšuje plazmatické koncentrace HDL-cholesterolu (+ 3 %) a také zvyšuje LDL-cholesterol (+ 5 %), ale bez znatelného zvýšení počtu cirkulujících částic. Toto zvýšení koncentrace LDL-cholesterolu je pravděpodobně způsobeno zvětšením LDL částic (Friedberg et al., 1998; Minihane et al., 2000; Griffin et al., 2006).

4.5.1.3 Tlak krve a cévní rezistence

Na základě klinických studií snižuje rybí olej bohatý na EPA a DHA systolický krevní tlak o 1,52 mmHg a diastolický tlak o 0,99 mmHg. Tlak je snižován jednak u pacientů s hypertenzí, tak také s normotenzí. Nejvyšší účinek je dosahován u dosud neléčených hypertenzních pacientů s poklesem systolického krevního tlaku o 4,51 mmHg a diastolického o 3,05 mmHg (Miller et al., 2014).

Animální a observační studie naznačují, že pokles krevního tlaku je způsoben snížením periferního cévního odporu bez významného vlivu na srdeční výdej. N-3 polynenasycené mastné kyseliny zvyšují produkci oxidu dusnatého, který působí relaxaci hladké svaloviny cév (Demaison et al., 2000; Omura et al., 2001; Mozaffarian et al., 2006a).

4.5.1.4 Tepová frekvence a kontrola rytmu

EPA a DHA snižují také srdeční frekvenci průměrně o 1,6 úderů za minutu. Negativně chronotropní efekt je nejvýraznější při dlouhodobé konzumaci rybího oleje. U studií trvajících déle než 12 měsíců došlo k průměrnému snížení tepové frekvence o 2,5 úderů za minutu (Mozaffarian et al., 2005). Vliv rybího oleje na tepovou frekvenci se nezdá být závislý na podané dávce, ale minimální denní dávka pro vyvolání účinku je 300 mg EPA a DHA (Mozaffarian et al., 2005; Mozaffarian et al., 2006a).

Mechanismus účinku, kterým n-3 polynenasycené mastné kyseliny snižují klidovou tepovou frekvenci, je pravděpodobně založen na ovlivnění funkce iontových kanálů (Billman et al., 1997; McLennan, 2001; Leaf et al., 2003). Také pravděpodobně EPA a DHA mohou zvyšovat tonus nervu vagu a tím nepřímo snižovat tepovou frekvenci (O'Keefe et al., 2006).

Na animálních modelech a tkáňových kulturách byly objeveny přímé inhibiční účinky na iontové kanály, které vedou ke snížení excitability srdeční svaloviny (Kang and Leaf, 2000; McLennan, 2001; Sarrazin et al., 2007).

4.5.1.5 Ovlivnění hemokoagulace

Vysoké dávky rybího oleje (3 až 15 g za den) prodlužují dobu krvácení, ale nemají vliv na závažné krvácení pacientů (Knapp et al., 1986). Nebyla nalezena ani významná souvislost mezi užíváním rybího oleje spolu s warfarinem či kyselinou acetylsalicylovou a zvýšeným rizikem závažného krvácení (Wang et al., 2006).

4.5.1.6 Ovlivnění zánětu

Vyšší denní dávky EPA a DHA (2 g) mohou snižovat produkci prozánětlivých cytokinů Interleukin-1 beta (IL-1β) a tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNFα), avšak bez významného vlivu na koncentraci C-reaktivního proteinu (James et al., 2000; Wang et al., 2004; Robinson and Stone, 2006).

4.6 Význam lipidů pro organismus

Lipidy jsou obvykle vnímány v negativním světle, ačkoliv mají v organismu nezastupitelné úlohy. Mezi lipidy řadíme cholesterol, triacylglyceroly, fosfolipidy, mastné kyseliny a další. Jedná se o látky těžce rozpustné v hydrofilních rozpouštědlech a velmi dobře rozpustné v rozpouštědlech nepolárních. V organismu zastávají spoustu úloh. Jednak slouží jako zdroj energie, chrání vnitřní orgány, jsou složkou plazmatických membrán, slouží také jako signální molekuly a mohou se metabolizovat na další důležité látky. Např. v játrech jsou z cholesterolu syntetizovány žlučové kyseliny, které jsou cestou žluči uvolňovány do trávicího traktu a jejich důležitou úlohou je emulgace tuků z potravy. Dále jsou z cholesterolu syntetizovány steroidní hormony: estradiol, testosteron, kortisol a aldosteron.

4.6.1 Homeostáza cholesterolu

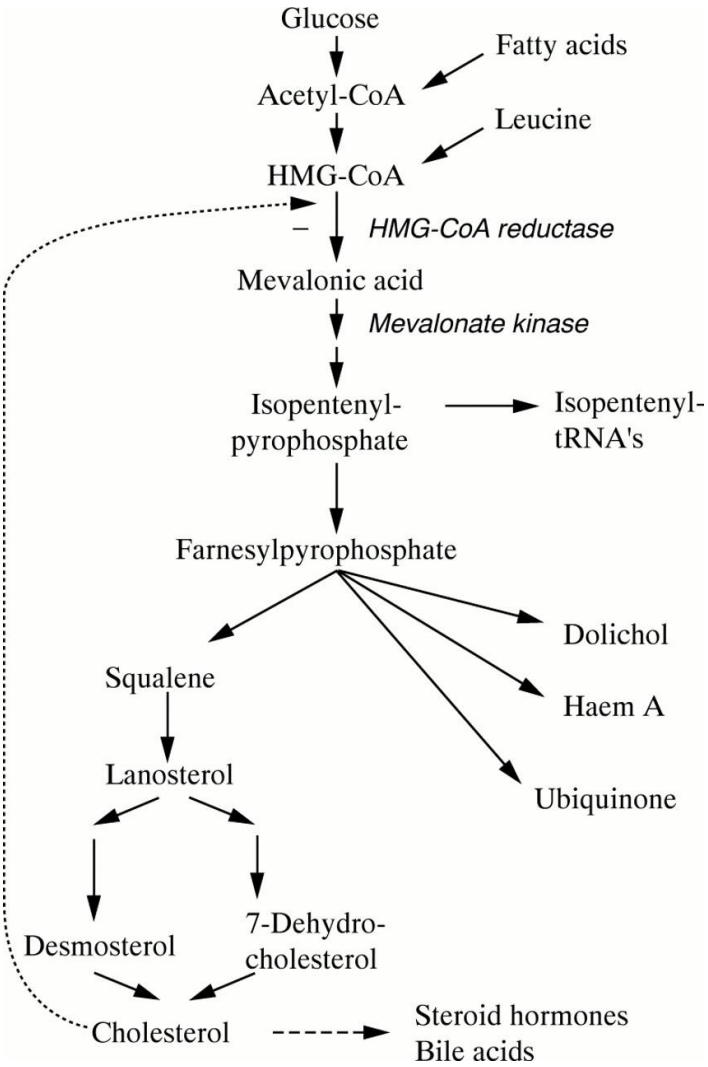
Homeostáza cholesterolu je v organismu udržována jako rovnováha mezi jeho příjmem, *de novo* syntézou a jeho eliminací (Davis et al., 2004).

4.6.1.1 Absorpce cholesterolu

Cholesterol přijímaný potravou je absorbován zejména v jejunu a proximálním ileu. Vzhledem k tomu, že cholesterol je špatně rozpustný ve vodě, je zapotřebí přítomnost žlučových kyselin, které umožní kontakt cholesterolu s kartáčovým lemem enterocytů (Hofmann and Borgstroem, 1964). V kartáčovém lemu enterocytů se nachází transportní protein Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), který se podílí na absorpci cholesterolu (Altmann et al., 2004). U člověka a primátů se NPC1L1 navíc nachází také na kanalikulární membráně hepatocytů, kde se podílí na reabsorpci cholesterolu ze žluči (Temel et al., 2007). Absorpce cholesterolu z tenkého střeva je snižována heterodimerním transportním proteinem z rodiny ATP-Binding Cassette ABCG5 a ABCG8 (Yu et al., 2002; Yu et al., 2014). Stejné transportéry se nachází také na kanalikulární membráně hepatocytů a jejich role je exkrece cholesterolu do žluči.

4.6.1.2 *De novo* syntéza cholesterolu

Cholesterol je životně důležitá látka, bez níž se organismus neobejde. Na druhou stranu není esenciální a v játrech dochází k jeho syntéze. Syntéza cholesterolu začíná kondenzací dvou molekul acetylkoenzymu A, následována několika enzymatickými reakcemi. Rychlost syntézy limitujícím enzymem je 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktasa (HMGCR). Následně dochází k několika reakcím, z nichž klíčovou je demethylace na pozici C14 katalyzovaná CYP51A (Waterman and Lepesheva, 2005).



Obrázek č. 4: Schématické znázornění endogenní syntézy cholesterolu v játrech (Clayton, 1998).

4.6.1.3 Distribuce lipidů

Lipidy jsou převážně lipofilní povahy, a proto se v rámci organismu musí distribuovat vázané v lipoproteinech. Jednotlivé lipoproteiny se liší svou velikostí a také obsahem transportovaných látek.

4.6.1.3.1 Chylomikrony

Jedná se o největší plazmatické lipoproteiny, jejichž úlohou je transport lipidů z enterocytů do jater. Majoritní složku tvoří triacylglyceroly (až 85 %) z potravy. Poměr cholesterolu k triacylgylcerolům v chylomikronech je méně než 1:10.

Životnost chylomikronů je omezena a u normolipidemických jedinců setrvávají v plazmě cca 3-6 hodin. Setrvání chylomikronů u potkana je velmi krátká, řádově v minutách (Moir and Zammit, 1992). Zásadní význam pro životnost chylomikronů má lipoproteinová lipasa (LPL). Jedná se o enzym, jehož úlohou je enzymatická hydrolýza triacylglycerolů a uvolněné mastné kyseliny jsou následně transportovány do okolních tkání, zejména srdeční svaloviny, příčně pruhovaného svalstva a tukové tkáně (Chajek et al., 1978; Mead et al., 2002). Pro správnou funkci LPL je zapotřebí přítomnost apolipoproteinu apoC-II a jeho nepřítomnost vede k hypertriglyceridémii, xantomům a ke zvýšenému riziku pankreatitidy již v dětském věku (Breckenridge et al., 1978; Goldberg et al., 1990).

4.6.1.3.2 Remnanty chylomikronů

Lipolýza chylomikronů lipoproteinovou lipasou je prvním krokem jejich metabolismu a vede ke vzniku chylomikronových remnant (Mjos et al., 1975). Tímto krokem se z chylomikronů odstraní veškeré triacylglyceroly a zůstává cholesterol z potravy. Vytvořená remnanta jsou velmi rychle odstraňována z plazmy pomocí receptorem mediovaného transportu. Chylomikronové zbytky jsou nejprve zpracovány hepatální lipasou (HL) a pomocí apo-E se remnanta navážou na LDL-receptor (Mahley and Huang, 1999; Herz and Strickland, 2001).

4.6.1.3.3 Lipoproteiny s velmi malou hustotou (VLDL)

Jedná se o relativně velké částice tvořené játry, které jsou bohaté na obsah triacylglycerolů.

4.6.1.3.4 Lipoproteiny s malou hustotou (LDL)

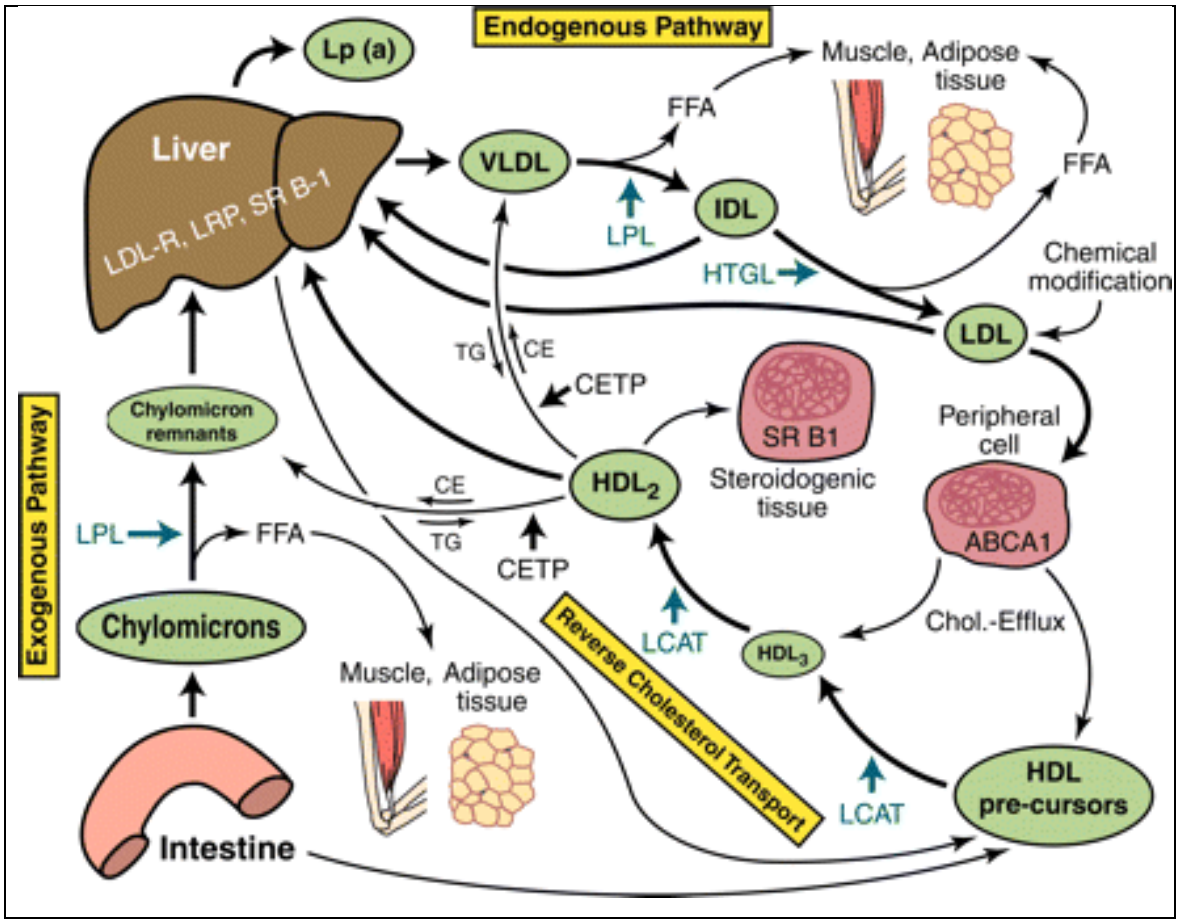
LDL cholesterol je částice cirkulující v krevním řečišti, jejíž úlohou je transport cholesterolu do místa potřeby v periferních tkáních. Vzhledem k tomu, že lipidy obecně včetně cholesterolu jsou nerozpustné ve vodě, musí být transportovány ve formě lipoproteinových částic (Hevonoja et al., 2000). LDL částice jsou tvořeny

fosfolipidovou dvouvrstvou, neesterifikovaným i esterifikovaným cholesterolem a estery mastných kyselin. Ve fosfolipidové membráně je vnořený apo-B lipoprotein, který umožňuje vazbu LDL na specifické receptory (Feingold and Grunfeld, 2000). LDL částice jsou vytvářeny z IDL částic za pomocí hepatální liaszy (HL). Část LDL následně vstupuje do jater pomocí vazby na LDL-receptor (Cox and Garcia-Palmieri, 1990).

4.6.1.3.5 Lipoproteiny s velkou hustotou (HDL)

Jedná se o skupinu lipoproteinů, které mají společnou vysokou hustotu (> 1,063 g/ml) a malou velikost (5–17 nm) (von Eckardstein et al., 1994). Základním proteinem nutným pro zformování HDL částic je apolipoprotein A1 (apoA-1). Částice bez obsahu lipidů jsou tvořeny hepatocyty, enterocyty, případně mohou vznikat při metabolismu chylomikronů či VLDL částic (Rye et al., 1999). Rolí lipoproteinů o velké hustotě bez obsahu lipidů je tzv. reversní transport cholesterolu. Jedná se o cestu cholesterolu z nejaterní tkáně (periferních orgánů) do jater, případně steroidy syntetizujících tkáním (Yokoyama, 1998). Pro formování HDL částic a translokaci cholesterolu mají význam ABC transportéry. Konkrétně se jedná o ABCB1 (známý jako MDR1 či P-glykoprotein) a ABCA1 (Garrigues et al., 2002; Du et al., 2015).

Cholesterol a fosfolipidy jsou následně pomocí receptory mediovaného transportu přenášeny do jater (Fidge, 1999; Trigatti et al., 2000).



Obrázek č. 5: Schématické znázornění metabolismu lipoproteinových částic (Kwan et al., 2007).

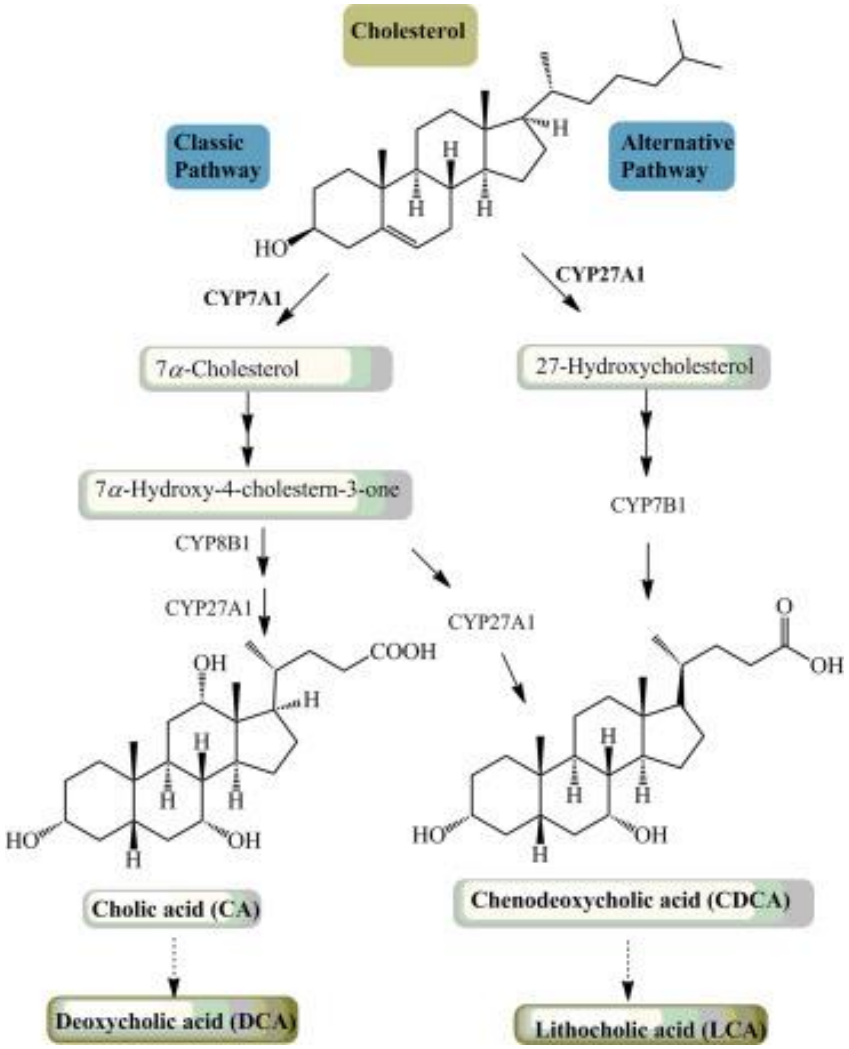
4.6.1.4 Eliminace cholesterolu

V organismu existuje několik cest eliminace cholesterolu. K eliminaci počítáme jednak exkreci, tak také jeho metabolismus. Exkrece probíhá pomocí transportéru ABCG5/8 na úrovni tenkého střeva a jater. Cestou ABC transportérů je vylučován neesterifikovaný cholesterol, zatímco jiné cesty zahrnují jeho metabolismus. Jednou z nejvýznamnějších cest je metabolismus cholesterolu na žlučové kyseliny. Žlučové kyseliny jsou tělu vlastní látky, jejichž úlohou je nejenom emulgace tuků, usnadnění jejich trávení a vstřebávání, ale také figurují jako signální molekuly (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang et al., 1999).

Pro syntézu žlučových kyselin je u člověka potřeba celkem 14 enzymů, které se všechny nacházejí v játrech (Russell, 2003). Prvním a rychlost syntézy limitujícím enzymem je CYP7A1 neboli 7α-cholesterolhydroxylasa. Jak již název napovídá, rolí enzymu je oxidace (hydroxylace) uhlíku ve struktuře cholesterolu na pozici 7.

Alternativní cesta syntézy žlučových kyselin je iniciována enzymem CYP27A1 (Duane and Javitt, 1999). Alternativní cesty biosyntézy žlučových kyselin přebírají úlohu zejména při supresi klasické cesty iniciované CYP7A1 (Pullinger et al., 2002). Klasická cesta se podílí na denní eliminaci cca 400-600 mg cholesterolu, naopak alternativní zhruba 18-20 mg denně (Dietschy, 1984; Duane and Javitt, 1999). Existují samozřejmě i další mimojaterní cesty syntézy žlučových kyselin, např. iniciované CYP7B1, CYP46A1 (Martin et al., 1997; Björkhem et al., 1998; Lund et al., 1999; Björkhem et al., 2001).

Další možný způsob eliminace cholesterolu zahrnuje jeho přeměnu na steroidní hormony. Ačkoliv je tato cesta méně významná z hlediska spotřeby cholesterolu (cca 50 mg denně), tvoří cholesterol základ všech steroidních hormonů (Dietschy, 1984).



Obrázek č. 6: Grafické znázornění klasické a alternativní cesty syntézy žlučových kyselin (Kwong et al., 2015).

4.6.1.5 Regulace homeostázy cholesterolu a mastných kyselin

Syntéza, absorpce i eliminace cholesterolu je v organismu přísně kontrolována. Na regulaci syntézy se podílejí tzv. sterol regulatory element binding proteins (SREBPs). Tyto transkripční faktory byly objeveny v devadesátých letech minulého století a od tohoto okamžiku byly intenzivně studovány. Podílejí se na kontrole exprese genů důležitých pro metabolismus lipidů. U savců byly popsány celkem tři zástupci této skupiny, SREBP-1a a SREBP-1c kódované jedním genem Srebf1 a SREBP-2 kódovaný Srebf2 (Hua et al., 1995; Miserez et al., 1997). Při srovnání je SREBP-1a účinnější transkripční aktivátor než SREBP-1c a liší se také tkáňovou distribucí (Shimano et al., 1997; Shimomura et al., 1997).

Úlohou SREBP-1a je zejména regulace exprese genů pro důležité enzymy syntézy cholesterolu a mastných kyselin, jako je 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthasa, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktasa, squalen synthasa a např. synthasa mastných kyselin (Shimano et al., 1996). Na druhou stranu SREBP-1c kontroluje geny zejména pro lipogenezi bez významného vlivu na syntézu cholesterolu a má také úlohu v metabolismu glukosy (Shimano et al., 1997). Poslední zmiňovaný SREBP-2 reguluje zejména transkripci genů důležitých pro steroidogenezi (Horton et al., 1998).

Ačkoliv samotné SREBP regulují expresi různých genů, sami jsou regulovány na transkripční a posttranskripční úrovni. Zatímco SREBP-1a se zdá být v játrech a ostatních tkáních konstitutivně exprimován, exprese SREBP-1c a SREBP-2 je zpětnovazebně regulována (Sato et al., 1996; Shimomura et al., 1997; Amemiya-Kudo et al., 2000). Za zmínku stojí regulace SREBP-1c pomocí insulinu, glukagonu a liver X receptoru (LXR), který tvoří heterodimery s retinoid X receptorem (RXR) a je aktivovaný různými steroly (Janowski et al., 1999; DeBose-Boyd et al., 2001; Repa et al., 2002).

4.6.2 Mastné kyseliny a triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou estery mastných kyselin a glycerolu s velkým významem pro živé organismy, ale jsou také spojovány s mnohými onemocněními, např. metabolickým syndromem. Vzhledem k tomu, že se jedná o nepostradatelné látky, je zapotřebí mechanismů, které udržují jejich homeostázu v organismu.

4.6.2.1 Absorpce mastných kyselin a triacylglycerolů

Ačkoliv jsou triacylglyceroly přijímány potravou, nemohou být ve své esterové podobě absorbovány. Pro absorpci lipidů z potravy mají velký význam žlučové kyseliny, které emulgují tuky a pankreatická lipasa, jež hydrolyzuje esterové vazby triacylglycerolů (Chapus et al., 1988). V enterocytech jsou triacylglyceroly opět resyntetizovány a spolu s cholesterolem jsou formovány do tzv. chylomikronů, které se dostávají krevní cestou do jater. Následně jsou široce distribuovány po celém organismu.

4.6.2.2 Syntéza mastných kyselin

Mastné kyseliny jsou syntetizovány v játrech především za účasti synthasy mastných kyselin (FAS), jejíž úlohou je syntéza nasycených mastných kyselin ze základních surovin acetyl-CoA a malonyl-CoA (Volpe and Vagelos, 1973).

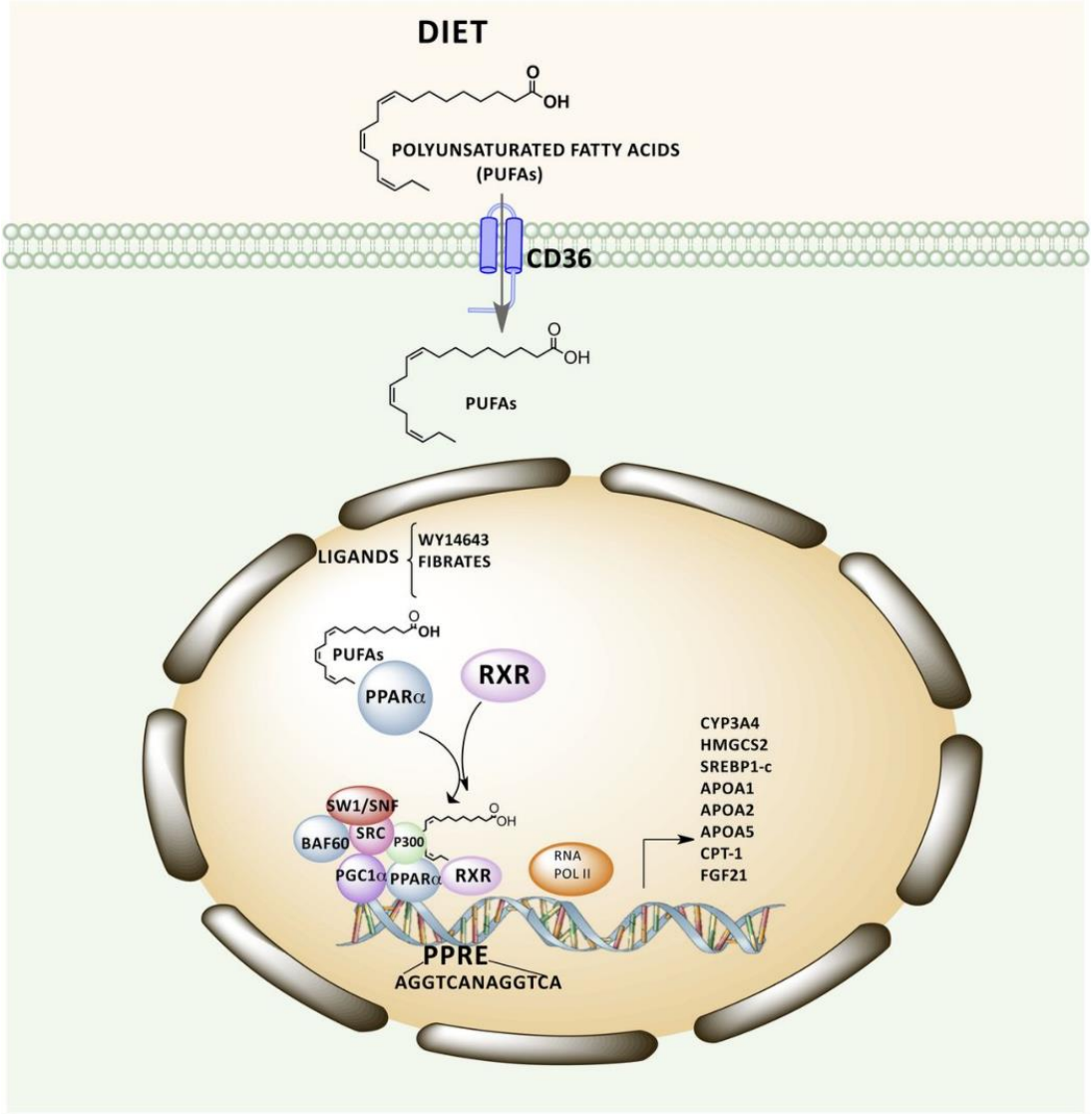
4.6.2.3 Metabolismus mastných kyselin a triacylglycerolů

Velmi důležitým enzymem v katabolismu triacylglycerolů a mastných kyselin je lipoproteinová lipasa, jež hydrolyzuje TAG uvnitř chylomikronů a lipoproteinů o velmi malé hustotě (VLDL) (Mead et al., 2002). Následně jsou mastné kyseliny transportovány přenašeči do buněk a následně použity pro syntézu triacylglycerolů, fosfolipidů, esterifikaci cholesterolu anebo jsou metabolizovány v mitochondriích a peroxisomech pomocí beta-oxidace (Doege and Stahl, 2006). Během β-oxidace dochází k cyklické metabolizaci mastných kyselin a při každém cyklu je MK zkrácena za vzniku acetyl-CoA, acyl-CoA a energie (Houten and Wanders, 2010).

Minoritně se mastné kyseliny mohou metabolizovat procesem ω-oxidace, který nabývá významu zejména při hladovění, při terapii léčivy indukujícími PPARα a některých metabolických nemocí. Tato cesta vede ke vzniku sukcinátu, který může sloužit pro syntézu glukosy (Draye and Vamecq, 1989). Enzymaticky se uplatňují cytochromy P450 4A11 u člověka a CYP4A1/2/3 u potkana (Hsu et al., 2007).

4.6.2.4 Regulace enzymů v metabolismu mastných kyselin a triacylglycerolů

Veškeré enzymy zasahující do syntézy a metabolismu MK a TAG musejí být přísně regulovány. Syntéza MK je regulována podobně jako syntéza cholesterolu pomocí SREBP-1c a SREBP-2, z nichž SREBP-1c je nadále regulován pomocí insulinu, glukagonu a Liver X receptoru (Repa et al., 2000; DeBose-Boyd et al., 2001). Metabolismus je řízen za pomocí jaderných receptorů aktivovaných proliferátory peroxisomů (PPAR). Byly popsány čtyři odlišné skupiny označované řeckými písmeny. Pro metabolismus MK a TAG má největší význam PPAR alfa, jež tvoří heterodimery s RXR a následně se váže na responsní elementy proliferátorů peroxisomů (PPRE) a aktivuje následně transkripci cílových genů (Qi et al., 2002; Tan et al., 2005). PPARα aktivují nejenom lipoproteinovou lipasu, ale také řadu dalších enzymů katalyzujících mitochondriální i peroxisomální oxidaci mastných kyselin. Aktivace PPARα může také vést k up-regulaci CYP4A11 u lidí a CYP4A1/2/3 u potkana, které se podílejí na ω-oxidaci mastných kyselin (Sharma et al., 1988).

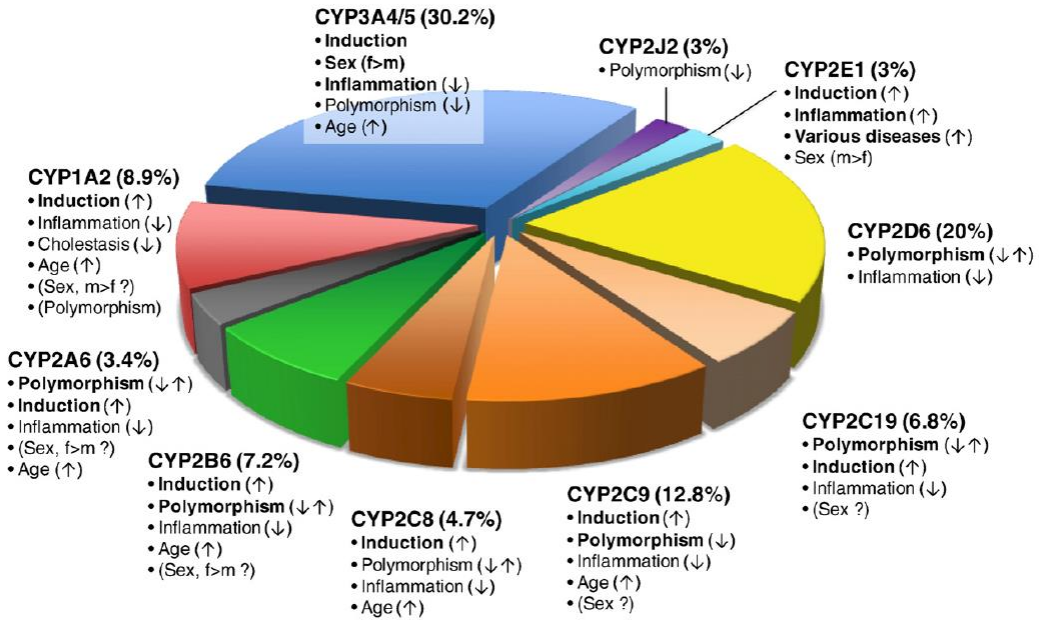


Obrázek č. 6: Schématické znázornění aktivace PPARα a tvorba komplexu s retinoid X receptorem (Contreras et al., 2013).

4.7 Cytochrom P450

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny s molekulovou hmotností přibližně 45 kDa. Jejich úloha je v metabolismu endogenních i exogenních látek. Katalyzované reakce patří mezi reakce první fáze metabolismu. Jednotlivé enzymy se dělí do rodin označovaných číslicí, v nichž mají minimálně 40% podobnost v sekvenci jednotlivých aminokyselin. Písmeno v názvu enzymu značí příslušnost k podrodině, z nichž jednotlivé enzymy sdílí minimálně 55% podobnost v aminokyselinové sekvenci. Poslední číslice označuje konkrétní enzym, např. CYP4A1 (Omura and Sato, 1964; Nelson et al., 1996; Anzenbacher and Anzenbacherova, 2001). Ačkoliv

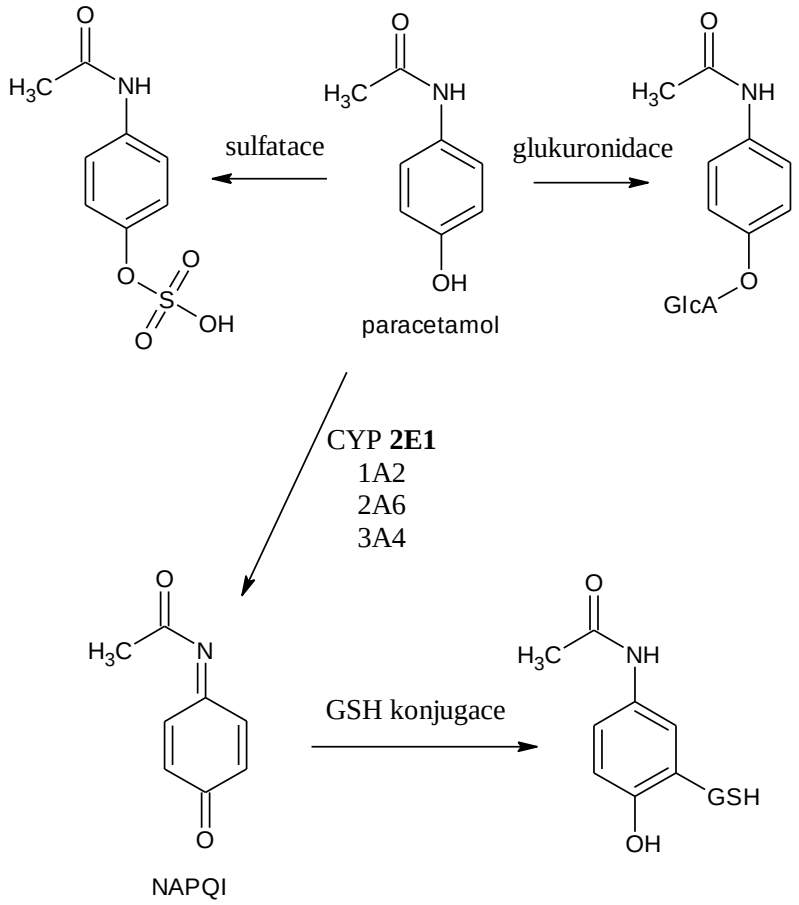
cytochrom P450 má významnou roli v metabolismu léčiv, např. CYP3A4, CYP2C9, byly v rámci disertační práce sledovány cytochromy P450 důležité v metabolismu endogenních látek a ty, které mají souvislost s metabolickým syndromem.



Obrázek č. 7: schématické znázornění participace jednotlivých cytochromů P450 v metabolismu xenobiotik (Zanger and Schwab, 2013).

4.7.1 CYP2E1

Tento enzym se podílí na metabolismu zejména malých molekul a lipidů. Typickými substráty jsou paracetamol, chlorzoxazon, halotan, některá organická rozpouštědla a například kyselina linolová a linolenová (Peter et al., 1990; Kharasch and Thummel, 1993; Bolt et al., 2003). Podobnost lidského a potkaního CYP2E1 v aminokyselinové sekvenci je přibližně 80 %. Obdobná je tedy také substrátová specifita. Z tohoto důvodu je potkan vhodných studijním model i pro lidský CYP2E1 (Martignoni et al., 2006). Jedná se o snadno indukovatelný enzym například ethanolem, hladověním anebo při onemocnění diabetem. Indukce při současném podávání analgetika-antipyretika paracetamolu vede ke zvýšené tvorbě jeho reaktivního metabolitu N-acetylparaaminobenzochinoniminu. Dále se tento enzym podílí také na nežádoucí tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Indukce CYP2E1 tedy může zvyšovat toxicitu paracetamolu a zvyšovat riziko poškození organismu ROS (Cederbaum, 2006).



Obrázek č. 8: metabolismus paracetamolu pomocí CYP2E1.

4.7.2 CYP4A

Potkan disponuje čtyřmi enzymy z podrodiny CYP4A, konkrétně se jedná o CYP4A1, CYP4A2 a CYP4A3. Tyto enzymy se podílejí na ω-oxidaci případně ω-1 oxidaci nasycených i nenasycených mastných kyselin (Sharma et al., 1989). Také se podílejí na ω-hydroxylaci různých prostaglandinů (Yamamoto et al., 1984; Matsubara et al., 1987). Exprese je řízena pomocí PPARα receptorů. Aktivátory PPARα, jež zahrnují fibráty, působí jako induktory těchto enzymů (Sharma et al., 1988).

4.7.3 CYP7A1

CYP7A1 iniciuje první a rychlost limitující krok v syntéze žlučových kyselin. Jedná se o důležitou cestu metabolismu a eliminace cholesterolu (Shefer et al., 1970).

Regulace na transkripční úrovní probíhá pomocí zpětnovazebné inhibice žlučovými kyselinami (Russell and Setchell, 1992). Detailnější informace ohledně regulace a funkce byly popsány výše.

4.8 Zvířecí modely metabolického syndromu

Pokusná zvířata jsou stále nedílnou součástí základního výzkumu. Indukce příznaků metabolického syndromu lze u zvířat navodit dietou či zvířata mohou mít příznaky vrozené.

Při indukci MS dietou se nejčastěji využívají kmeny potkanů Sprague-Dawley či Wistar (Senaphan et al., 2015; Suman et al., 2016). V dietě se nejvíce osvědčil zvýšený příjem zejména jednoduchých sacharidů, zvýšený obsah tuků v potravě anebo kombinace obojího podávaných v průběhu několika týdnů. Odsvědčilo se zejména obohacování pitné vody o fruktosu či glukosu po do dobu alespoň 8 týdnů. Při kratší periodě je nižší pravděpodobnost rozvoje obesity, hypertenze, dyslipidémie a hyperglykémie zároveň (Mahmoud and Elshazly, 2014; Mamikutty et al., 2014).

Výhodou experimentálních modelů s genetickou predispozicí k rozvoji MS je zejména rychlost rozvoje metabolického syndromu. Leptin deficientní modely mohou posloužit zejména pro studium účinků na obézních zvířatech s indukovaným diabetem. Jako potkaní modely mohou posloužit kmeny potkanů Zucker Diabetic Fatty, Goto-Kakizaki nebo hereditárně hypertriglyceridemický potkan (HHTg) (Vrana and Kazdova, 1990; Akash et al., 2013; Lehnen et al., 2013).

Poslední zmiňovaný kmen byl vyšlechtěn z kmene Wistar na základě jeho zvýšené citlivosti k přívodu sacharosy v dietě. Potkani trpí zejména hypertriglyceridémií, poruchou metabolismu glukosy a hypertenzí. Nevýhodou modelu je zejména nepřítomnost obezity jako jednoho z klíčových příznaků metabolického syndromu. I přes tuto nevýhodu je HHTg potkan vhodným a akceptovaným modelem pro studium látek ovlivňujících metabolický syndrom (Klimes et al., 1995; Zicha et al., 2006).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Zvířata a design experimentů

5.1.1 Zvířata

V rámci této disertační práce bylo pracováno se samci hereditárně hypertriglyceridemického potkana. Zvířata byla chována za standardních laboratorních podmínek za stálého přístupu k vodě a krmivu. Veškeré experimenty na zvířatech byly prováděny dle zákona č. 246/1999 Sb., jeho pozdějších novelizací a byly schváleny etickou komisí MŠMT.

5.1.2 Design experimentů

5.1.2.1 Účinky silymarinu v různých farmaceutických formách

Celkem 32 samců hereditárně hypertriglyceridemického (HHTg) potkana bylo rozděleno do čtyř skupin po osmi jedincích. Jednotlivé skupiny zvířat se lišily podávanou stravou. Osm kontrolních (Ctrl) zvířat dostávalo pouze standardní laboratorní dietu (STD). Experimentální diety byly složeny vždy z STD obohacené o 1 % standardizovaného silymarinu (1 % SSM), o 1 % mikronizovaného silymarinu (1 % MSM) anebo 1 % silymarinu ve formě fytosomů (1 % PSM). Zvířata byla krmena dietou po dobu čtyř týdnů a následně byla v postprandiálním stavu utracena. Následně byly odebrány vzorky krve a orgány. Pro analýzu exprese mRNA a proteinu byly vzorky zamraženy.

5.1.2.2 Účinky silybinu v různých farmaceutických formách

Celkem 28 samců HHTg potkana bylo rozděleno do čtyř skupin po sedmi jedincích. Kontrolní (Ctrl) zvířata dostávala standardní laboratorní dietu (STD). Experimentální skupiny dostávaly STD obohacenou o 0,5 % standardizovaného extraktu silybinu (0,5 % SSB), STD obohacenou o 0,5 % mikronizovaného silybinu (0,5 % MSB) anebo o 1 % silybinu ve formě fytosomů (0,5 % PSB). Experiment probíhal po dobu 4 týdnů, na jehož konci byla zvířata v postprandiálním stavu utracena a byly odebrány vzorky pro následnou analýzu.

5.1.2.3 Přidání mikronizovaného silymarinu k n-3 polynenasyceným mastným kyselinám

Pro tuto studii bylo použito 23 samců HHTg potkana. Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin dle obohacené diety. Kontrolní (Ctrl, n = 6) zvířata dostávala pouze standardní laboratorní dietu (STD). 6 potkanů dostávalo STD obohacenou o 1 % mikronizovaného silymarinu. 6 zvířat (n-3) dostávalo sondou 300 mg/kg hm. n-3 polynenasycené mastné kyseliny ve složení 50% DHA a 10% EPA. STD obohacenou o 1 % mikronizovaného silymarinu a n-3 PUFA v dávce 300 mg/kg hm. dostávalo celkem 5 zvířat (n-3 + MSM). Po čtyřech týdnech byla zvířata utracena v postprandiálním stavu a byly odebrány vzorky pro následnou analýzu.

5.1.2.4 Přidání mikronizovaného silymarinu k fenofibrátu

Celkem 25 samců HHTg potkana bylo rozděleno do čtyř skupin. Kontrolní (Ctrl, n = 6) zvířata dostávala standardní laboratorní dietu (STD). 6 zvířat dostávalo k porovnání 1% mikronizovaný silymarin přimíchaný do STD. STD a fenofibrát podávaný sondou v dávce 100 mg/kg hm. (FF) dostávalo celkem 6 zvířat. Poslední skupina zvířat dostávala STD obohacenou o 1 % mikronizovaného silymarinu a sondou jim byl aplikován fenofibrát v dávce 100 mg/kg hm. (FF + MSM)

5.2 Materiál a metody

5.2.1 Přístrojové vybavení

Analytická váha, Xp 205 DELTA RANGE® (Mettler-Toledo, Praha, ČR)
Centrifuga Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburk, D)
Centrifuga Hermle Z 323 K (Gosheim, D)
Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf, Hamburk, D)
Centrifuga Multi-spin (Biosan, Riga, LV)
DNA/RNA UV-cleaner box, UVC/T-AR (Biosan, Riga, LV)
Elektroforéza Power PACTM HC (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)

Homogenizátor Precellys Evolution (Bertin Technologies, Rockville, Maryland, USA)
Inkubátor DRY BATH INCUBATOR (Major Science, San Jose, Kalifornie, USA)
Kapalinový manipulátor Echo 550 (Labcyte, San Jose, Kalifornie, USA)
Laminární box biohazard (Merci, Brno, ČR)
Míchačka (Heidolph, Schwabach, D)
Míchačka Sunflower mini shaker (P-LAB a.s., Praha, ČR)
pH metr (Mettler TOLEDO, Columbus, Ohio, USA)
Snap i.d.TM (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
Spektrofotometr INFINITE M200 (TECAN, Mannedorf, SUI)
Spektrofotometr NanoPhotometr® N60 (Implen, Mnichov, D)
Termocykler Epgradient S (Eppendorf, Hamburk, D)
Termocykler LightCycler 1536 Instrument (Roche Praha, ČR)
Trans-blot® turbo™ (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)
Třepačka Sunflower Mini-Shaker (P-LAB a.s., Praha, ČR)
Ultracentrifuga Optimal LE-80K (Beckman, Praha, ČR)
Váha AdventurerTM Pro (Ohaus, Columbus, Ohio, USA)
Vodní lázeň (Memmert, Schwabach, D)
Vortex IKA® MS3 Basic (MERCI s.r.o., Ostrava, ČR)
Vývěva VacSafeTM Scanvac (Merc Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
Zdroj napětí PowerPacTM HC 250 V, 3.0 A, 300 W (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie, USA)
Zdroj vakua VacSafeTM (SCANVAC, Lillerod, DK)

5.2.2 Kity

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA)
QIAshredder (Qiagen, USA)
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo)
LightCycler® 1536 DNA Probes Master (Roche, Německo)
Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, USA)

5.2.3 Primery

Abca1 rat Rn00710172_m1
Abcg5 rat Rn00587092_m1
Abcg8 rat Rn00590367_m1
Abcb1a rat Rn01639253_m1
Abcb1b rat Rn01636836_m1
Srebf1 rat Rn01495769_m1
Srebf2 rat Rn01502638_m1
Cyp2e1 rat Rn00580624_m1
Cyp7a1 rat Rn00564065_m1
Cyp4a1 rat Rn00598510_m1
Cyp4a2 rat Rn01417066_m1
Cyp4a3 rat Rn04224033_u1
Ppara rat Rn00566193_m1
Pparγ rat Rn00440945_m1
Hprt1 rat Rn01527840_m1

5.2.4 Protilátky

ABCA1 mouse monoclonal (AB.H10): sc-58219 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
ABCB1 rabbit monoclonal: ab170904 (Abcam, UK)
ABCG5 rabbit polyclonal: ab69713 (Abcam, UK)
ABCG8 rabbit polyclonal (H-300): sc-30111 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
CYP2E1 mouse monoclonal: SAB4100017 (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
CYP7A1 rabbit polyclonal (H-58): sc-25536 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

5.2.5 Chemikálie

2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, katalogové číslo M3148, Praha, ČR)
99,8% ethanol pro UV spektroskopii (Penta,kat. č. 71380-11000, Praha, ČR)
Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, katalogové číslo B-8026, Praha, ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner, katalogové číslo 30145, Neratovice, ČR)
Dodecylsíran sodný (Sigma-Aldrich, katalogové číslo L3771, Praha, ČR)

Inhibitory proteas Complete (Roche, katalogové číslo 11836145001, Basilej, SUI)
Kyselina chlorovodíková (Lachner, katalogové číslo 10033-A35, Neratovice, ČR)
Methanol (Sigma-Aldrich, katalogové číslo 32213, Praha, ČR)
Ustalovač (Sigma-Aldrich, katalogové číslo 7167, Praha, ČR)
Vývojka (Sigma-Aldrich, Praha, katalogové číslo P7042, ČR)

5.2.6 Spotřební materiál

Eppendorf mikrozkumavky (Eppendorf, Hamburg, D)
Falkonky 12ml a 50 ml VWR® (VWR international, Stříbrná Skalice, ČR)
Mini-PROTEAN® TGX™ gely (Bio-Rad Laboratories, USA)
Špičky Eppendorf (Eppendorf, Hamburk, D)
Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad Laboratories, USA)

5.3 Metody

5.3.1 Real-time PCR

Pří řešení disertační práce byla pro kvantifikaci mRNA použita metoda Real-Time PCR (RT-PCR). Jedná se o metodu založenou na amplifikaci cDNA. Množství vzniklé cDNA je zaznamenáváno na konci každého cyklu díky fluorescenčně značeným sondám. Pro řešení disertační práce byly použity TaqMan sondy, které se vyznačují vysokou specifitou.

Během opakujících se cyklů replikace cDNA je zaznamenána fluorescence. Náhlý nárůst fluorescence, tzv. cycle of treshold (Ct) je zaznamenán a použit pro následný výpočet relativního množství cDNA.

V rámci experimentů byla hodnota fluorescence počítána relativně – vždy v porovnání ke fluorescenci kontrolní skupiny. Pro výpočet rozdílů v expresi mRNA byla použita standardní metoda delta-delta Ct (Livak and Schmittgen, 2001).

5.3.1.1 Izolace a kvantifikace mRNA

Pro izolaci mRNA bylo použito 30 mg rozmražené jaterní tkáně. Jaterní tkáň byla zhomogenizována v homogenizátoru Precellys Evolution (Bertin Technologies, Rockville, Maryland, USA) a pro následnou izolaci byl použit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA) s postupem dle standardního protokolu výrobce. Koncentrace a čistota získané mRNA byla měřena spektrofotometricky (NanoPhotometer N60, Implen, Mnichov, Německo) a pro následnou syntézu cDNA bylo použito množství 1000 ng mRNA. Reverzní transkripce probíhala dle standardního protokolu výrobce pomocí Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo). Získaná cDNA byla okamžitě zmražena a využita pro následné RT-PCR experimenty. Samotné RT-PCR bylo prováděno na přístroji LightCycler 1536 Instrument (Roche, Německo) za následujících podmínek: denaturace 10 minut 95°C, následně 45 cyklů 95°C 5 s, 60°C 30 s pro denaturaci, annealing a elongaci. V průběhu každého cyklu byla monitorována emise fluorescence. Samotná RT-PCR probíhala na 1536jamkových destičkách, na něž musela být směs pipetována automaticky pomocí Automate Labcyte Echo (Roche, Irsko). Měření probíhalo v sextetech za použití komerčně dostupných TaqMan sond (Life Technologies, USA). Veškeré naměřené hodnoty Ct byly normalizovány k hypoxanthin-guanin fosforibosyl transferasu (Hprt1) a následně kvantifikovány metodou $^{\Delta\Delta}$Ct (Livak and Schmittgen, 2001).

5.3.2 Příprava jaterního homogenátu

Po usmrcení zvířete byla játra odebrána a okamžitě zamrazena na -70°C. Pro přípravu homogenátu byla část zamražených jater (cca 1 g) rozmražena a promyta. Játra byla homogenizována v RIPA pufru (Santa Cruz Biotechnology, USA) pomocí homogenizátoru Precellys Evolution (Bertin Technologies, Rockville, Maryland, USA). Následně byly vzorky stočeny 10 min při 6000 g.

5.3.2.1 Stanovení proteinu

Stanovení obsahu celkového proteinu v homogenátu probíhalo pomocí metody s kyselinou bicinchinonovou. Měření probíhalo na 96jamkových destičkách

v tripletech. Mikrosomy i homogenát byl ředěn 50 krát fosfátovým pufrem. Do jamky bylo pipetováno 12,5 µl této směsi a 100 µl činidel z BCA Protein Assay Reagent Kit (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusets, USA). Destičky se nechaly při 37°C 30 minut inkubovat a následně byla měřena absorbance na přístroji TECAN Infinity absorbance/fluorescence/luminescence reader (Tecan, Rakousko). Koncentrace proteinu byla odečítána z kalibrační křivky získané ze standardu bovinního sérového albuminu.

5.3.2.2 Kvantifikace proteinu

Pro kvantitativní porovnání množství jednotlivých proteinů mezi skupinami byla použita zavedená metoda založená na principu separace pomocí elektrického proudu. Tato metoda využívá separační vlastnosti gelu s přídavkem dodecylsíranu sodného (SDS). Díky SDS získávají separované proteiny záporný náboj a jsou přitahovány směrem ke kladné elektrodě. Rychlost přesunu proteinů k anodě je ovlivněna zejména velikostí daného proteinu, stupni jeho denaturace a také na hustotě použitého gelu (Kurien and Scofield, 2006).

Následujícím krokem je přenos proteinů z gelu na membránu, která se po standardních procedurách nechá inkubovat s primární protilátkou. Tato primární protilátka se specificky váže na detekované proteiny. Vazba protilátek závisí na množství proteinu na membráně a také na koncentraci použité protilátky. Sekundární protilátky, které se specificky vážou na protilátky primární, jsou obvykle konjugovány s křenovou peroxidasou. Následuje reakce s chemiluminiscenčním činidlem a detekce pomocí světlocitlivého filmu či vhodným přístrojem.

Následná kvantifikace proteinů probíhá matematicky na základě velikosti a intenzity zóny či tzv. proužku. Obvykle se využívá relativní porovnání množství proteinu vztaženého ke kontrole (Kurien and Scofield, 2006).

Separace jednotlivých proteinů probíhala pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Gely pro SDS-PAGE elektroforézu byly připravovány jednak ručně, jednak byly použit komerčně dostupné Mini-PROTEAN® TGX™ gely (Bio-Rad Laboratories, USA). Vzorky s obsahem proteinu byly před nanesením na gel zředěny v pufru (62,5 mM TRIS, 10 % glycerol, 4 % merkaptoethanol, 2 % SDS, brilantní modř, pH 6,8). Vzorky byly následně 5 minut denaturovány a 5 minut zcentrifugovány při 6000 g.

Elektroforéza probíhala 10 minut při 110 V a následně při 150 – 180 V až 1,5 hodiny. Voltáž byla volena vždy individuálně, aby nebyl překročen proud 0,1 A. Po vypnutí přístroje z elektrického proudu byly gely opatrně vyjmuty a položeny na komerčně dostupnou membránu (Bio-Rad Laboratories, USA). Pro přenos proteinů z gelu na membránu byl použit přístroj Trans Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, USA). Po vyjmutí z přístroje byly membrány rozstříhány na příslušnou velikost a promyty v TBS pufru 3 krát 5 minut. Následně byly membrány blokovány po dobu 1 hodiny a po opětovném řádném promytí v TBS-tween byly membrány inkubovány s primární protilátkou. Podmínky inkubace byly voleny vždy dle pokynů výrobce k přihlédnutí k vlastním zkušenostem. Z toho důvodu některé primární protilátky byly inkubovány za laboratorní teploty 1 hodinu, jiné protilátky přes noc při 4°C. Následovala inkubace se sekundární protilátkou a aplikace chemiluminiscenčního činidla (USA) s navazující expozicí na X-ray filmy.

Vyhodnocení Western blotu probíhalo pomocí software ElfoMan, verze 2,6 (Semecký Inc., Česká republika).

5.4 Lipidové a glykemické parametry

Lipidy, glykémie a insulinémie byly standardně stanovovány pomocí enzymatických metod dle pokynů výrobce Bio-La-Test (Erba Lachema, ČR).

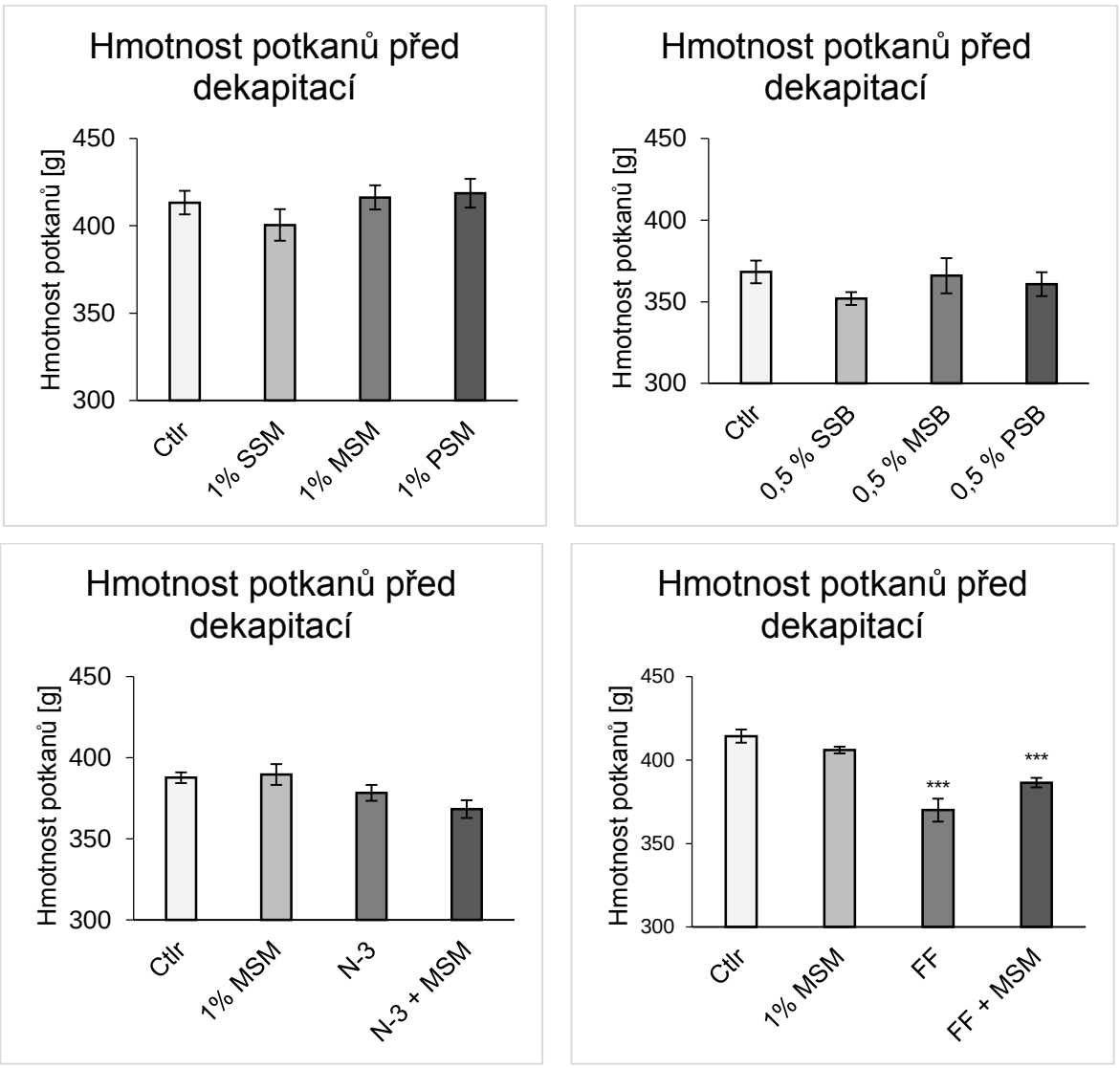
5.5 Statistické zpracování

Pro statistickou analýzu byl volen ANOVA parametrický test. Pro následné porovnání významností mezi jednotlivými skupinami byl volen post hoc Bonferonniho test. Hodnoty byly brány jako statisticky významné při hodnotě $p < 0,05$.

6 VÝSLEDKY

6.1 Hmotnost zvířat, orgánů, lipidové parametry a glykémie

6.1.1 Hmotnost potkanů před dekapitací



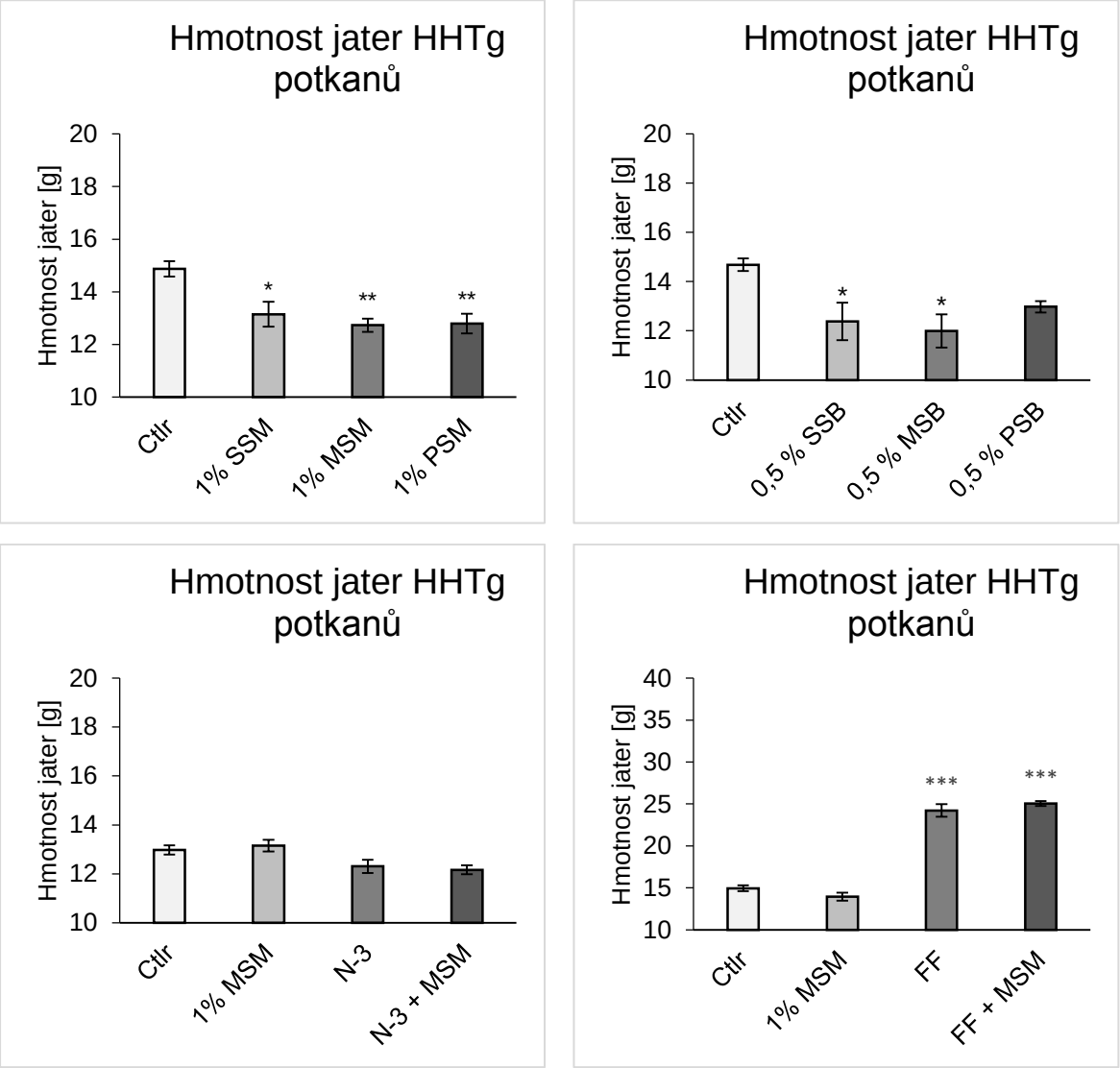
Graf č. 1: Hmotnost potkanů na konci pokusů před dekapitací. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. *** p < 0,001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

U potkanů v pokusu s různými formami silymarinu nebyl na konci experimentu zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ve hmotnosti pokusných zvířat. U zvířat,

která měla ve standardní dietě přimícháno 1 % standardizovaného extraktu silymarinu, byla zaznamenána mírně nižší hmotnost v porovnání s kontrolou. Obdobné výsledky byly zaznamenány také v rámci experimentu s dietou obohacenou o 0,5 % silybinu. Ani v tomto případě rozdíl na konci experimentů nedosáhl statistické významnosti. Přestože dle grafického znázornění je zřejmá nižší hmotnost potkanů suplementovaných n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami, jejich hmotnost se statisticky nelišila. Naproti tomu u pokusu při podávání 100 mg fenofibrátu na kg/hm. je u potkanů jasný statisticky významný pokles hmotnosti. Konkrétně u zvířat léčených samotným fenofibrátem byla finální hmotnost o 44 g nižší a v případě kombinace fenofibrátu s 1 % mikronizovaného silymarinu o 26 g nižší. Hodnota p je v obou případech nižší než 0,001.

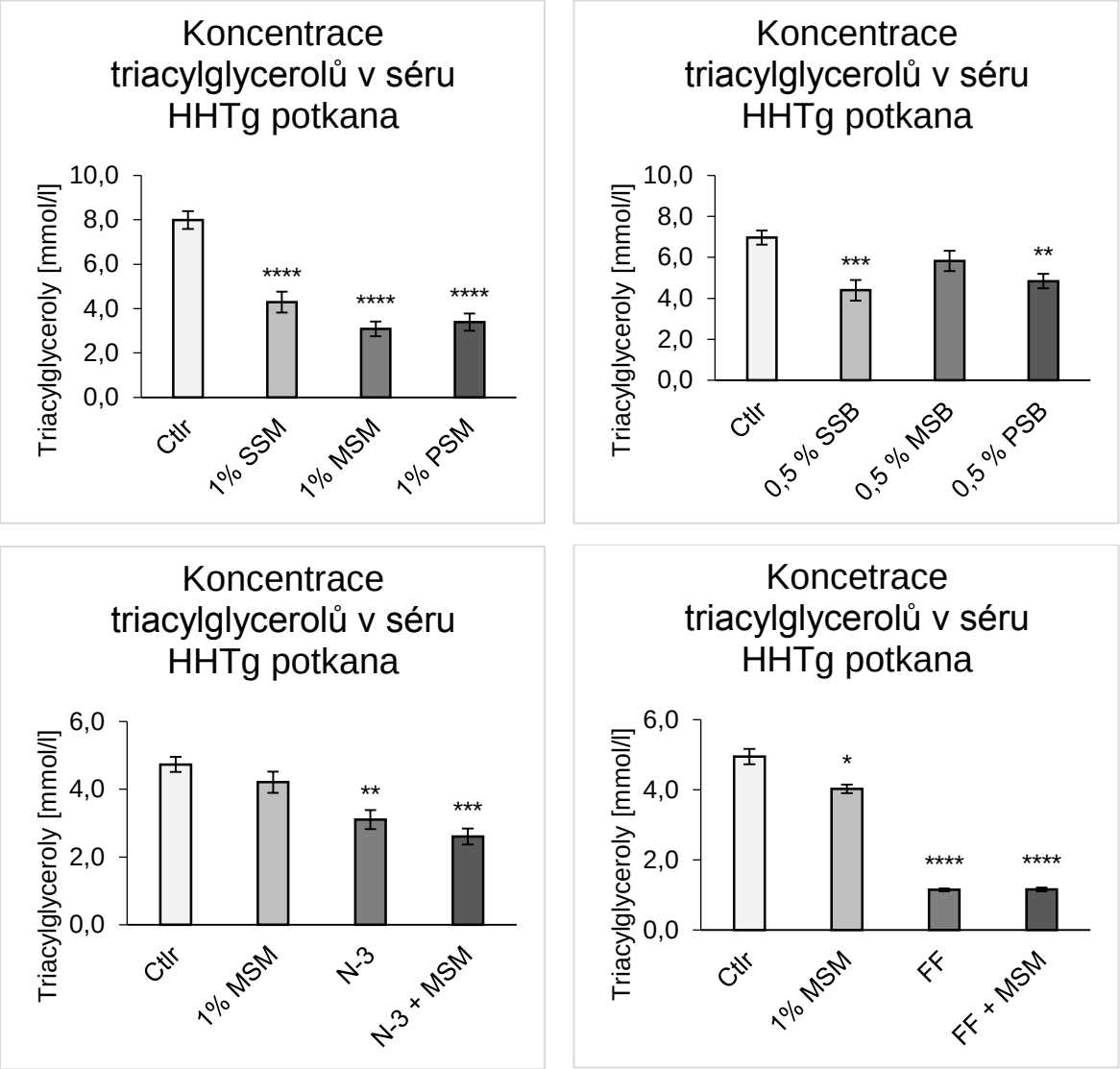
6.1.2 Hmotnost jater po dekapitaci

Potkaní játra byla po usmrcení zvířat vyjmuta a následně zvážena. V případě obohacení standardní laboratorní diety silymarinem došlo ke statisticky významnému snížení hmotnosti jater. Tento efekt byl zřejmý po podání všech experimentálních forem silymarinu: standardizovaný extrakt (-1,7 g; $p < 0,05$), mikronizovaný silymarin (-2,1 g; $p < 0,01$) a silymarin ve formě fytosomů (-2,1 g; $p < 0,01$). Obdobné výsledky byly získány také v případě přídavku 0,5 % silybinu do standardní diety: standardizovaný silybin (-2,3 g; $p < 0,05$) a mikronizovaný silybin (-2,7 g; $p < 0,05$). V případě silybinu ve formě fytosomů měla játra o 1,7 g nižší hmotnost než v případě kontrol, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. V případě podávání n-3 polynenasycených mastných kyselin samotných anebo v kombinaci s 1 % mikronizovaného silymarinu nebyl rozdíl v hmotnosti jater významný. Na druhou stranu v případě standardní diety obohacené o fenofibrát či fenofibrát se silymarinem měla játra statisticky významně vyšší hmotnost než v případě kontroly či samotného silymarinu: fenofibrát (+9,28 g; $p < 0,001$), fenofibrát + mikronizovaný silymarin (+10,1 g; $p < 0,001$).



Graf č. 2: Hmotnost jater po dekapitaci potkanů a vyjmutí orgánů. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.1.3 Triacylglyceroly v séru



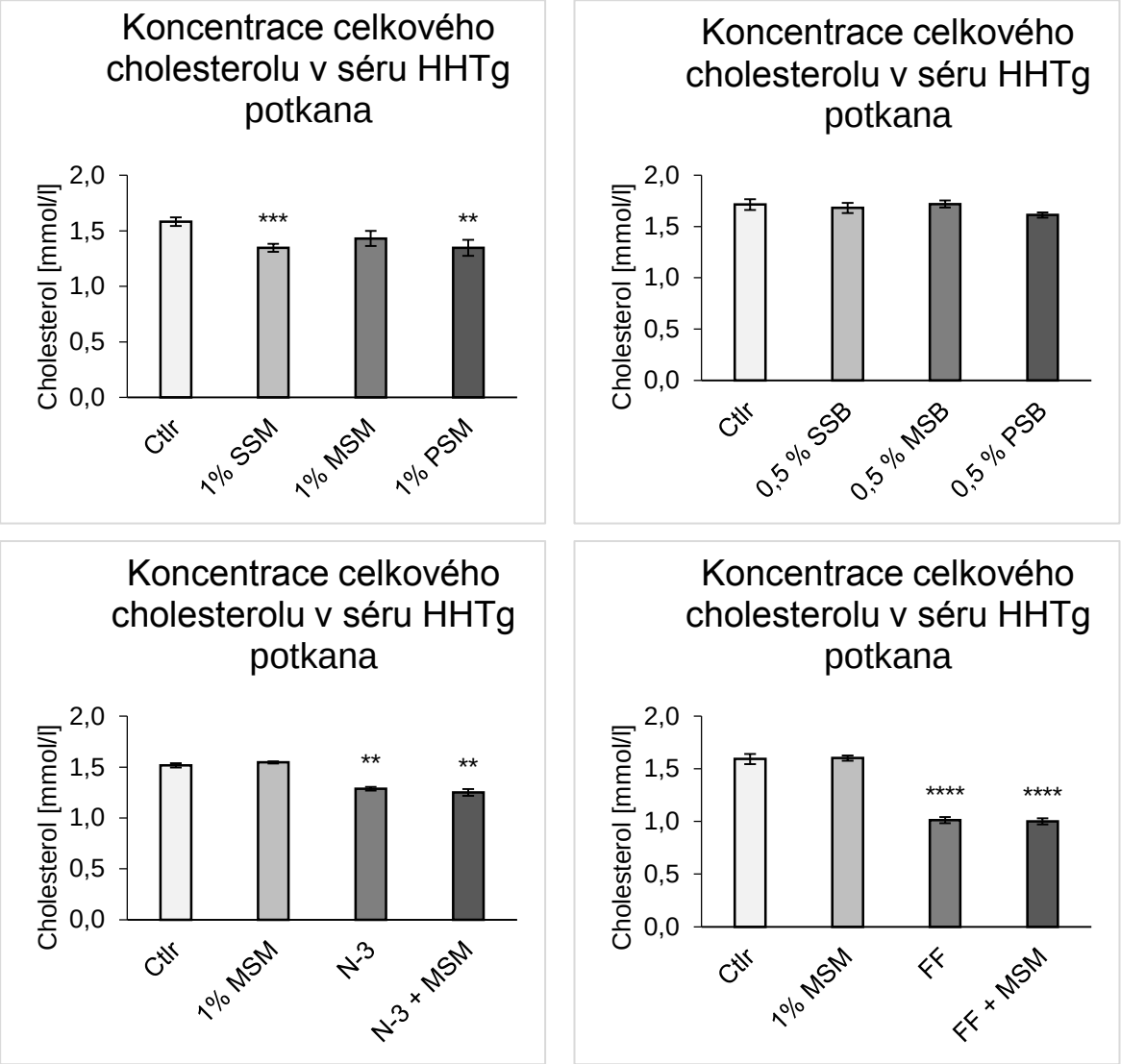
Graf č. 3: Výsledná koncentrace triacylglycerolů v séru. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

Koncentrace triacylglycerolů v séru byla významně snížena u všech experimentálních skupin v rámci pokusu s různými formami silymarinu. Nejvýznamnější snížení bylo dosaženo u zvířat s dietou obohacenou o 1 % mikronizovaného silymarinu. Konkrétně byly triacylglyceroly sníženy o 4,91 mmol/l ($p < 0,0001$). V případě standardizovaného extraktu silymarinu byly triacylglyceroly

sníženy o 3,70 mmol/l ($p < 0,0001$), u fytosomů byl pokles o 4,60 mmol/l ($p < 0,0001$). STD obohacená o 0,5 % standardizovaný silybin působila významné snížení triacylglycerolů o 2,57 mmol/l ($p < 0,001$). U diety obohacené o silybin ve formě fytosomů byl naměřen pokles o 2,12 mmol/l ($p < 0,01$) a v případě mikronizované silybinu nebyl pokles statisticky významný (-1,15 mmol/l). U pokusu, v němž se pokusným zvířatům podávaly samotné n-3 polynenasycené mastné kyseliny anebo v kombinaci s mikronizovaným silymarinem, došlo ke statisticky významnému poklesu triacylglycerolů v obou n-3 skupinách. Samotné n-3 PUFA snížily TAG o 1,63 mmol/l ($p < 0,01$), v případě kombinace n-3 PUFA a mikronizovaného silymarinu klesly TAG o 2,12 mmol/l ($p < 0,001$). V posledním pokuse došlo k významnému poklesu triacylglycerolů po podání fenofibrátu bez ohledu na přídavek mikronizovaného silymarinu. V obou případech byl pokles TAG o 3,80 mmol/l ($p < 0,0001$).

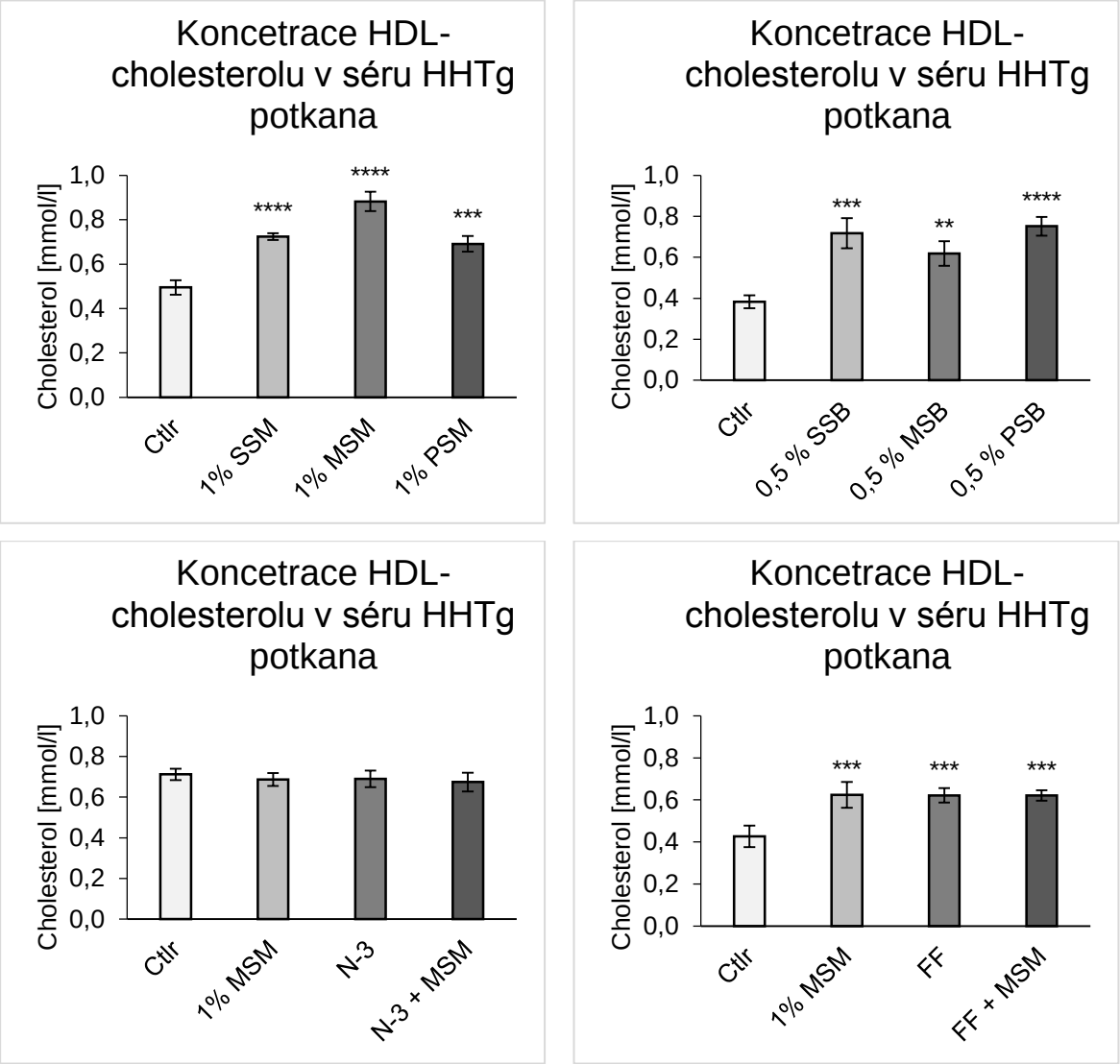
6.1.4 Celkový cholesterol v séru

Graf č. 4 ukazuje změny celkového cholesterolu v séru HHTg potkanů. V rámci experimentů s různými formami silymarinu došlo ke statisticky významnému poklesu celkového cholesterolu v případě podání standardizovaného extraktu silymarinu a silymarinu ve formě fytosomů. V obou případech se snížil cholesterol o 0,24 mmol/l (pro standardizovaný extrakt $p < 0,001$ a $p < 0,01$ pro fytosomy). V případě mikronizovaného silymarinu nebyl pokles statisticky významný (-0,15 mmol/l). U zvířat s dietou obohacenou o různé formy silybinu nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny v koncentraci celkového cholesterolu. HHTg potkani s dietou obohacenou o n-3 polynenasycené mastné kyseliny měli snížený celkový cholesterol o 0,23 mmol/l ($p < 0,01$) a v případě kombinace n-3 PUFA a mikronizovaného silymarinu o 0,26 mmol/l ($p < 0,01$). V posledním experimentu porovnávajícím vliv fenofibrátu samotného anebo v kombinaci s mikronizovaným silymarinem došlo po podání samotného fenofibrátu k významnému snížení celkového cholesterolu o 0,58 mmol/l ($p < 0,0001$) a v případě kombinace poklesu cholesterolu o 0,59 mmol/l ($p < 0,0001$).



Graf č. 4: Výsledná koncentrace celkového cholesterolu v séru. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.1.5 HDL-cholesterol v séru



Graf č. 5: Výsledná koncentrace HDL cholesterolu v séru. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

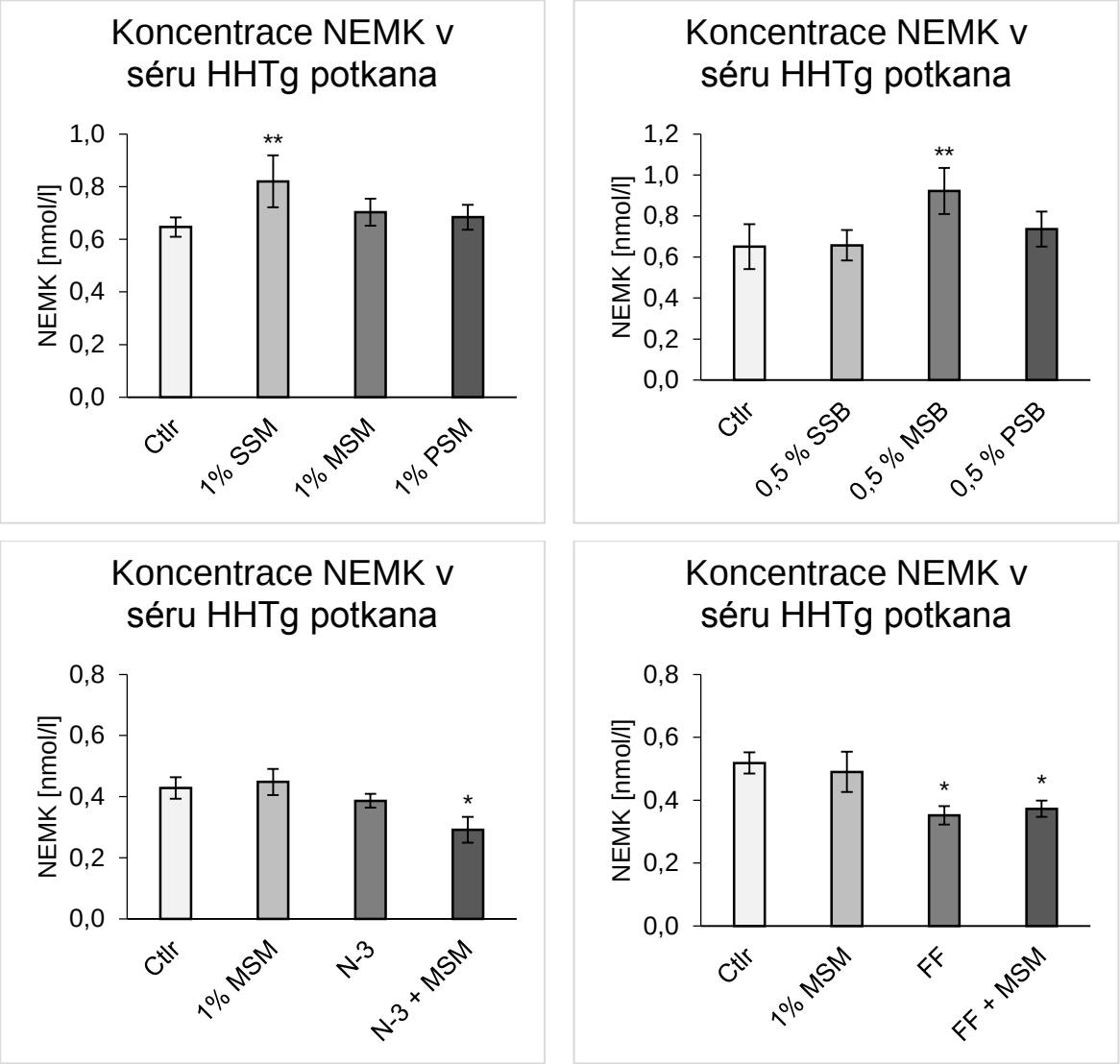
HDL-cholesterol byl významně zvýšen u HHTg potkana s dietou obohacenou o různé formy silymarinu. Konkrétně došlo ke zvýšení HDL po podání standardizovaného extraktu o 0,23 mmol/l ($p < 0,0001$), mikronizovaného silymarinu o 0,38 mmol/l ($p < 0,0001$) a v případě silymarinu ve formě fytosomů byl zaznamenán vzestup HDL o 0,19 mmol/l ($p < 0,001$). V rámci experimentů se

silybinem byl vzestup HDL cholesterolu zaznamenán následovně: u standardizovaného extraktu o 0,33 mmol/l ($p < 0,001$), u mikronizovaného extraktu silybinu o 0,23 mmol/l ($p < 0,01$) a u extraktu obsahujícího silybin ve formě fytosomů o 0,36 mmol/l ($p < 0,0001$). U pokusů s dietou obohacenou o n-3 polynenasycené mastné kyseliny byl pozorován statisticky nevýznamný pokles HDL cholesterolu o 0,02 mmol/l a v případě kombinace n-3 polynenasycených mastných kyselin a mikronizovaného silymarinu o 0,03 mmol/l. V pokusech s HHTg potkany na obohacené dietě o fenofibrát došlo u pokusných zvířat ke statisticky významnému vzestupu HDL cholesterol o 0,20 mmol/l ($p < 0,001$) a v případě kombinace fenofibrátu s mikronizovaným silymarinem o 0,19 mmol/l ($p < 0,001$). Výsledná hodnota HDL cholesterolu byla u zvířat s dietou obohacenou o fenofibrát srovnatelná s konečnou koncentrací HDL cholesterolu po podání samotného mikronizovaného silymarinu (+0,20 mmol/l; $p < 0,001$).

6.1.6 Neesterifikované mastné kyseliny v séru

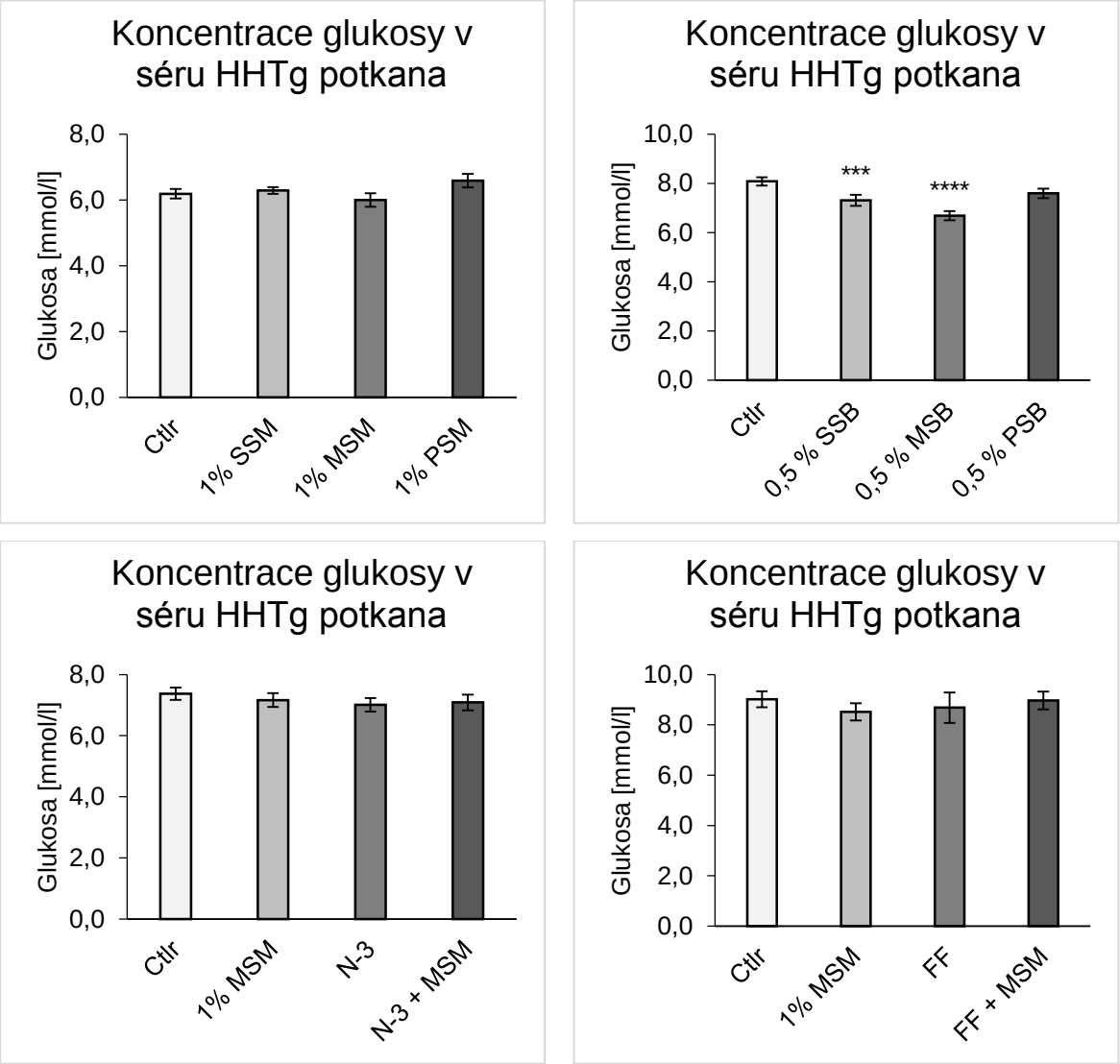
Graf č. 6 ukazuje rozdíly v koncentracích neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) v séru na konci pokusů. U HHTg potkana byla v rámci pokusů s různými farmaceutickými formami silymarinu naměřena nejvyšší koncentrace NEMK u zvířat s dietou obohacenou o standardizovaný extrakt silymarinu, konkrétně o 0,17 mmol/l ($p < 0,01$). V případě diety obohacené o mikronizovaný silymarin byla koncentrace NEMK vyšší o 0,05 mmol/l a v poslední skupině zvířat se silymarinem ve formě fytosomů byla zaznamenána koncentrace NEMK o 0,03 mmol/l vyšší než v případě kontrolních zvířat. V obou případech se jednalo o změny statisticky nevýznamné. Pokus s totožným designem byl realizován také pro silybin. V případě tohoto pokusu byla nejvyšší koncentrace NEMK naměřena u mikronizované formy silybinu, konkrétně o 0,27 mmol/l ($p < 0,01$) než v případě kontrol. Diety obohacené o standardizovaný extrakt silybinu a silybin ve formě fytosomů neměly významný vliv na konečné koncentrace NEMK. V rámci následného pokusu došlo k významnému snížení NEMK po podání diety obohacené o kombinaci n-3 polynenasycených mastných kyselin a mikronizovaného silymarinu (-0,14 mmol/l; $p < 0,05$). V rámci tohoto experimentu samotné n-3 polynenasycené mastné kyseliny ani samotný silymarin neměly na konci pokusu významný vliv na koncentraci NEMK. U posledního pokusu došlo opět ke statisticky významnému poklesu NEMK v séru

jak po podání fenofibrátu (-0,16 mmol/l; $p < 0,05$), tak také v případě kombinace fenofibrátu a mikronizovaného silymarinu (-0,14 mmol/l; $p < 0,05$). Stejně jako v předchozích pokusech samotný mikronizovaný silymarin výslednou koncentraci NEMK neovlivnil.



Graf č. 6: Výsledná koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin v séru. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, $n \geq 6$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.1.7 Glykémie v séru



Graf č. 7: Výsledná koncentrace glukosy v séru. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

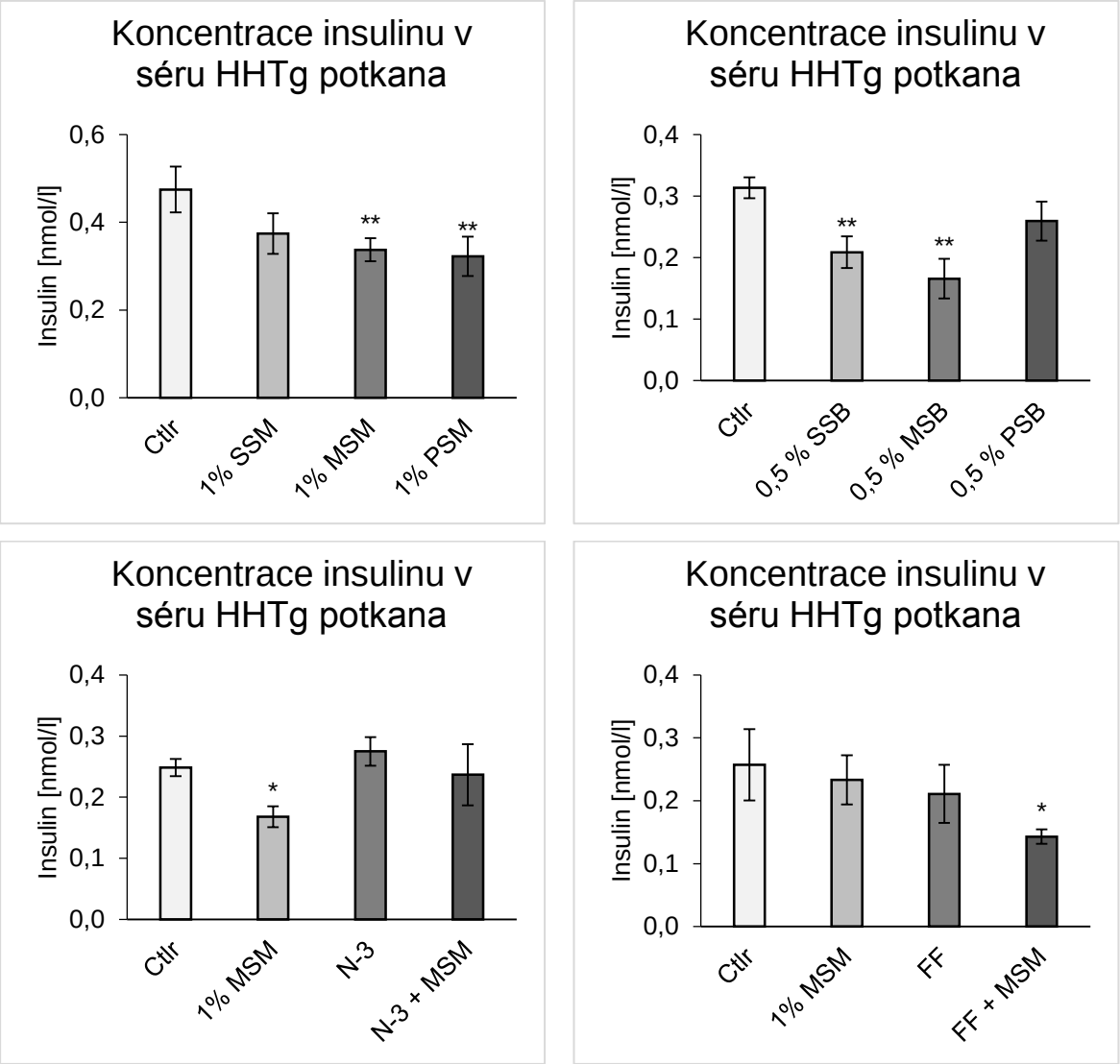
Z grafu č. 7 lze vyčíst výsledné koncentrace glukosy v séru HHTg potkana. Různé formy silymarinu neměly významný vliv na glykémii v séru. Mírný pokles glykémie byl naměřen u diety obohacené o mikronizovaný silymarin, ačkoliv tento pokles nebyl statisticky signifikantní (-0,19 mmol/l). V případě standardizovaného extraktu silymarinu (+0,10 mmol/l) a silymarinu ve formě fytosomů (+0,40 mmol/l) byl

zaznamenán nevýznamný vzestup glykémie v porovnání s kontrolními zvířaty. Na druhou stranu v rámci pokusu s HHTg potkany s dietou obohacenou o různé formy silybinu byly výsledky statisticky významné. Nejvyšší pokles glykémie v porovnání s kontrolními zvířaty byl naměřen u zvířat, která v dietě dostávala mikronizovaný silybin (-1,40 mmol/l; $p < 0,0001$). Zvířata s dietou obohacenou o standardizovaný extrakt silybinu měla glykémii na konci pokusu významně nižší o 0,77 mmol/l ($p < 0,001$) než kontrolní potkani. HHTg potkani s dietou obohacenou o silybin ve formě fytosomů měli finální glykémii o 0,49 mmol/l nižší, ale pokles nedosáhl statistické významnosti v porovnání s kontrolami. V experimentů s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami a fenofibrátem nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny, pravděpodobně způsobené velkým rozptylem výsledných hodnot. I přesto, že průměrná glykémie u zvířat s dietou obohacenou o n-3 polynenasycené mastné kyseliny byla o 0,40 mmol/l nižší, u kombinace n-3 polynenasycených mastných kyselin a mikronizovaného silymarinu o 0,28 mmol/l nižší, nebyly tyto změny statisticky významné. Obdobné výsledky bez statisticky významných změn byly získány také v rámci experimentů s fenofibrátem.

6.1.8 Insulinémie v séru

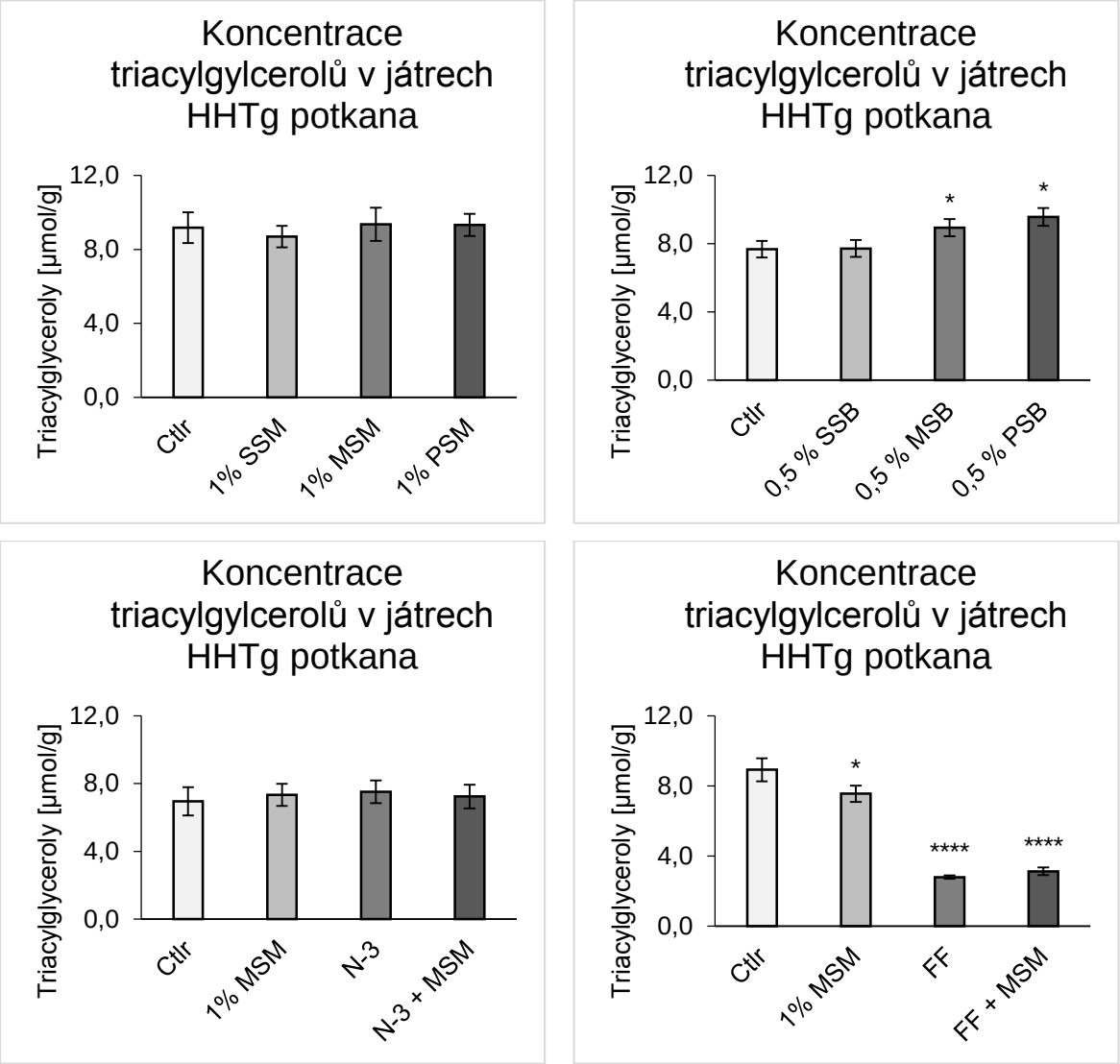
Insulinémie v případě experimentů s HHTg potkany a různými farmaceutickými formami silymarinu plně nekopírovala výsledky s hodnotami sérové koncentrace glukosy. V případě standardizovaného extraktu silymarinu byl zaznamenán pokles sérové koncentrace insulinu o 0,10 nmol/l (bez statistické významnosti). Naopak v případě diety obohacené o 1 % mikronizovaného silymarinu byl zaznamenán významný pokles insulinémie o 0,14 nmol/l ($p < 0,01$) a v případě silymarinu ve formě fytosomů pokles o 0,15 nmol/l ($p < 0,01$). V rámci pokusu s různými farmaceutickými formami silybinu kopírovala hladina insulinu sérovou koncentraci glukosy. Statisticky významný pokles insulinémie o 0,10 nmol/l ($p < 0,01$) byl pozorován v případě standardizovaného silybinu a pokles o 0,15 nmol/l ($p < 0,01$) v případě silybinu v mikronizované formě. Podání silybinu ve formě fytosomů nemělo významný vliv na sérovou koncentraci insulinu. Na základě výsledků z experimentů s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami je zřejmé, že jak samotné n-3 PUFA, tak ani v kombinaci s mikronizovaným silymarinem nevedly k významné úpravě insulinémie. Tedy podobně jako v případě sérových

koncentrací glukosy. V rámci tohoto pokusu došlo po podání mikronizovaného silymarinu k významnému poklesu insulinémie o 0,08 nmol/l ($p < 0,05$). V posledních experimentech s fenofibrátem, v nichž se pokusným zvířatům podával mikronizovaný fenofibrát v dávce 100 mg/kg hm., buď samotný, anebo v kombinaci s mikronizovaným silymarinem došlo ke snížení insulinémie o 0,11 nmol/l ($p < 0,05$) pouze v případě jejich kombinace obou podávaných látek.



Graf č. 8: Výsledná koncentrace insulinu v séru. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.1.9 Triacylglyceroly v játrech



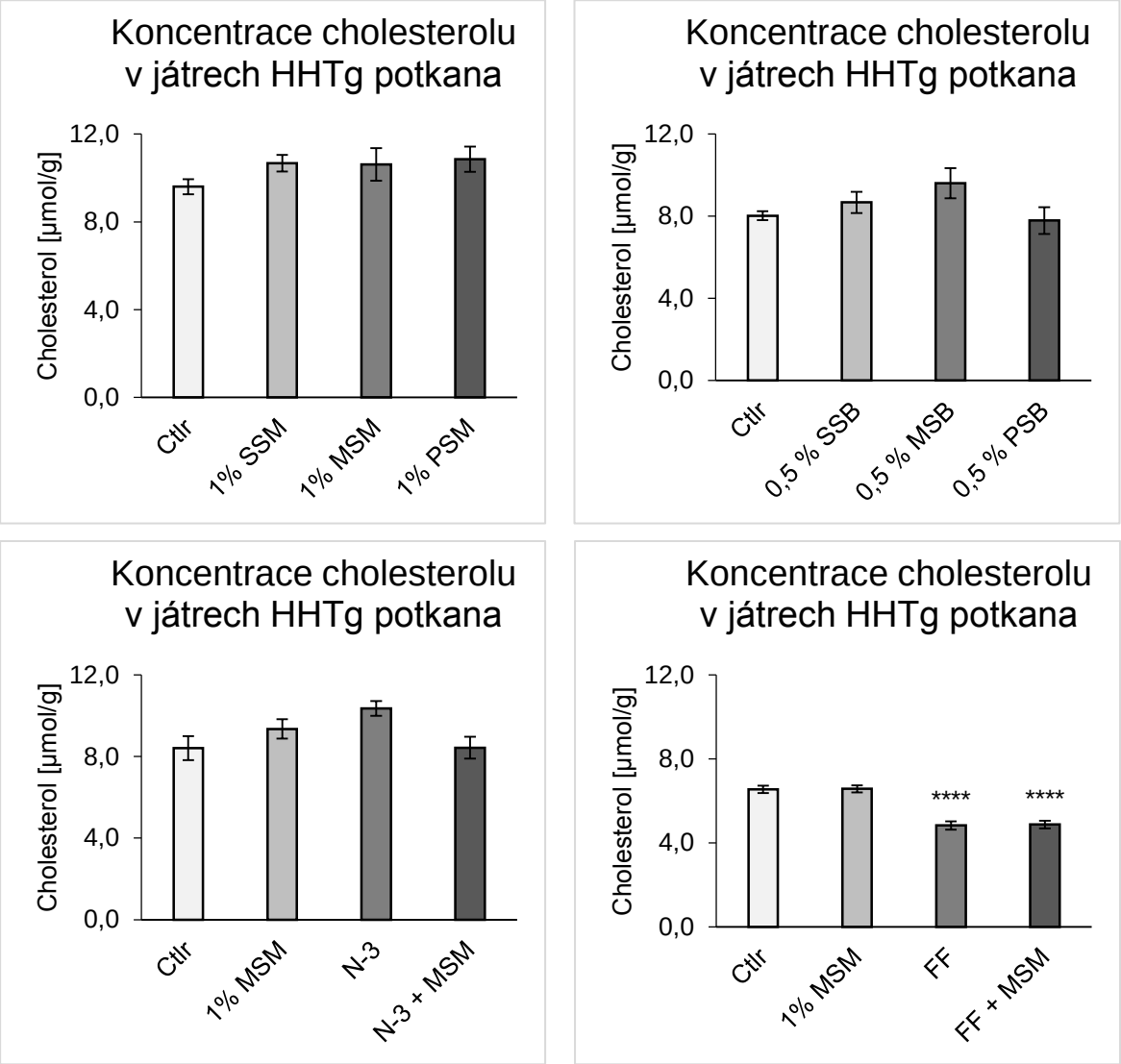
Graf č. 9: Koncentrace triacylglycerolů v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

Následující grafy ukazují výsledné koncentrace triacylglycerolů v játrech. Na základě experimentů s různými farmaceutickými formami je zřejmé, že u samotného silymarinu v jakékoliv formě se nám nepodařilo prokázat vliv na koncentraci triacylglycerolů v játrech. V případě podávání mikronizovaného extraktu silybinu a silybinu ve formě fytosomů byla zaznamenána zvýšená akumulace triacylglycerolů

v játrech. U zvířat s dietou obohacenou o mikronizovaný silybin došlo k nárůstu triacylgylcerolů v játrech o 1,25 μmol/g tkáně ($p < 0,05$) a v případě silybinu ve formě fytosomů o 1,89 μmol/g tkáně ($p < 0,05$). Naše výsledky dále naznačují, že n-3 polynenasycené mastné kyseliny jak samotné, tak také v kombinaci s mikronizovaným silymarinem nemají významný vliv na koncentraci TAG v játrech. V posledním pokuse, v němž se potkanům podával mikronizovaný fenofibrát v dávce 100 mg/kg hm. došlo k signifikantnímu poklesu koncentrace triacylglycerolů v játrech. Fenofibrát nezávisle na mikronizovaném silymarinu snížil jejich koncentraci o 6,12 μmol/g tkáně ($p < 0,0001$) a v případě kombinace fenofibrátu a mikronizovaného silymarinu byly triacylglyceroly sníženy o 5,79 μmol/g tkáně ($p < 0,0001$). V rámci toho pokusu došlo k poklesu TAG v játrech o 1,37 μmol/g tkáně ($p < 0,05$) také u zvířat, které dostávali dietu obohacenou o 1 % mikronizovaného silymarinu.

6.1.10 Cholesterol v játrech

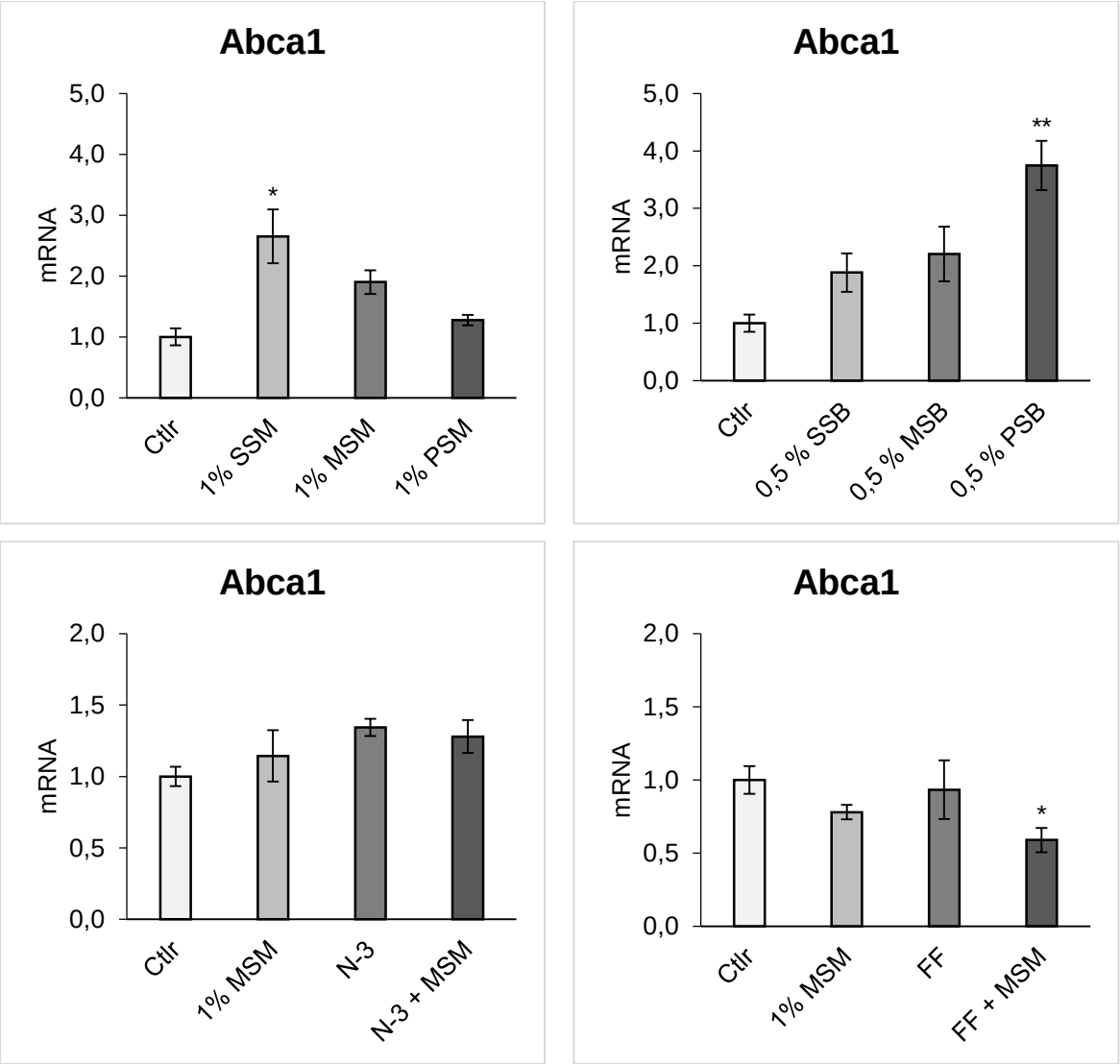
Posledním sledovaným lipidovým parametrem sledovaným v játrech byla koncentrace cholesterolu. U zvířat s různými farmaceutickými formami silymarinu i silybinu v dietě nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny v množství cholesterolu v játrech. Změny v množství cholesterolu v játrech nebyly pozorovány také v případě podávání n-3 polynenasycených mastných kyselin jak samotných, tak ani n-3 PUFA v kombinaci s mikronizovaným silymarinem. Na druhou stranu podávání fenofibrátu pokusným zvířatům vedlo ke statisticky významnému poklesu cholesterolu v játrech. Samotný fenofibrát v dávce 100 mg/kg hm. snížil množství cholesterolu v játrech o 1,72 μmol/g tkáně ($p < 0,0001$). V případě kombinace fenofibrátu s mikronizovaným silymarinem byl zaznamenán pokles cholesterolu v játrech o 1,68 μmol/g tkáně ($p < 0,0001$).



Graf č. 10: Koncentrace cholesterolu v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.2 Real-Time PCR

6.2.1 Abca1



Graf č. 11: Exprese mRNA transportéru ABCA1 v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

mRNA pro ABCA1 byla signifikantně více exprimována o 165 % (p < 0,05) v případě diety obohacené o standardizovaný extrakt silymarinu než v případě kontrol.

U ostatních diet obohacených o silymarin v mikronizované a fytosomové formě nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny.

V případě diet obohacených o silybin ve formě standardizovaného extraktu a v mikronizované podobě nebyly také zaznamenány žádné statisticky významné změny. Na druhou stranu silybin ve formě fytosomů u pokusných zvířat významně zvýšil množství mRNA o 274 % ($p < 0,01$) než v případě kontrolních zvířat.

Na základě našich výsledků byl zaznamenán u diet obohacených o n-3 polynenasycené mastné kyseliny pozitivní trend ve zvýšeném množství mRNA, avšak toto zvýšení nebylo statisticky významné.

Samotný fenofibrát podávaný pokusným zvířatům nevedl k žádným významným změnám u sledované mRNA, avšak fenofibrát v kombinaci s mikronizovaným silymarin významně snížili množství mRNA o 41 % ($p < 0,05$) v porovnání s kontrolními zvířaty.

6.2.2 Abcg5 a Abcg8

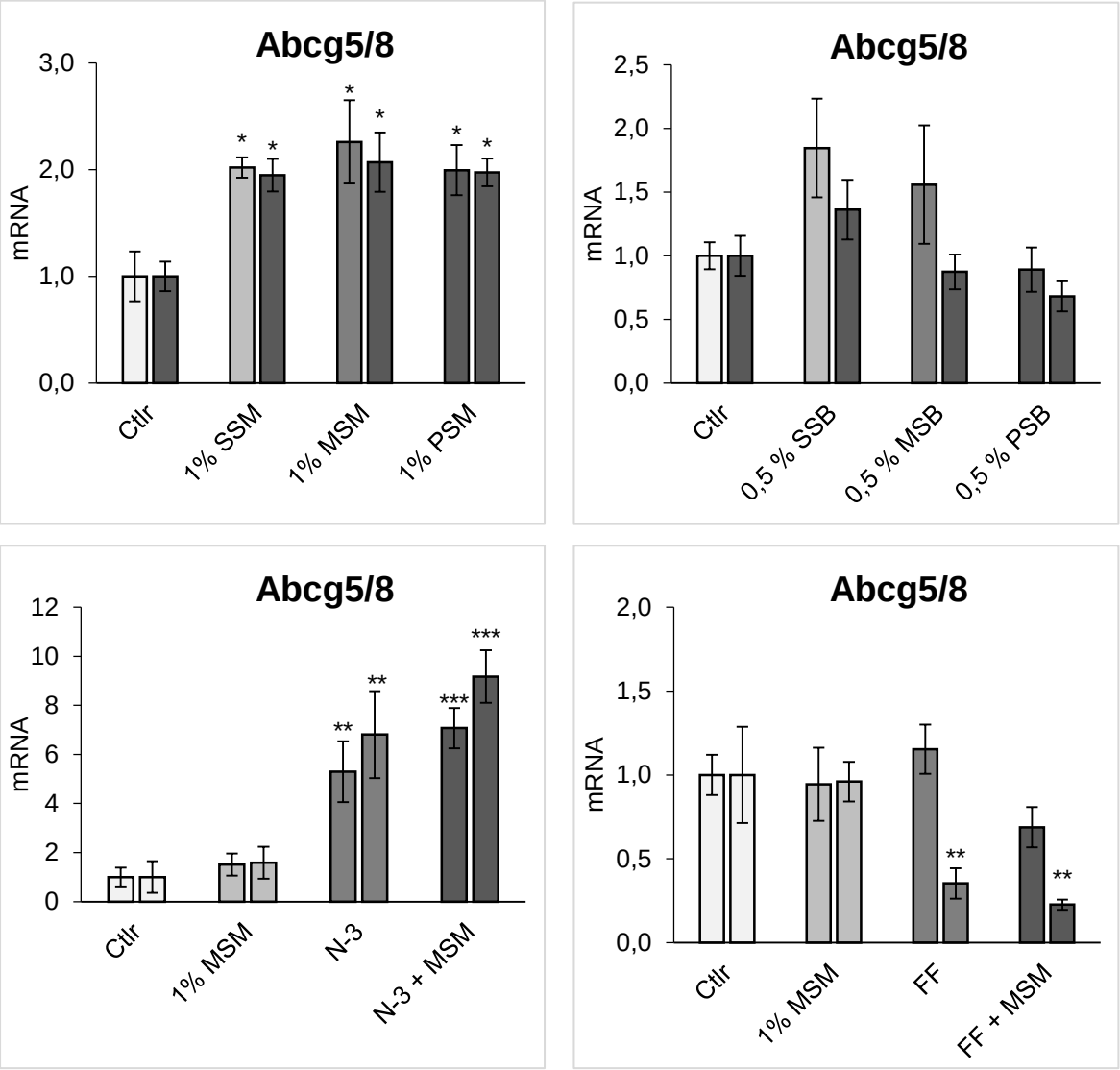
Na grafu č. 12 jsou ukázány změny v mRNA jaterního transportéru ABCG5/8. Všechny diety obsahující silymarin významně zvýšili množství sledované mRNA. Standardizovaný extrakt silymarinu zvýšil množství mRNA pro ABCG5 o 102 % ($p < 0,05$) a o 94 % ($p < 0,05$) pro ABCG8. Mikronizovaný silymarin zvýšil expresi mRNA pro ABCG5 o 126 % ($p < 0,05$) a pro ABCG8 o 107 % ($p < 0,05$). Silymarin ve formě fytosomů způsobil nárůst mRNA pro ABCG5 o 99 % ($p < 0,05$) a pro ABCG8 o 97 % ($p < 0,05$).

V případě silybinu nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny. Ačkoliv po podání standardizovaného nebo mikronizovaného silybinu došlo k mírnému nárůstu množství mRNA pro ABCG5.

Významné zvýšení mRNA sledovaných transportérů bylo zaznamenáno po podání diety obohacené o n-3 polynenasycené mastné kyseliny. Samotná kombinace EPA a DHA zvýšila množství mRNA pro ABCG5 o 429 % ($p < 0,01$) a pro ABCG8 o 581 % ($p < 0,01$). N-3 PUFA v kombinaci s mikronizovaným silymarinem způsobily nárůst mRNA pro jaterní ABCG5 o 607 % ($p < 0,001$) a pro ABCG8 o 817 % ($p < 0,001$).

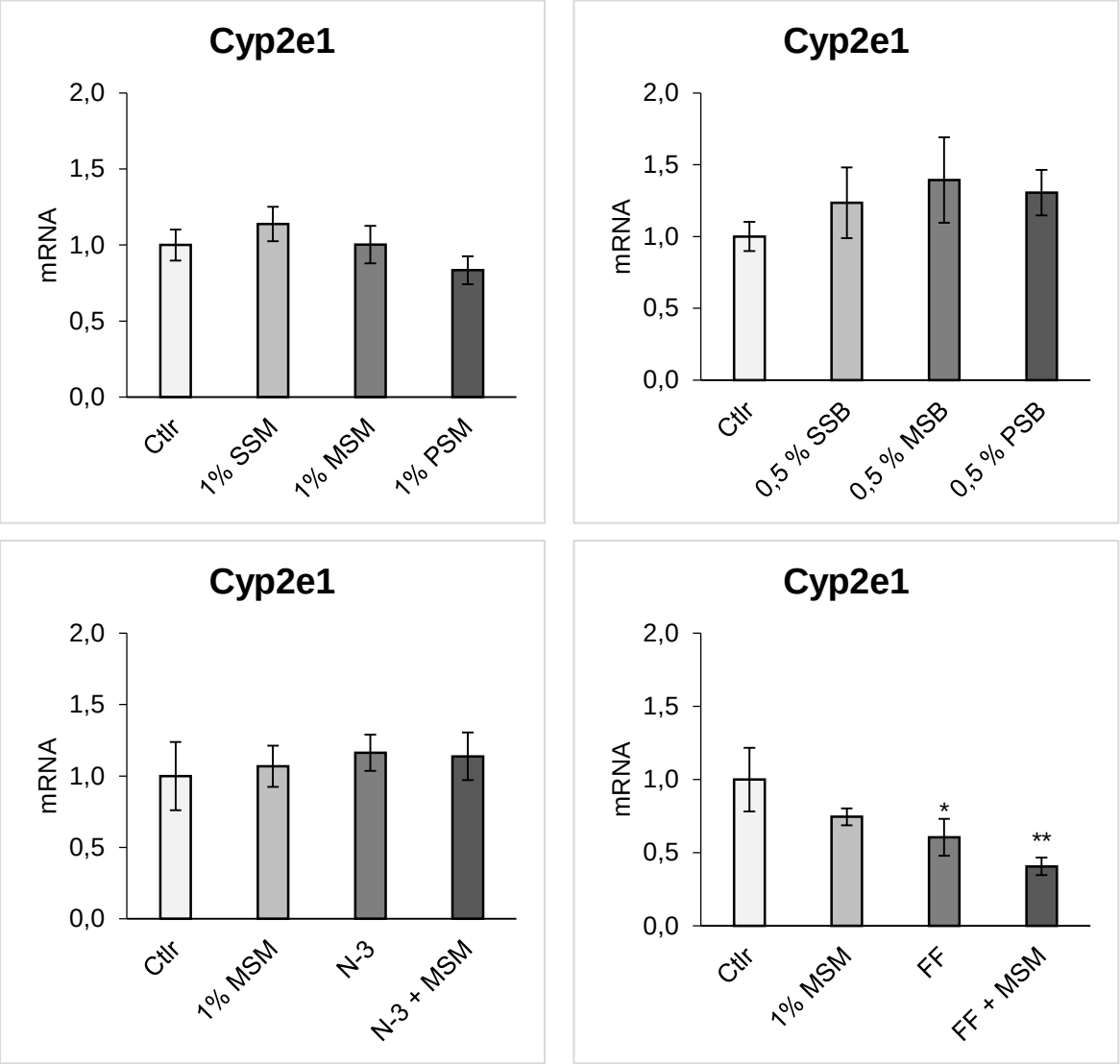
Na základě získaných výsledků nemá fenofibrát významný vliv na expresi mRNA jaterního transportéru ABCG5. Na druhou stranu samotný fenofibrát snížil

expresi mRNA pro ABCG8 o 65 % ($p < 0,01$) a v případě kombinace s mikronizovaným silymarinem způsobil fenofibrát pokles mRNA o 77 % ($p < 0,01$).



Graf č. 12: Exprese mRNA transportéru ABCG5/8 v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, $n \geq 6$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.2.3 Cyp2e1

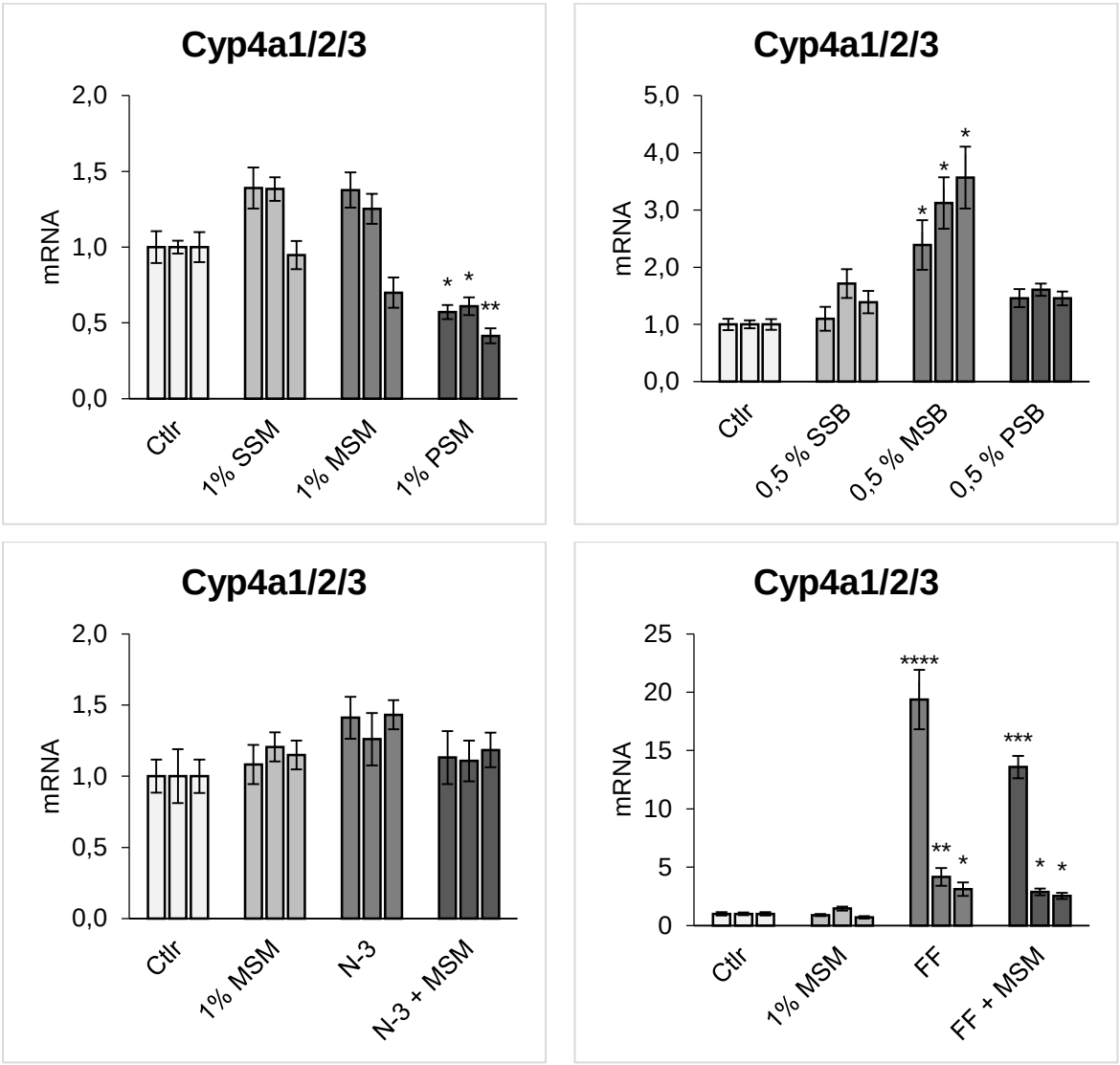


Graf č. 13: Exprese mRNA cytochromu P450 2E1 v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

Graf č. 13 ukazuje výsledné změny mRNA u provedených pokusů. Na základě výsledků prvního pokusu je zřejmé, že silymarin v jakékoliv farmaceutické formě neovlivňuje transkripci mRNA pro CYP2E1. Žádné změny v mRNA pro CYP2E1 nebyly zaznamenány také v případě různých farmaceutických forem silybinu ani v případě podávání n-3 polynenasycených mastných kyselin v dietě. Významné

změny v expresi mRNA byly získány u zvířat léčených fenofibrátem v dávce 100 mg/kg hm. Samotný fenofibrát snížil produkci mRNA o 39 % ($p < 0,05$) než v případě kontrolních zvířat. Přídavek mikronizovaného silymarinu zvýšil down-regulační vliv fenofibrátu o dalších 20 %. Celkově tedy kombinace fenofibrátu a silymarinu snížila produkci mRNA pro CYP2E1 o 59 % ($p < 0,01$). V rámci toho pokusu i samotný mikronizovaný silymarin snížil expresi mRNA pro CYP2E1 o 25 % (NS).

6.2.4 Cyp4a



Graf č. 14: Exprese mRNA cytochromu P450 4A1, 4A2 a 4A3 v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, $n \geq 6$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM –

mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

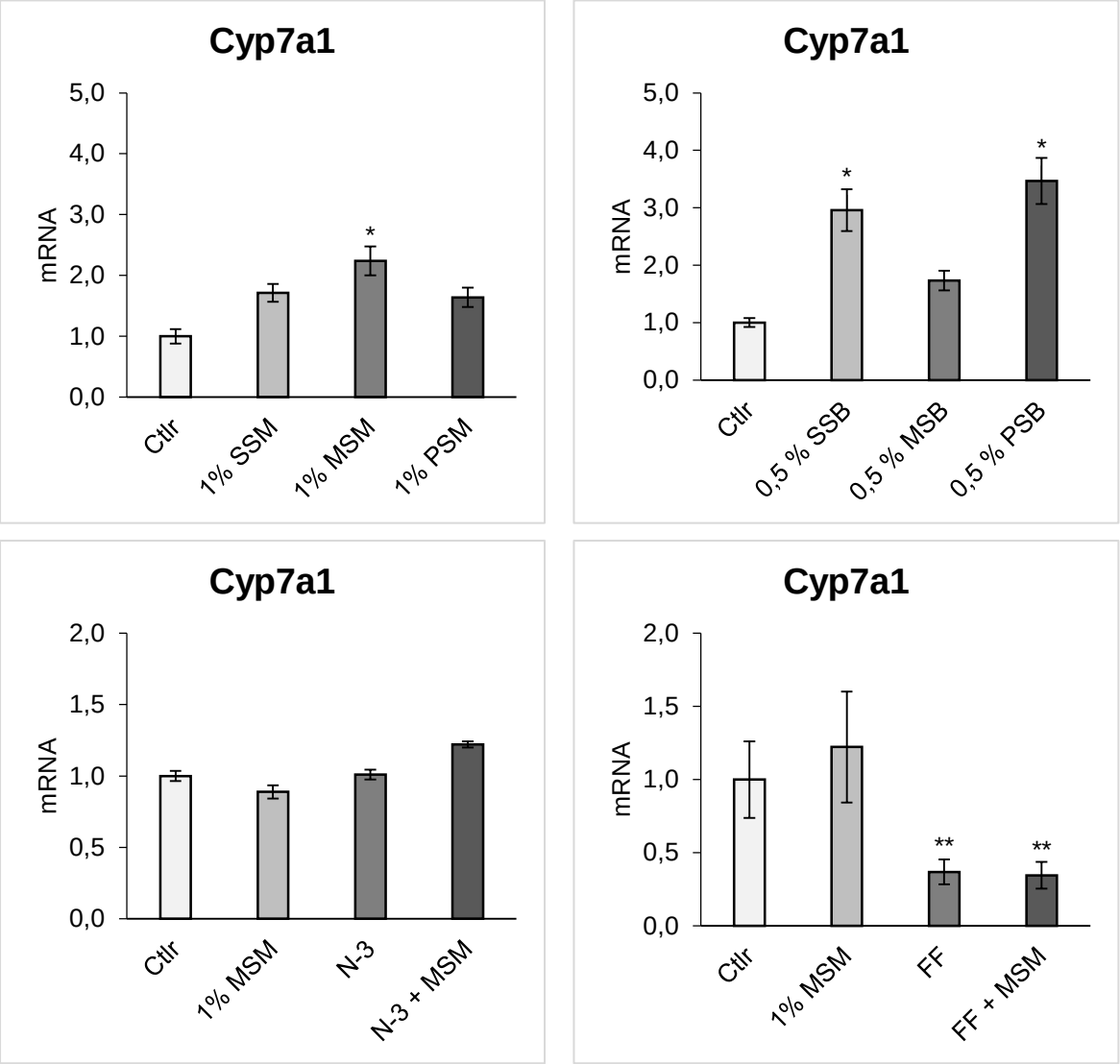
Dieta obohacená o standardizovaný extrakt silymarinu neovlivnila expresi mRNA sledovaných genů Cyp4a1, 4a2 ani 4a3. V případě Cyp4a1 a Cyp4a2 byl zaznamenán mírný nárůst exprese. Podobné výsledky byly získány také v případě mikronizovaného extraktu silymarinu. Podávání silymarinu ve formě fytosomů vedlo k signifikantnímu poklesu mRNA pro CYP4A1 o 43 % ($p < 0,05$), pro CYP4A2 o 39 % ($p < 0,05$) a v případě CYP4A3 o 59 % ($p < 0,01$).

V rámci pokusu se silybinem ani standardizovaný extrakt ze silybinu ani silybin ve formě fytosomů neovlivnil expresi mRNA pro všechny tři sledované cytochromy P450. Pouze v případě mikronizovaného silybinu byl zaznamenán nárůst mRNA pro CYP4A1 o 138 % ($p < 0,05$), pro CYP4A2 o 212 % ($p < 0,05$) a pro CYP4A1 o 256 % ($p < 0,05$).

N-3 polynenasycené mastné kyseliny podávané HHTg potkanům statisticky významně neovlivnili expresi sledované mRNA.

Podávání fenofibrátu HHTg potkanům vedlo k signifikantnímu zvýšení exprese mRNA všech forem sledovaného cytochromu P450. Konkrétně se po podání samotného fenofibrátu zvýšila exprese mRNA o 1800 % v případě CYP4A1 ($p < 0,0001$), o 320 % v případě CYP4A2 ($p < 0,01$) a o 211 % v případě CYP4A3 ($p < 0,05$). Mikronizovaný silymarin tlumil up-regulační vliv fenofibrátu. Výsledné hodnoty byly v porovnání s kontrolami zvýšené o 1250 % pro CYP4A1 ($p < 0,001$), o 187 % v případě CYP4A2 ($p < 0,05$) a v případě CYP4A3 o 153 % ($p < 0,05$).

6.2.5 Cyp7a1



Graf č. 15: Exprese mRNA cytochromu P450 7A1 v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

Standardizovaný extrakt silymarinu zvýšil expresi mRNA pro CYP7A1 o 71 % (NS), mikronizovaný extrakt silymarinu signifikantně zvýšil expresi o 123 % (p < 0,05). V případě extraktu silymarinu ve formě fytosomů byl zaznamenán statisticky nesignifikantní nárůst mRNA o 64 %.

V případě standardizovaného extraktu silybinu byl zjištěn statisticky významný nárůst exprese mRNA o 196 % ($p < 0,05$). Podávání mikronizovaného silybinu nemělo statisticky významný vliv na expresi mRNA pro CYP7A1. Naopak silybin ve formě fytosomu zvýšil produkci mRNA o 247 % ($p < 0,05$).

N-3 polynenasycené mastné kyseliny nemají dle našich výsledků významný vliv na expresi mRNA u CYP7A1. V případě kombinované diety složené z n-3 PUFA a mikronizovaného silymarinu byl zjištěn mírný, ale nesignifikantní vzestup CYP7A1 mRNA (o 22 %).

Podávání fenofibrátu vedlo k inhibici exprese mRNA pro CYP7A1 o 63 % ($p < 0,01$) a dieta složená z kombinace fenofibrátu a silymarinu vedla ke snížení měřené mRNA o 65 % ($p < 0,01$).

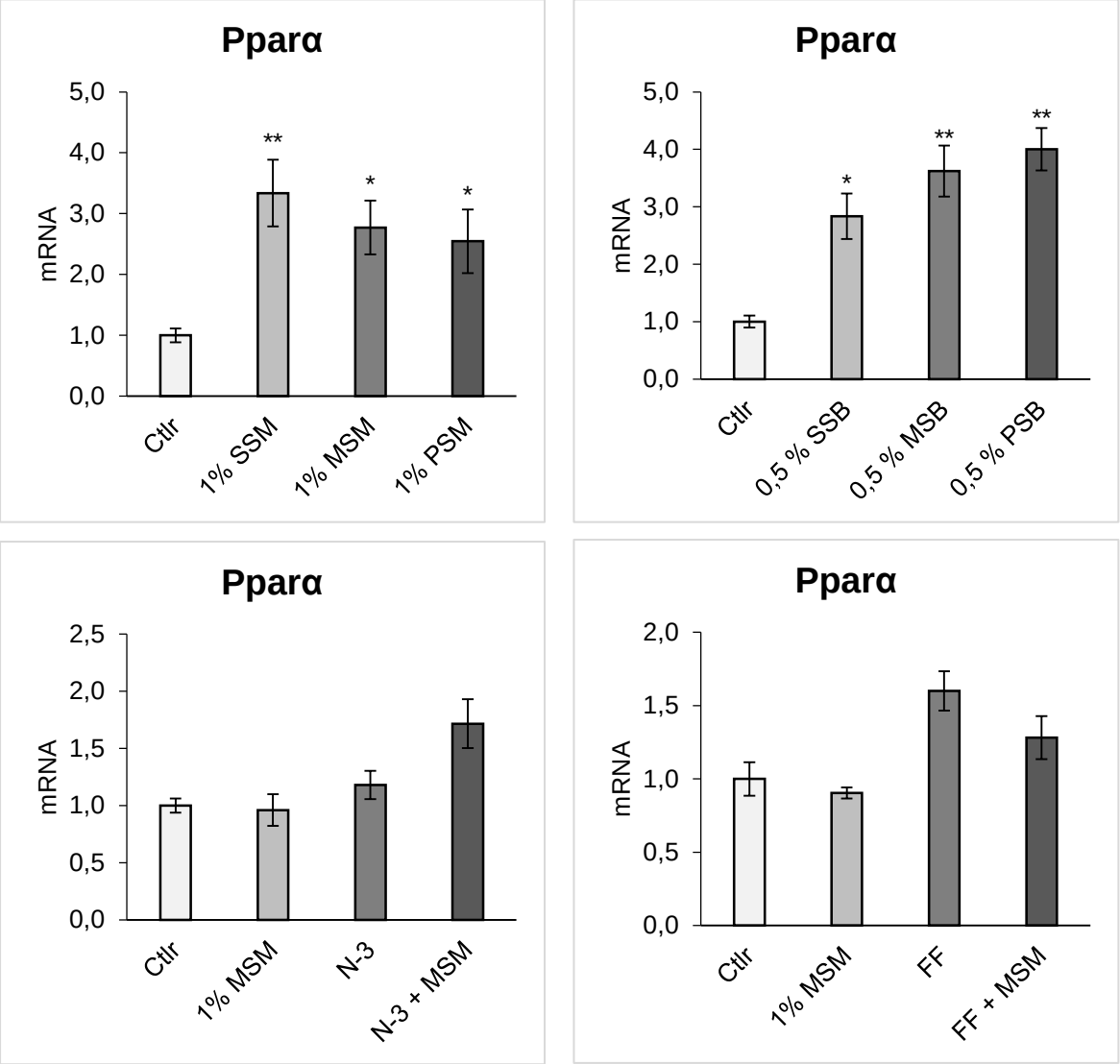
6.2.6 Pparα

Diety obohacené o různé formy silymarinu zvýšily v játrech expresi mRNA pro receptory aktivované proliferátory peroxisomů alfa (PPARα). Samotný standardizovaný extrakt silymarinu zvýšil expresi mRNA o 234 % ($p < 0,01$). Mikronizovaný extrakt silymarinu zvýšil expresi mRNA o 177 % ($p < 0,05$) a silymarin ve formě fytosomů o 155 % ($p < 0,05$).

Podobné výsledky byly získány také v případě silybinu. Všechny tři formy silybinu statisticky významně zvýšily v játrech množství mRNA pro PPARα. Konkrétní změny jsou následující: standardizovaný extrakt silybinu (+184 %; $p < 0,05$), mikronizovaný extrakt silybinu (+262 %; $p < 0,01$) a silybin ve formě fytosomů zvýšil expresi mRNA o 300 % ($p < 0,01$).

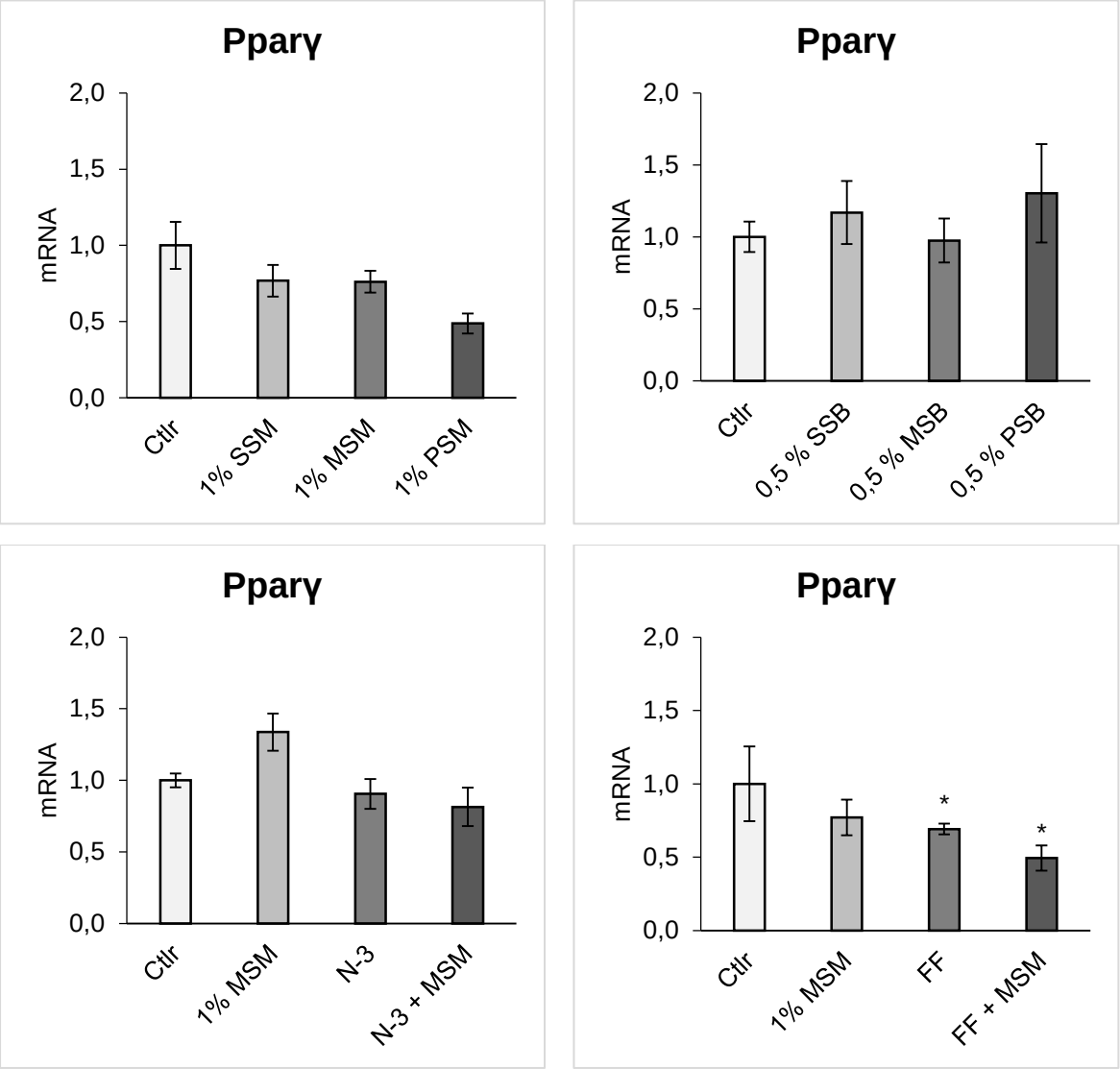
V případě podávání n-3 polynenasycených mastných kyselin nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny i přes to, že kombinace n-3 PUFA a mikronizovaného silymarinu zvýšili jaterní expresi pro PPARα o 72 %.

V rámci posledního pokusy nebyly zaznamenány statisticky významné změny v expresi jaterní mRNA pro PPARα ani v případě samotného fenofibrátu ani fenofibrátu v kombinaci s mikronizovaným silymarinem.



Graf č. 16: Exprese mRNA pro PPARα v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.2.7 Pparγ



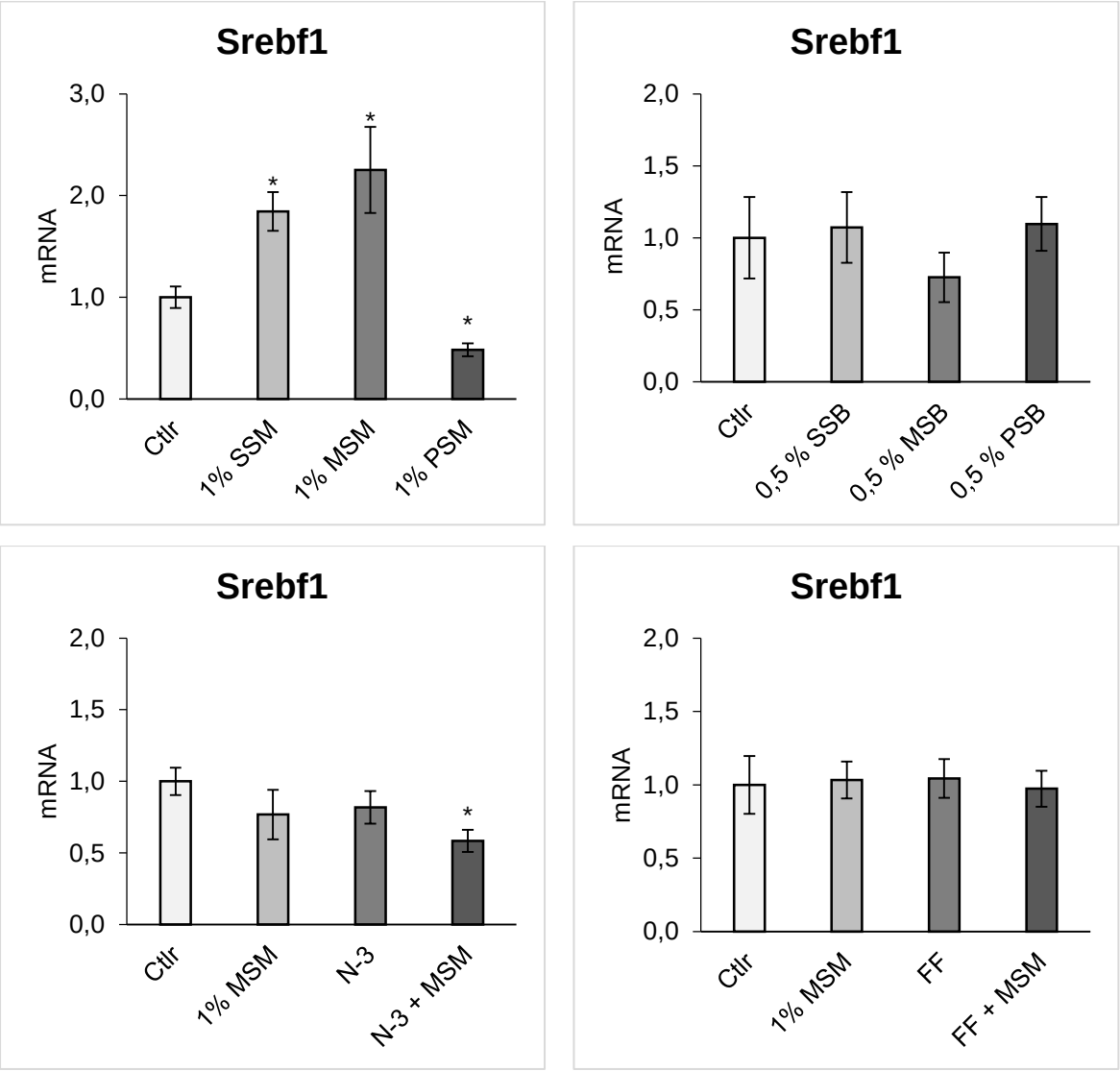
Graf č. 17: Exprese mRNA pro PPARγ v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

V případě mRNA pro jaterní receptor aktivovaný proliferátory peroxisomů gama (PPARγ) nebyly zaznamenány významné změny ani v případě silymarinu, silybinu ani v případě n-3 polynenasycených mastných kyselin.

Statisticky významný pokles mRNA pro PPARγ byl zjištěn v případě diety obohacené jak o fenofibrát samotný, také o fenofibrát v kombinaci

s mikronizovaným silymarinem. Samotný fenofibrát snížil množství mRNA pro PPARγ o 40 % ($p < 0,05$), kombinace způsobila pokles o 72 % ($p < 0,05$).

6.2.8 Srebf1



Graf č. 18: Exprese Srebf1 v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

Jaterní exprese Srebf1 byla v případě standardizovaného extraktu silymarinu významně zvýšena o 84 % ($p < 0,05$) a i v případě mikronizovaného extraktu silymarinu signifikantně zvýšena o 125 % ($p < 0,05$). Na druhou stranu silymarin ve formě fytosomů způsobil statisticky významný pokles sledované mRNA o 52 % ($p < 0,05$).

Dieta obohacená o standardizovaný extrakt silybinu, mikronizovaný silybin i silybin ve formě fytosomů významně neovlivnila expresi sledované mRNA.

Dieta obohacená o kombinaci n-3 polynenasycených mastných kyselin a mikronozovaný silymarin způsobila signifikantní pokles sledované mRNA o 42 % ($p < 0,05$). Samotné n-3 PUFA snížily mRNA sledovaného proteinu o 18 % ale bez statistické významnosti.

V případě fenofibrátu jsme změny nezaznamenali ani v případě fenofibrátu samotného ani v kombinaci s mikronizovaným silymarinem.

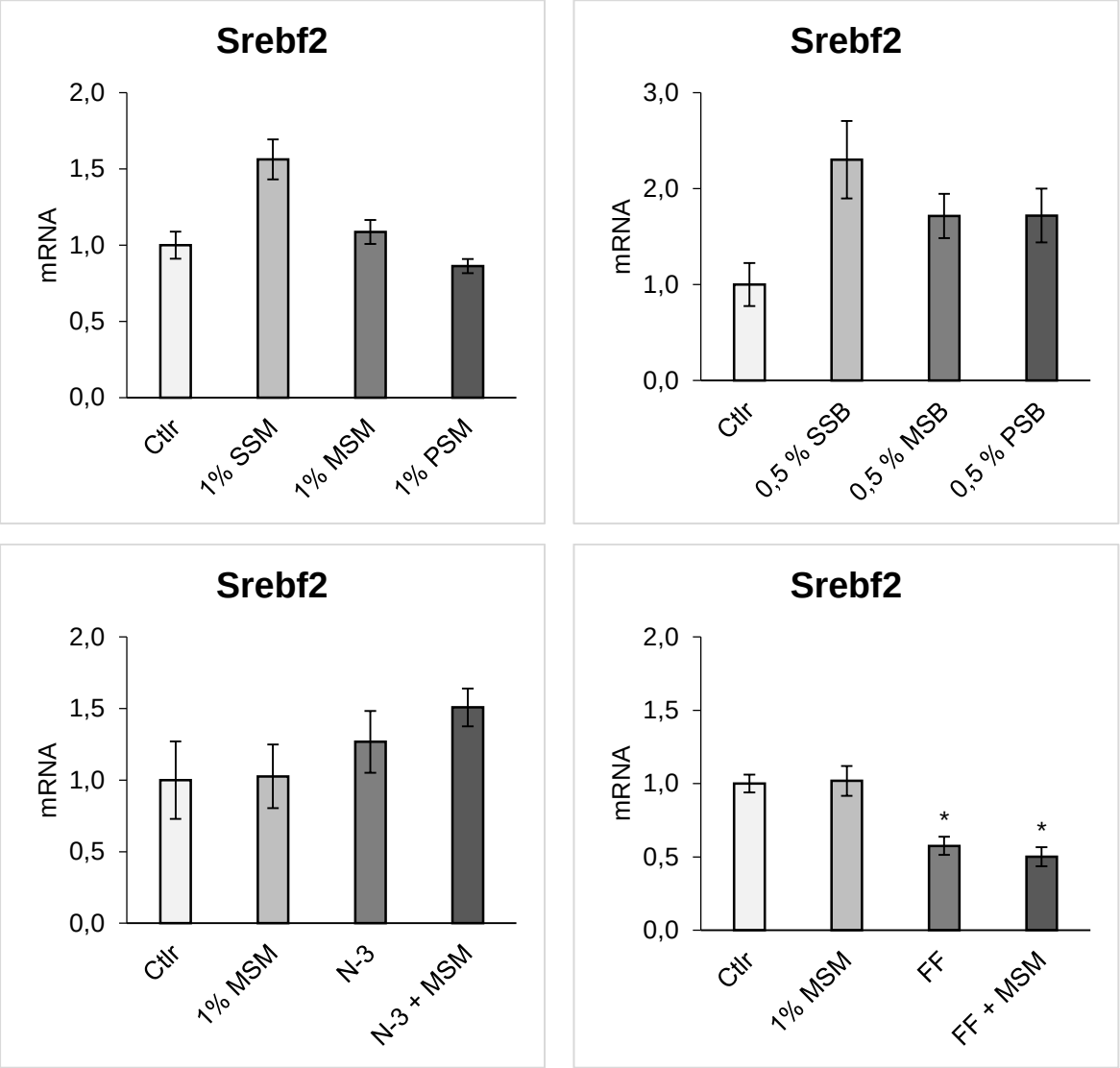
6.2.9 Srebf2

Graf č. 19 ukazuje změny v mRNA sledovaného genu Srebf2. Samotný standardizovaný extrakt silymarinu zvýšil množství mRNA o 56 % avšak bez statistické významnosti. U ostatních diet obsahujících silymarin nebyl zaznamenán významný vliv na expresi mRNA.

V případě silybinu byly získány obdobné výsledky. Standardizovaný extrakt silybinu způsobil 130% nárůst množství mRNA než v případě kontrolních zvířat. Ani tato změna nedosáhla statistické významnosti. Ostatní diety obsahující silybin neměly na množství mRNA významný vliv.

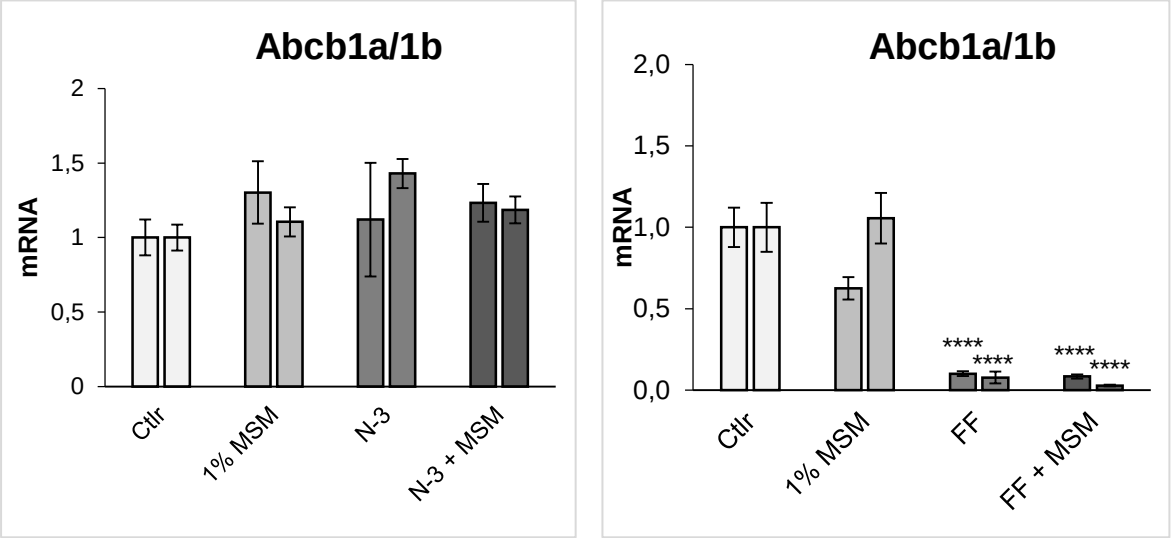
Kombinace EPA a DHA významně neovlivnila u pokusných zvířat množství mRNA pro SREBP2. Kombinace n-3 PUFA a silymarinu zvýšila expresi mRNA pro SREBP2 o 51 %, avšak tato změna nebyla statisticky významná.

Samotný fenofibrát u pokusných zvířat významně snížil množství mRNA o 42 % ($p < 0,05$) a také fenofibrát v kombinaci s mikronizovaným silymarinem signifikantně snížil expresi mRNA o 50 % ($p < 0,05$).



Graf č. 19: Exprese Srebf2 v játrech. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.2.10 Abcb1a a Abcb1b



Graf č. 20: Exprese mRNA Abcb1a a Abcb1b v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

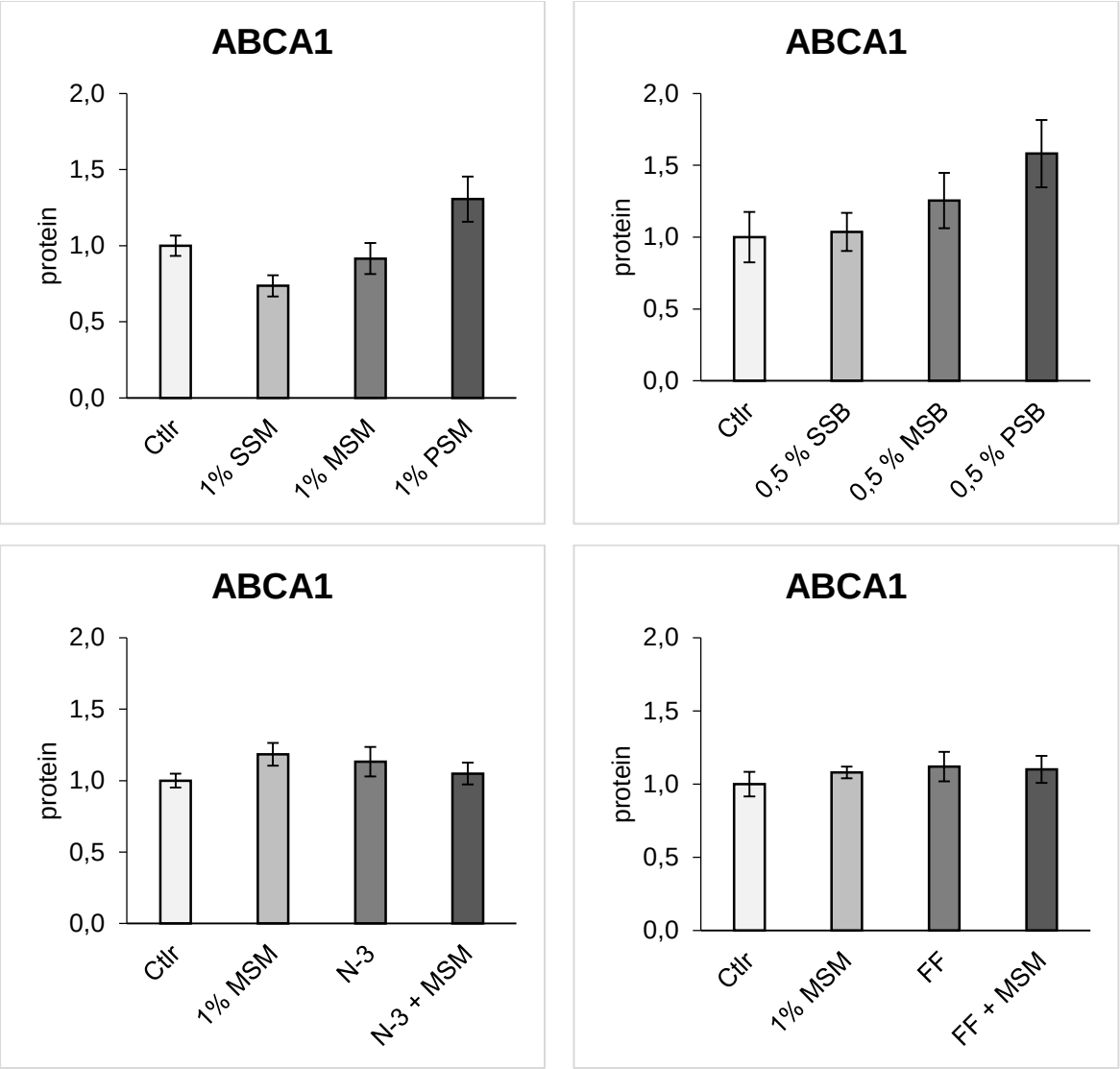
Exprese jaterních Abcb1a a Abcb1b byla měřena pouze v rámci experimentů s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami a fenofibrátem.

V případě diety obohacené o EPA či DHA nebyl zaznamenán žádný významný vliv diety na množství mRNA sledovaného transportéru.

Významné změny byly zjištěny v případě fenofibrátu. mRNA genu Abcb1a byla o 90 % ($p < 0,0001$) méně exprimována než v případě kontrol. U mRNA genu Abcb1b bylo zaznamenáno snížení exprese o 92 % ($p < 0,0001$). V případě kombinace fenofibrátu s mikronizovaným silymarinem bylo množství mRNA Abcb1a sníženo o 92 % ($p < 0,0001$) a Abcb1b sníženo o 97 % ($p < 0,0001$).

6.3 Western blot

6.3.1 ABCA1

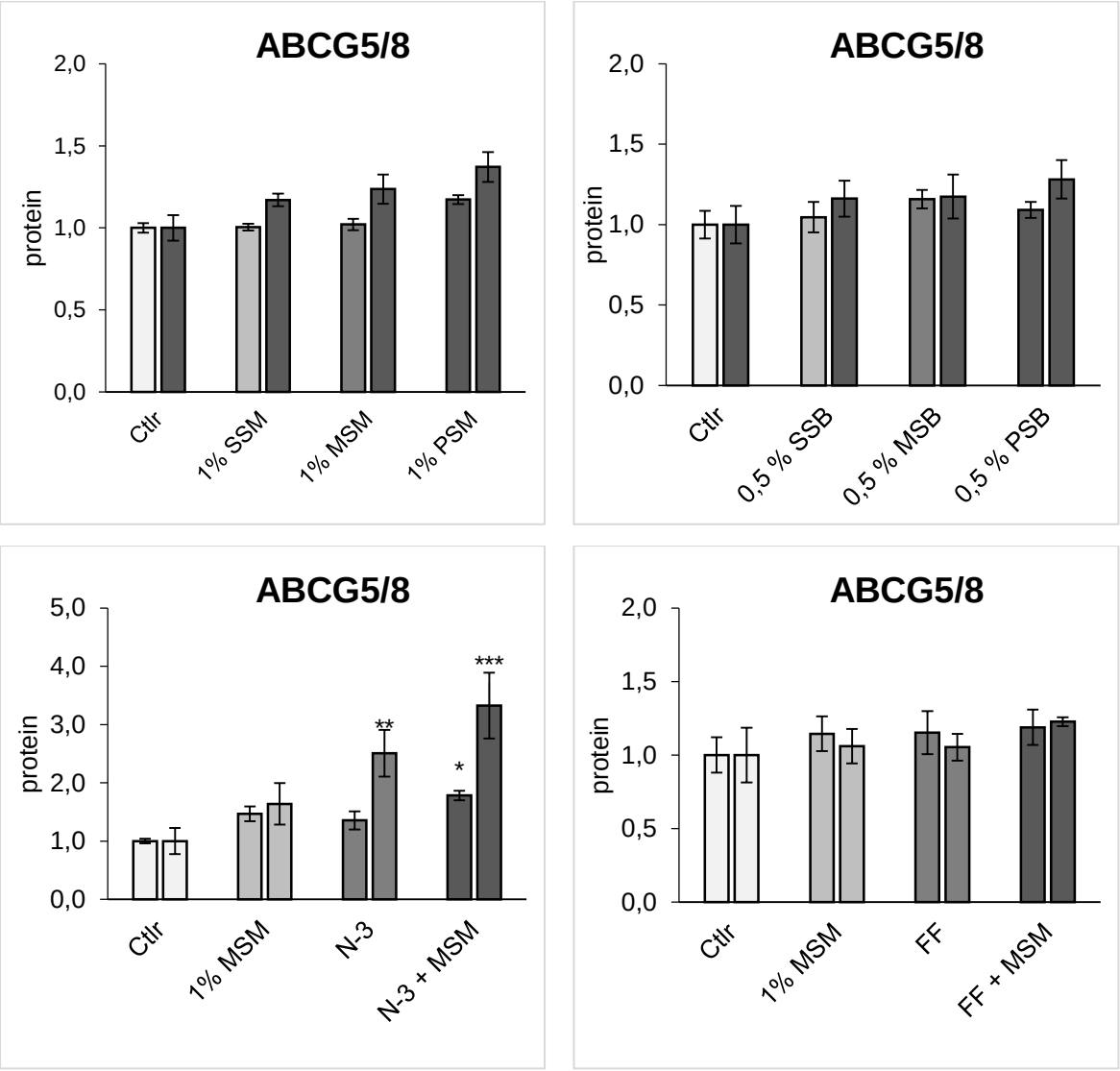


Graf č. 21: Porovnání množství proteinu ABCA1 transportéru v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

Množství proteinu transportéru ABCA1 nebylo statisticky významně ovlivněno podáním silymarinu ani silybinu. Podobně ani podání n-3 polynenasycených

mastných kyselin ani fenofibrátu nevedlo k významným změnám v množství sledovaného transportního proteinu.

6.3.2 ABCG5 a ABCG8



Graf č. 22: Porovnání množství proteinu transportérů ABCG5 a ABCG8 v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

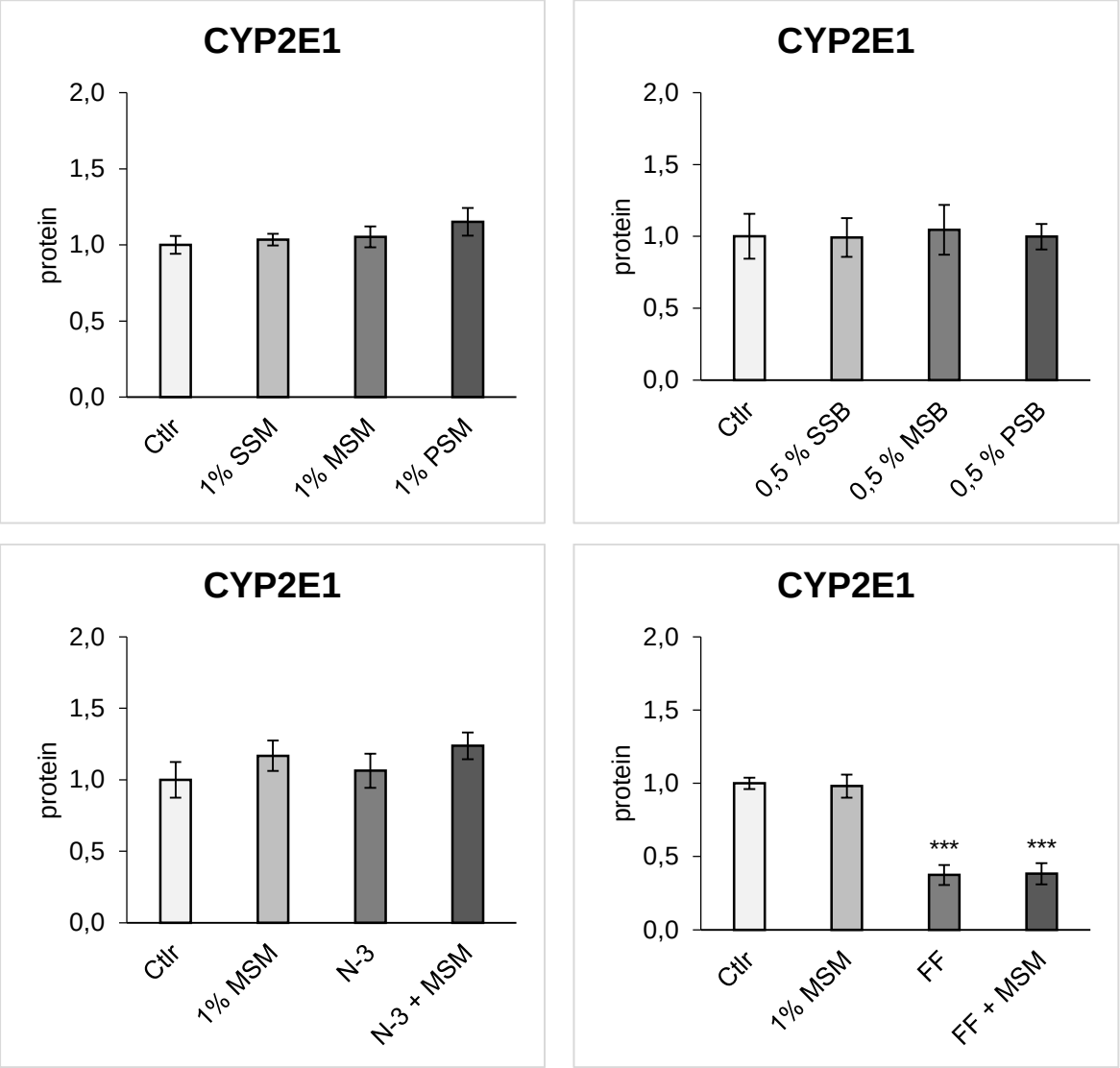
V případě standardní laboratorní diety obohacené o různé formy silymarinu i silybinu byl zaznamenán pozitivní trend ve zvyšování množství proteinu pro ABCG5 a ABCG8 transportéry. Významnější, avšak stále nesignifikantní efekt byl na ABCG8. Nejvyšší nárůst proteinu byl zaznamenán v případě diet obohacených o silymarin či silybin ve formě fytosomového extraktu.

Významné změny v množství proteinu ABCG8 transportéru byly získány u HHTg potkanů s dietou obohacenou o n-3 polynenasycené mastné kyseliny. Podání samotných n-3 PUFA signifikantně zvýšilo množství sledovaného transportéru o 150 % ($p < 0,01$) a kombinace n-3 PUFA a silymarinu významně zvýšila množství proteinu o 233 % ($P < 0,001$). U ABCG5 transportéru došlo ke statisticky významné změně pouze v případě kombinace n-3 PUFA a mikronizovaného silymarinu. Konktrétně se množství proteinu zvýšilo o 78 % ($p < 0,05$).

Výsledky naznačují, že podávání fenofibrátu nemá významný vliv na množství proteinu u sledovaného transportéru.

6.3.3 CYP2E1

V případě cytochromu P450 2E1 nebyly po podání silymarinu, silybinu ani n-3 polynenasycených mastných kyselin zaznamenány žádné statisticky významné změny v množství proteinu. Statisticky významný pokles v množství proteinu pro CYP2E1 o 63 % ($p < 0,001$) byl pozorován u zvířat, jimž byl podáván samotný fenofibrát. U zvířat, která dostávala fenofibrát v kombinaci se silymarinem byl pozorován obdobný pokles proteinu (o 62 %; $p < 0,001$).



Graf č. 23: Porovnání množství proteinu cytochromu P450 2E1 v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

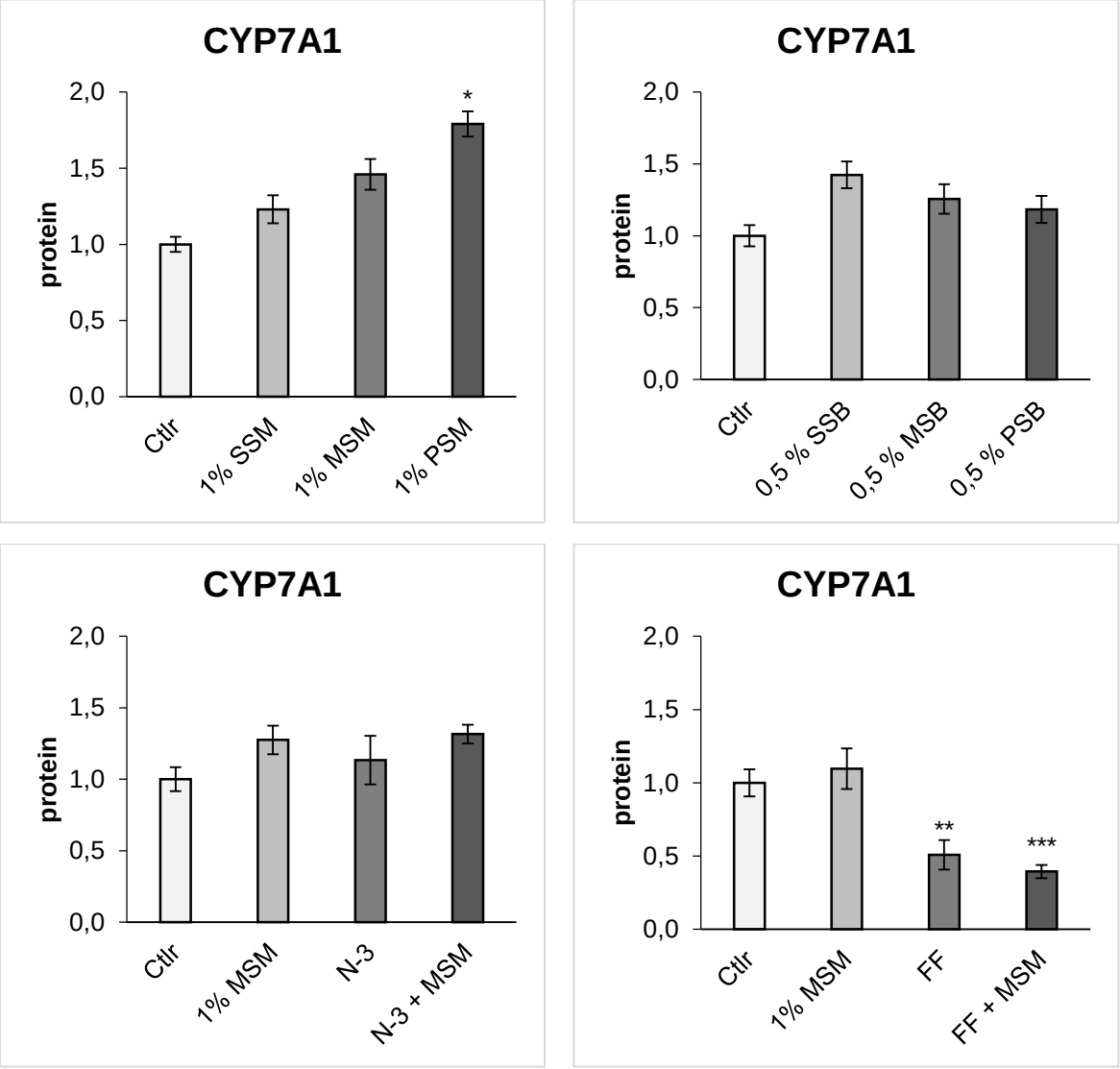
6.3.4 CYP7A1

Množství proteinu u cytochromu P450 7A1 bylo statisticky významně zvýšeno o 79 % ($p < 0,05$) u zvířat, která měla ve standardní dietě přimíchaný silymarin ve

formě fytosomového extraktu. U ostatních forem silymarinu byl pozorován trend ve zvyšování množství proteinu, avšak bez statistické významnosti.

V případě diet obohacených o různé formy silybinu a n-3 polynenasycené mastné kyseliny nebyly pozorovány významné změny mezi jednotlivými pokusnými skupinami.

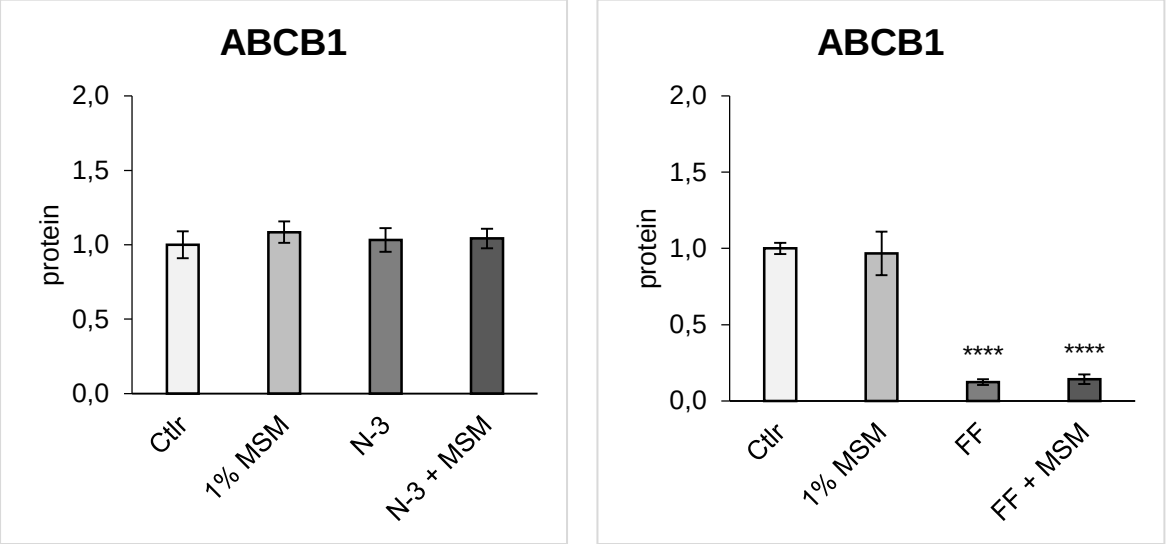
Pokus s fenofibrátem ukázal významný vliv fenofibrátu na CYP7A1. Množství proteinu bylo významně sníženo o 49 % ($p < 0,01$) u zvířat, jimž byl podáván samotný fenofibrát v dávce 100 mg/kg hmotnosti. V případě kombinace fenofibrátu a mikronizovaného silymarinu byl zaznamenán pokles množství sledovaného proteinu o 61 % ($p < 0,001$)



Graf č. 24: Porovnání množství proteinu cytochromu P450 7A1 v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, $n \geq 6$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM –

mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

6.3.5 ABCB1



Graf č. 25: Porovnání množství proteinu ABCB1 transportéru v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n ≥ 6. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. Ctrl. Ctrl – kontrola, SSM – standardizovaný silymarin, MSM – mikronizovaný silymarin, PSM – silymarin ve formě fytosomů, SSB – standardizovaný silybin, MSB – mikronizovaný silybin, PSB – silybin ve formě fytosomů, N-3 – n-3 polynenasycené mastné kyseliny, FF – fenofibrát.

Dle grafu č. 25 je zřejmé, že n-3 polynenasycené mastné kyseliny jak samotné, tak také v kombinaci s mikronizovaným silymarinem nemají významný vliv na množství transportního proteinu ABCB1.

Významné změny v množství proteinu sledovaného transportéru byly pozorovány u pokusných zvířat užívajících fenofibrát. Ve skupině, která dostávala samotný fenofibrát byl zaznamenán významný pokles množství proteinu ABCB1 o 88 % ($p < 0,0001$). U zvířat suplementovaných kombinací fenofibrátu a mikronizovaného silymarinu byl pozorován signifikantní pokles v množství proteinu o 86 % ($p < 0,0001$).

7 DISKUZE

Metabolický syndrom je komplexní onemocnění, v jehož patofyziologii má velmi důležitou roli porucha metabolické funkce tukové tkáně, poškození jater, inzulínová resistence a následná dyslipidémie. Dosud nebylo do praxe zavedeno léčivo, které by ovlivnilo veškeré komponenty metabolického syndromu. V současnosti je v léčbě užívána polyfarmakoterapie různými skupinami léčiv. Mnohá z používaných léčiv vykazují v menší či větší míře nežádoucí účinky, které mohou vést k ukončení či změně farmakoterapie. Vzhledem k rizikům farmakoterapie je vhodné hledat doplňky, které mohou příznivě ovlivnit účinnost konvenční farmakoterapie anebo snižovat riziko vzniku jejích nežádoucích účinků. Existuje mnoho látek přírodního původu, u kterých bylo v rámci experimentů na zvířatech prokázáno příznivé působení na lipidové spektrum, z toho důvodu jsem se v tématu disertační práce zaměřil na účinky silymarinu, silybinu a n-3 polynenasycených mastných kyselin.

Hlavní cíl disertační práce spočíval v objasnění působení silymarinu a jeho majoritní složky silybinu na hladiny plasmatických a jaterních lipidů, glykémii, na expresi mRNA a proteinu důležitých enzymů a transportérů ovlivňujících hladiny lipidů u modelu metabolického syndromu. Následné dílčí cíle měly objasnit vliv silymarinu při jeho současném podávání s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami či hypolipidemikem fenofibrátem. Jako experimentální model byl zvolen hereditárně hypertriglyceridemický potkan (HHTg), který je vzhledem ke zvýšené hladině triacylglycerolů, hypertenzi a poruše metabolismu glukosy akceptovaným modelem metabolického syndromu (Klimes et al., 1995; Zicha et al., 2006).

V rámci experimentů byla průběžně sledována denní spotřeba krmiva, kde nebyly zaznamenány žádné rozdíly v konzumaci jednotlivých experimentálních diet. Naše výsledky ukazují, že samotný silymarin, silybin nebo n-3 polynenasycené mastné kyseliny nemají významný vliv na hmotnost pokusných zvířat. Ačkoliv je metabolický syndrom spojený s obezitou, v rámci studií se pracovalo s neobézním modelem metabolického syndromu – HHTg potkanem. U jiných zvířecích modelů, zejména obézních na vysokotukové dietě byly publikovány studie, v nichž podání silymarinu vedlo ke snížení hmotnosti pokusných zvířat (Feng et al., 2016; Guo et al., 2016). V případě podávání fenofibrátu měla zvířata na konci pokusu výrazně nižší hmotnost. Naopak fenofibrát dle očekávání také výrazně zvýšil hmotnost jater (Balfour et al., 1990). Oproti fenofibrátu podávání silymarinu i samotného silybinu

vedlo k významnému snížení hmotnosti jater pokusných zvířat. Naše výsledky jsou v souladu s předchozími studie, v nichž silymarin či silybin upravuje patologicky vyšší hmotnost jater u modelů metabolického syndromu (Chen et al., 2012; Bouderba et al., 2014).

Disertační práce přináší pozitivní výsledky v případě ovlivnění koncentrace sérových triacylglycerolů, celkového cholesterolu a HDL cholesterolu u unikátního zvířecího modelu metabolického syndromu. Tyto účinky silymarinu a silybinu jsou již dlouhodobě studovány, avšak na rozdílných zvířecích modelech jako je např. potkan Wistar krmený vysokotukovou dietou (Skottova and Krecman, 1998; Skottova et al., 2003). Naše výsledky naznačují, že lipidové spektrum je spíše ovlivněno použitím celého extraktu silymarinu než samotného silybinu. Studie také ukázala aditivní vliv silymarinu k n-3 polynenasyceným mastným kyselinám na triacylglycerolémii. Ačkoliv účinky n-3 PUFA na lipidové spektrum jsou známy, kombinace n-3 PUFA a silymarinu byla studována poprvé. Kombinace n-3 PUFA a silymarinu statisticky významně snížila koncentraci nenasycených mastných kyselin v séru.

Samotný silymarin, n-3 PUFA, fenofibrát ani jejich kombinace neovlivnily konečnou koncentraci glukosy v séru. Statisticky významného snížení glykémie bylo dosaženo po podání samotného silybinu. Na základě výsledků práce se zdá, že silymarin příznivěji ovlivňuje lipidové parametry než silybin. Na druhou stranu silybin příznivěji ovlivňuje glykémii a insulinémii. Vliv silybinu na glykémii a insulinémii je v souladu s publikovanými studiemi (Bouderba et al., 2014; Das et al., 2014). Ačkoliv silymarin neovlivnil hodnotu glykémie, došlo u zvířat se silymarinem v potravě ke snížení insulinémie a pravděpodobně ke zvýšení citlivosti tkání k insulinu. Tyto výsledky jsou také v souladu s dříve publikovanými studiemi, v nichž silymarin ovlivnil zejména insulinémii a v některých studiích také glykémii (Bouderba et al., 2014; Das et al., 2014).

Vliv fenofibrátu na koncentraci cholesterolu a triacylglycerolů v játrech je bezpochyby známý a v rámci této disertační práce potvrzený také u hereditárně hypertriglyceridemického potkana. Známé nejsou naopak účinky kombinace fenofibrátu a silymarinu. Velkým nebezpečím léčby a současného užívání různých nutraceutik může být negativní ovlivnění účinnosti farmakoterapie. Známé jsou indukční vlivy na metabolismus, ovlivnění distribuce, případně farmakodynamické interakce. Studovaný silymarin nesnížil hypolipidemické účinky fenofibrátu, ale také

neovlivnil hepatomegalii indukovanou fibrátem, což je známý a popsaný negativní efekt fibrátů (Petit et al., 1988). V rámci disertační práce nebyly studovány další potenciálně pozitivní účinky kombinace fenofibrátu a silymarinu zejména na oxidační poškození a stres (Skottova et al., 2004). Silymarin u studovaného modelu HHTg potkana neovlivnil obsah jaterních lipidů. Výsledky jsou v rozporu s dříve námi publikovanými studie, avšak zde byly studovány účinky silymarinu u jiných zvířecích modelů, potkana Wistar na vysokotukové dietě (Skottova and Krecman, 1998; Sobolova et al., 2006).

Účinky n-3 polynenasycených mastných kyselin na hodnoty plasmatických či sérových lipoproteinů a triacylglycerolů jsou již mnoho let známy (Harris, 1997; Griffin et al., 2006). Studie, v nichž by byly sledovány současně účinky n-3 polynenasycených mastných kyselin a silymarinu zatím nebyly publikovány. V rámci disertační práce nebylo zaznamenáno negativní působení silymarinu na účinnost n-3 polynenasycených mastných kyselin. Dokonce v případě neesterifikovaných mastných kyselin byl pozorován statisticky významný aditivní vliv silymarinu na účinek n-3 PUFA. Výsledky jsou v souladu s účinkem samotných n-3 polynenasycených mastných (Farsi et al., 2014) a silymarinu (Prakash et al., 2014).

Navazující část disertační práce si kladla za cíl prozkoumat a poodhalit mechanismus působení zejména silymarinu a silybinu, ale také aditivní účinky silymarinu k n-3 polynenasyceným mastným kyselinám a fenofibrátu na enzymy, transportéry a receptory důležité v patofyziologii metabolického syndromu. Tato experimentální část byla rozdělena do dvou podsekcí, v nichž jedna se věnovala studiu vlivu látek na genovou expresi na úrovni mRNA a druhá část se věnovala vlivu látek na množství proteinu studovaných cílů.

Transportér ABCA1 se významně podílí na reverzním transportu cholesterolu. Jeho role je směřovat cholesterol do HDL částic. V dřívější publikované studii, v níž bylo potkanům na vysokotukové dietě podáván 1% extrakt standardizovaného silymarinu byl pozorován významný indukční vliv na studovaný transportér (Vecera et al., 2011). Obdobné výsledky byly získány u HHTg potkanů s dietou obohacenou o 1 % standardizovaného extraktu silymarinu a 1 % silybinu ve formě fytosomů. V případě n-3 polynenasycených mastných kyselin ani fenofibrátu nebyl zaznamenán významný vliv na expresi ABCA1. Dle recentní studie nejsou polynenasycené mastné kyseliny považovány za induktory tohoto transportéru (Fournier et al., 2017). Ačkoliv u HHTg modelu nebyl pozorován

významný vliv fenofibrátu na ABCA1, fenofibrát a ostatní aktivátory PPARα receptorů na myších hepatocytech prokázaly indukční vliv na ABCA1 transportní protein (Hossain et al., 2008). Ohledně vlivu silymarinu a jednotlivých jeho složek nejsou publikované studie jednotné. Samotný silybin B a isosilybin A jsou považovány za induktory ABCA1, zatímco ostatní složky silymarinu nemají na expresi ABCA1 významný vliv (Wang et al., 2015).

Jednou z významných eliminačních cest cholesterolu z organismu je bezpochyby jeho exkrece cestou žluče facilitovaná ABCG5 a ABCG8 transportéry. Výsledky disertační práce ukazují pozitivní vliv silymarinu na tyto transportní enzymy. Byl pozorován pozitivní vliv silymarinu ve všech formách na množství mRNA i proteinu. V případě mRNA se jednalo o statisticky významné zvýšení. Naše výsledky jsou v souladu s dříve publikovanou studií (Vecera et al., 2011). Samotný silybin neměl na studované transportéry významný vliv. V současnosti nejsou studie, které by se věnovaly konkrétnímu vlivu jednotlivých složek silymarinu, tak jako v případě ABCA1 transportéru. Na základě výsledků disertační práce lze odvozovat, že za tento pozitivní účinek jsou odpovědné ostatní složky silymarinu, pravděpodobně nikoli samotný silybin. Samotné n-3 polynenasycené mastné kyseliny signifikantně zvýšily mRNA i protein obou těchto ABCG transportérů. Přidání silymarinu vedlo k synergickému a signifikatnímu zvýšení množství mRNA i proteinu. Mastné kyseliny stejně jako deriváty cholesterolu aktivují LXR a následně zvyšují množství ABCG5 a ABCG8 transportérů (Davidson, 2006). Dle literatury je fenofibrát považován za slabý induktor exprese mRNA ABCG5 a ABCG8 transportérů (Roglans et al., 2004a). Naše výsledky ukazují, že fenofibrát samotný neovlivnil mRNA ABCG5, ale v případě ABCG8 byla mRNA významně snížena bez ohledu na suplementaci silymarinem.

Posledním sledovaným ABC transportérem byl ABCB1 neboli P-glykoprotein, který byl studován v pokusech s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami a fenofibrátem. Ačkoliv na buněčných liniích n-3 polynenasycené mastné kyseliny inhibují transportní aktivitu P-glykoproteinu (Torres-Vergara and Penny, 2018), naše výsledky u živého zvířete (*in vivo*) nenaznačují žádný jejich vliv na mRNA či množství proteinu. V případě fenofibrátu byl ovšem zaznamenán významný vliv na množství mRNA i proteinu. Literatura neuvádí, že by fenofibrát byl významným inhibitorem P-glykoproteinu, ale studie zejména na buněčných liniích naznačují, že působí mírnou down-regulaci ABCB1 transportéru (Yamazaki et al.,

2005). Navíc se zdá, že tento efekt je nezávislý na aktivaci PPARα (Kok et al., 2003). Rozporuplné informace jsou ohledně vlivu PPARα agonistů na expresi ABCB1. Ačkoliv některé studie ukazují inhibiční vliv na P-gp, jiné studie týkající se dnes již nepoužívaného klofibrátu a ABCB1 ukazují indukční vliv těchto látek (Montesinos et al., 2014; More et al., 2017). Je zapotřebí ještě definitivně objasnit vliv fenofibrátu a ostatních PPARα agonistů na tento ABCB1 transportér. Účinek fenofibrátu na P-gp může mít významný klinický dopad, neboť P-gp se významně podílí na omezení biologické dostupnosti, distribuci léčiv a podílí se na jejich exkreci (Montesinos et al., 2014; Vranckx et al., 2018). Navíc studie naznačují, že P-glykoprotein se podílí také na exkreci lipidů (Aye et al., 2009).

Další sledované cíle byly jaterní cytochromy P450. Ačkoliv silymarin ani silybin samotný významně neovlivnil mRNA či protein CYP2E1, významně zvýšil down-regulační účinek fenofibrátu na tento cytochrom P450. Silymarin bezesporu působí hepatoprotektivně i když pravděpodobně jeho účinek není zprostředkován ovlivněním CYP2E1. Naše recentní studie prokázala protektivní vliv silymarinu u myší intoxikovaných paracetamolem, ale nebyl prokázán vliv silymarinu na aktivitu ani množství proteinu CYP2E1 (Papackova et al., 2018). Obecně tedy silymarin není považován za látku ovlivňující CYP2E1 a naše výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky (Miguez et al., 1994). Studovat vliv látek na CYP2E1 je nejen u metabolického syndromu důležité. CYP2E1 se jednak podílí na aktivaci různých malých molekul a dle studií má také úlohy u jaterní steatózy, diabetu a obezity (Wang et al., 2003; Leung and Nieto, 2013).

Cytochrom P450 4A se u potkana vyskytuje ve třech formách. Konktrétně CYP4A1, 4A2 a 4A3. Tento cytochrom je významně indukován aktivátory peroxisomových receptorových proliferátorů α (PPARα). Z toho důvodu bylo u potkanů léčených fenofibrátem jasně zaznamenáno zvýšení exprese mRNA sledovaného cytochromu P450. Silymarin ani silybin nejsou považovány za aktivátory PPARα receptorů (Orolin et al., 2007), tudíž nebyly očekávány změny v expresi tohoto cytochromu P450. Navíc u silymarinu s nejvyšší biologickou dostupností ve formě fytosomů byla pozorována statisticky významná down-regulace mRNA pro CYP4A1/2/3. Obdobně silymarin tlumil indukční efekt fenofibrátu. Cytochrom P450 4A zastává důležitou úlohu v metabolismu mastných kyselin. Jedná se o alternativní cestu metabolismu kyseliny arachidonové a podílí se na omega-oxidaci mastných kyselin (Plenty et al., 2018).

CYP7A1 neboli cholesterol-7α-hydroxylasa je důležitý enzym pro syntézu žlučových kyselin. Přeměna cholesterolu na žlučové kyseliny je jedna z významných cest jeho eliminace. V našich výsledcích se pozitivní vliv projevil pouze u potkanů, kteří dostávali silymarin ve formě fytosomů, tedy silymarinu s nejvyšší biologickou dostupností. Podobné výsledky byly zaznamenány také ve studii se silymarinem u rybího zvířecího modelu (Xiao et al., 2017). V rámci našich pokusů silybin ani n-3 polynenasycené mastné kyseliny významně neovlivnily expresi sledovaného enzymu. Na druhou stranu byl zaznamenán významný pokles mRNA i proteinu u pokusných zvířat, kterým byl v rámci pokusu podáván fenofibrát. Sledovaný vliv fenofibrátu nebyl ovlivněn současným podáním silymarinu. Naše výsledky jsou v souladu s dříve publikovanou studií provedenou u pacientů užívajících fenofibrát, bezafibrát či gemfibrozil s plánovanou cholecystektomií, u nichž byla pozorována také down-regulace CYP7A1 (Roglans et al., 2004b).

V rámci disertační práce jsme pozorovali mírný indukční vliv silymarinu i silybinu na expresi PPARα na úrovni mRNA. I přes to, že byl zaznamenán indukční vliv, zvýšená aktivace nebyla pozorována. Na druhou stranu po podání obou látek byla pozorována mírná nesignifikantní down-regulace PPARγ. Tyto jaderné receptory ve spolupráci s jejich agonisty a retinoid X receptorem (RXR) zvyšují transkripci lipolytických enzymů (Tan et al., 2005). Známými aktivátory PPARα receptorů jsou hypolipidemika fibráty. Fenofibrát podávaný HHTg potkanům významně neovlivnil expresi sledovaných jaderných receptorů, avšak významně ovlivnil transkripci genů regulovaných PPARα receptory. Významný vliv byl pozorován právě na expresi CYP4A1. Naše závěry jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky na kmeni potkana Wistar na vysokotukové dietě (Orolin et al., 2007). Opačný vliv silymarinu a silybinu na jednotlivé subtypy sledovaných jaderných receptorů potvrzuje jejich odlišnou autoregulaci (Valmaseda et al., 1999).

Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) jsou faktory regulující transkripci genů důležitých v syntéze lipidů a cholesterolu. Dva geny Srebf1 a Srebf2 kódují celkem tři proteiny SREBP-1a, SREBP-1c a SREBP-2. Podání standardizovaného a mikronizovaného silymarinu u HHTg potkana významně up-regulovalo transkripci Srebf1. Na druhou stranu silymarin ve formě fytosomů u stejného kmene potkana způsobil statisticky významnou down-regulaci sledované mRNA. Dvě recentní studie provedené s potkany kmene Wistar s indukovaným diabetem či prediabetem naznačují, že tento model je pravděpodobně mnohem

vnímavější k podání silymarinu než námi použitý kmen HHTg, neboť ukazují významný down-regulační vliv silymarinu na SREBP-1c, což vede ke snížení akumulace lipidů (Prakash et al., 2014; Kheiripour et al., 2018). U kmene HHTg podání silybinu v jakékoliv formě nemělo významný vliv na expresi sledované mRNA pro SREBP-1. Recentní studie sledovala vliv silybinu u buněčných kultur potkaního insulinomu (Chen et al., 2014). Ačkoliv autoři pozorovali down-regulaci SREBP-1c, u našeho modelu tyto změny zaznamenány nebyly. Nutno podotknout, že výsledky experimentů provedené na buněčných kulturách a živém zvířeti se mohou vzájemně odlišovat. Podání silymarinu ani silybinu nemělo významný vliv na expresi Srebf-2. Na druhou stranu dostupná literatura žádný významnější vliv nepopisuje.

Po podání n-3 polynenasycených mastných kyselin nebyl pozorován významný vliv na expresi Srebf1 ani Srebf2. V případě kombinace n-3 PUFA a 1% mikronizovaného silymarinu byl zaznamenán mírní ale statisticky významný pokles mRNA pro SREBP-1. Down-regulace Srebf1 v tomto případě koreluje se změnou sérových koncentrací cholesterolu a lipidů.

Ačkoliv fenofibrát samotný ani v kombinaci s 1% mikronizovaným silymarinem významně neovlivnil expresi mRNA pro SREBP-1, došlo k významné down-regulaci mRNA pro SREBP-2. Pozorovaný efekt se pravděpodobně může spolupodílet na hypolipidemickém účinku fenofibrátu. Podobný efekt byl pozorován u kmene potkanů Wistar krmených vysokotukovou dietou, kteří dostávali fenofibrát (Li and Wu, 2018).

8 ZÁVĚR

Hereditárně hypertriglyceridemický (HHTg) potkan patří mezi unikátní modely metabolického syndromu. Vzhledem k tomu, že se nejedná o velmi rozšířený zvířecí model, existují do jisté míry omezené informace o účincích různých látek u tohoto experimentálního modelu. V rámci disertační práce byly studovány účinky samostatně podávaného silymarinu, silybinu a silymarinu v kombinaci s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami a fenofibrátem u výše zmíněného zvířecího modelu metabolického syndromu. Nejprve byly porovnávány účinky různých farmaceutických forem silymarinu a silybinu (standardní, mikronizovaná a fytosomová).

Výsledky úvodní části práce ukazují, že účinek silymarinového komplexu je vyšší ve srovnání se samotným silybinem. Toto zjištění naznačuje, že samotný silybin pravděpodobně nemůže být odpovědný za veškeré pozitivní účinky silymarinu. Silymarinový komplex působil účinněji hypolipidemicky než samotný silybin. Na druhou stranu samotný silybin významněji snižoval glykémii a insulinémii, dokonce více než v případě podávaného silymarinu. Na molekulární úrovni nebyly zaznamenány významné odlišnosti mezi účinkem silymarinu a silybinu, např. v ovlivnění exprese mRNA a proteinu u CYP2E1 či Srebf2.

Pro svůj komplexní účinek byl pro další studium zvolen silymarin. Konkrétně mikronizovaná forma byla vybrána z důvodů vyšší biologické dostupnosti a výraznějšího působení na lipidové spektrum u HHTg potkana než v případě standardizovaného extraktu. I přes to, že v rámci disertační práce se nestanovovala biologická dostupnost jednotlivých farmaceutickým forem silymarinu, lze biologickou dostupnost odvozovat dle míry účinku a vlivu na molekulární úrovni v játrech. Z hlediska účinnosti se zdá být mikronizovaná a fytosomovaná forma silymarinu účinnější než konvenční standardizovaný extrakt. Byly zaznamenány významné odlišnosti jednotlivých farmaceutických forem silymarinu ve vlivu na lipidové parametry a také rozdílné účinky na expresi mRNA či proteinu sledovaných cílů. Např. u cytochromu P450 7A1 či Srebf1.

V následující části disertační práce byla vybraná forma silymarinu podávána současně s jinými hypolipidemicky působícími látkami. První vybranou látkou byly n-3 polynenasycené mastné kyseliny – konkrétně směs EPA a DHA. V druhém případě bylo zvoleno léčivo fenofibrát. Již samotné n-3 PUFA působily

hypolipidemicky, avšak v kombinaci se silymarinem byly účinky významnější. Výraznější účinky se projevili jak na sledovaných lipidových parametrech, tak na účincích na molekulární úrovni, zejména na množství mRNA a proteinu ABCG5/8, efluxního transportéru pro cholesterol.

V poslední části práce byl mikronizovaný silymarin podáván současně s fenofibrátem. Cílem bylo zjistit, zda silymarin potencuje či naopak snižuje účinnost současně podaného fenofibrátu. Porovnání mezi zvířaty, která dostávala fenofibrát samotný a fenofibrát v kombinaci se silymarinem se výsledky statisticky významně nelišily. Fenofibrát mimo příznivých účinků na lipidové spektrum významně down-reguloval množství mRNA i protein cytochromu P450 2E1, CYP7A1 či P-glykoproteinu.

Z výsledků získaných během disertační práce je zřejmá vyšší účinnost silymarinového komplexu v mikronizované farmaceutické formě. Směs silymarinu působí komplexněji než samotný vyextrahovaný silybin.

V rámci disertační práce současně podávaný silymarin podpořil účinnost n-3 polynenasycených mastných kyselin. V případě lipidových parametrů se jednalo většinou o statisticky nesignifikantní efekt, avšak významný vliv kombinace byl u ABCG5/8 transportéru. U zvířat, jimž byl podáván fenofibrát a silymarin nedošlo k negativnímu ovlivnění účinnosti fenofibrátu silymarinem. Silymarin je tedy bezpečná látka, která negativně neovlivňuje současnou farmakoterapii zaměřenou zejména na zvýšené triacylglyceroly a může tlumit některé nežádoucí efekty působené fibráty – indukce CYP4A.

9 SOUHRN

Metabolický syndrom patří mezi významné problémy současného zdravotního stavu populace. Jedná se multifaktoriální onemocnění, které nemá jednoduchou léčbu. V terapii se uplatňují významně hypolipidemika, antidiabetika a jiná léčiva samostatně ovlivňující komponenty metabolického syndromu. Problémem polyfarmakoterapie je zvýšené riziko nežádoucích účinků. Z tohoto důvodu mohou současně podávaná nutraceutika pozitivně ovlivňovat účinnost či bezpečnost těchto léčiv. Mezi potenciálně vhodné přírodní látky patří silymarin a n-3 polynenasycené mastné kyseliny. Tyto látky již v mnoha studiích prokázaly pozitivní účinky, avšak jejich kombinace nebyla dosud použita v rámci žádné studie. Taktéž v rámci základního výzkumu nebyla použita kombinace silymarinu a hypolipidemika fenofibrátu.

Studie byla rozdělena do čtyř fází. V první fázi byly studovány účinky různých farmaceutických forem silymarinu a silybinu (standardní, mikronizovaná a fotosomová) na modelu metabolického syndromu – HHTg potkan. V rámci této fáze se podařilo prokázat, že s vyšší biologickou dostupností jsou účinky silymarinu i silybinu významnější a prospěšnější. Silymarin je dle výsledků studie účinnější než silybin. Mikronizovaný silymarin potencoval účinky n-3 polynenasycených mastných kyselin. Potenciace se týkala hypolipidemických účinků i účinků na molekulární úrovni. Nejvýrazněji se tato kombinace podílela na zvýšení obsahu mRNA a proteinu jaterních ABCG5 a ABCG8 transportérů. Mikronizovaný silymarin nesnižoval hypolipidemické účinky fenofibrátu, nevedl ke zvýšení jeho hypolipidemických účinků, ale tlumil jeho nežádoucí efekty na CYP4A.

Z výsledků vyplývá, že přidání silymarinu k n-3 polynenasyceným mastným kyselinám může působit příznivě a podpořit jejich účinek. Jeho přidání k fenofibrátu již významně nezvyšuje účinnost hypolipidemika.

10 SUMMARY

Metabolic syndrome is a complex disease with many symptoms including hyperlipidemia, hyperglycemia, and others. Patients suffering from metabolic syndrome are in higher cardiovascular risk and the risk of the development of diabetes type 2. There is not a single drug that can affect all components of metabolic syndrome. Thus patients have to use more drugs with a high risk of drug-drug interactions and potential unwanted effects. Nutraceuticals with minimal toxicity are a possible way how to reduce these unwanted effects. These nutraceuticals may reduce the sufficient dose of drugs or alleviate the side effects of conventional treatment. In the many studies, silymarin and n-3 polyunsaturated fatty acids showed positive effects on lipoprotein profile, although their combination was not been yet tested. Similarly, the additive effects of silymarin on fibrate treatment was not been tested. At first, the effects of various pharmaceutical forms of silymarin and silybin were tested. It was proofed that silymarin and silybin with improved bioavailability provide pronounced effects on lipoprotein profile in HHTg rat. It seems that silymarin is more effective than silybin. The pharmaceutical form of silymarin with the most pronounced effects was chosen for the subsequent measurements. The effects of micronized silymarin in combination with n-3 polyunsaturated fatty acids and fenofibrate were determined. According to results, silymarin potentiates the hypolipidemic action of n-3 PUFA. The most pronounced effects were seen on ABCG5 and ABCG8 transporters. Micronized silymarin did not lower the hypolipidemic action of fenofibrate and alleviated its negative CYP4A induction.

According to results, silymarin may enhance the effectiveness of n-3 PUFA and combination of silymarin and fenofibrate was not inferior to fenofibrate alone.

11 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Původní práce v časopisech s IF

Poruba M, Kazdová L, Oliyarnyk O, Malinská H, Matušková Z, Tozzi Di Angelo I, Škop V, Večeřa R. Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. Xenobiotica 2015: 45(9), 751-6.

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. Physiological Research 2015: 64, S507-S512.

Papackova Z, Heczkova M, Dankova H, Sticova E, Lodererova A, Bartonova L, **Poruba M**, Cahova M. Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. PLoS One 2018: 13(1), e0191353.

Původní práce a souborné články v časopisech bez IF

Matušková Z, **Poruba M,** Anzenbacher P. Cytochromes P450 in the main role in a metabolism of cholesterol. Klinicka Farmakologie a Farmacie 2014: 28(4), 142-146.

Urbánek K, **Poruba M**, Štrbová P. Effect of the infusion system on the quality of parenteral treatment. Klinicka Farmakologie a Farmacie 2014: 28(1), 26-30.

Štrbová P, Šiller M, Urbánek K, **Poruba M**. Residual volumes and final weights in different types of plastic infusion containers. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2016: 8(3), 293-6.

Gallo J, Horák P, **Poruba M**. Glukosamin, chondroitinsulfát a metylsulfonylmetan v prevenci a léčbě artrózy kolena. Medicína a umění 2017: 10(2), 19-22.

Matalová P, **Poruba M**. Léčba horečky u dětí. Praktické lékárenství 2018:14(1), 16-8.

Matalová P, Navrátilová D, **Poruba M**. Stručný přehled farmakologických možností léčby bolesti u dětí. Praktické lékárenství 2018: 14(2), 52-4.

Abstrakta a příspěvky na konferencích

Poruba M, Kazdová L, Zachařová A, Matušková Z, Oliyarnyk O, Škottová N, Anzenbacher P, Večeřa R. Silymarin up-reguluje cytochrom P450 u hypertriglyceridemických potkanů. Atherosklerosa (Praha 2013): 47-50.

Poruba M, Kazdová L, Škop V, Matušková Z, Večeřa R. Pozitivní vliv různých lékových forem silymarinu - inhibice cytochromu P450 2E1. Atherosklerosa (Praha 2014): 38-41.

Poruba M, Kazdová L, Oliyarnik O, Malínská H, Anzenbacher P, Matušková Z, Večeřa R. Vliv různých lékových forem silymarinu na plazmatické hladiny lipidů u HHTg potkana. Farmakologické dny (Martin 2014): 81.

Matušková Z, **Poruba M**, Švandová A, Kazdová L, Večeřa R, Anzenbacher P. Comparison of protein expression and activity of CYP3A and CYP2E1 in different rat models. TOXCON (Bratislava 2015): 34

Poruba M, Matušková Z, Kazdová L, Oliyarnik O, Malínská H, Večeřa R. Positive effects of different drug formulation of silybin in the treatment of metabolic syndrome. Farmakologické dny (Praha 2015): 22.

Večeřa R, **Poruba M**, Kazdová L, Škop V, Matušková Z. Ovlivnění cytochromu P450 2E1 silymarinem - porovnání dvou modelů metabolického syndromu. Farmakologické dny (Praha 2015): 25.

Oliyarnyk O, Malinska H, Trnovska J, Škop V, Kazdova L, **Poruba M**, Večeřa R. Effect of micronized extract and phytosomes containing silybin on inflammation and oxidative stress in non-obese model of metabolic syndrome. Atherosklerosa (Praha 2015): 41-5.

Poruba M, Matušková Z, Kazdová L, Oliyarnik O, Malínská H, Večeřa R. Silybin ameliorates dyslipidemia and hyperglycemia in a rat model of metabolic syndrome. Atherosklerosa (Praha 2015): 49.

Malínská H, Trnovská J, Škop V, Kazdová L, **Poruba M**, Večeřa R. The effect of ovariectomy on the development of hepatic steatosis and brown adipose tissue activity. Atherosklerosa (Praha 2015): 32-5.

Matušková Z, **Poruba M**, Kazdová L, Večeřa R. The effect of silymarin on the expression of peroxisome proliferator-activated receptors in hypertriglyceridemic rats. Farmakologické dny (Brno 2016): 104.

Poruba M, Kazdová L, Matušková Z, Večeřa R. Vliv kombinace silymarinu a polynenasycených mastných kyselin na expresi jaterních transportérů Abca1, Abcg5 a Abcg8 u modelu metabolického syndromu. Farmakologické dny (Brno 2016): 129.

Večeřa R, Matušková Z, Kazdová L, Oliyarnyk O, Malínská H, Škop V, **Poruba M**. ABCA1 transporter expression in the liver of ovariectomized rats. Farmakologické dny (Brno 2016): 167.

Matušková Z, **Poruba M**, Kazdová L, Oliyarnyk O, Škop V, Večeřa R. Vliv silymarinu, n-3 polynenasycených mastných kyselin a jejich kombinace na expresi mRNA vybraných jaterních transportních proteinů u hereditárně hypertriglyceridemického potkana. Atherosklerosa (Praha 2016): 31-4.

Poruba M, Kazdová L, Oliyarnik O, Malínská H, Matušková Z, Večeřa R. Effects of silymarin and PUFA on important enzymes and receptors in lipid homeostasis. Farmakologické dny (Stará Lesná 2017): 41-2.

Matušková Z, **Poruba M**, Kazdová L, Malínská H, Večeřa R. The influence of polyunsaturated fatty acids and silymarin on ABCG5/8 protein expression in the rat intestine. Farmakologické dny (Stará Lesná 2017): 36.

Matušková Z, Kazdová L, Marková I, Hüttl M, Malínská H, Trnovská J, Oliyarnyk O, **Poruba M**, Večeřa R. Vliv kombinované terapie silymarinem a fenofibrátem na metabolické poruchy u neobézního modelu metabolického syndromu. Atherosklerosa (Praha 2017): 37-42.

Oliyarnyk O, Malínská H, Marková I, Trnovská J, Hüttl M, Škop V, Matušková Z, **Poruba M**, Večeřa R, Kazdová L, Haluzík M. Combination of silymarin with n-3 polyunsaturated fatty acids improves metabolic disorders in hereditary hypertriglyceridemic rats. Atherosklerosa (Praha 2017): 43-7.

Poruba M, Rácová Z, Hüttl M, Kazdová L, Večeřa R. Effect of fenofibrate and silymarin on P-glycoprotein in rats. Farmakologické dny (Hradec Králové 2018): 90-1.

Večeřa R, Poruba M, Rácová Z, Hüttl M, Kazdová L. Silymarin positively influenced the expression of nrf2 in rat suffering from metabolic syndrome. Farmakologické dny (Hradec Králové 2018): 138-9.

12 LITERATURA

(2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 285(19)**,** 2486-2497.

AbouZid, S.F., Chen, S.-N., and Pauli, G.F. (2016). Silymarin content in Silybum marianum populations growing in Egypt. *Industrial Crops and Products* 83**,** 729-737. doi: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.012.

Akash, M.S., Rehman, K., and Chen, S. (2013). Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 9(5)**,** 387-396.

Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., et al. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16)**,** 1640-1645. doi: 10.1161/circulationaha.109.192644.

Alberti, K.G., Zimmet, P., and Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23(5)**,** 469-480. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x.

Altmann, S.W., Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303(5661)**,** 1201-1204. doi: 10.1126/science.1093131.

Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., Hasty, A.H., Okazaki, H., et al. (2000). Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J Biol Chem* 275(40)**,** 31078-31085. doi: 10.1074/jbc.M005353200.

Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58(5-6)**,** 737-747.

Aye, I.L., Singh, A.T., and Keelan, J.A. (2009). Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chem Biol Interact* 180(3)**,** 327-339. doi: 10.1016/j.cbi.2009.04.012.

Balfour, J.A., McTavish, D., and Heel, R.C. (1990). Fenofibrate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs* 40(2)**,** 260-290. doi: 10.2165/00003495-199040020-00007.

Balk, E.M., Lichtenstein, A.H., Chung, M., Kupelnick, B., Chew, P., and Lau, J. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis* 189(1)**,** 19-30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.012.

Barter, P.J., Brandrup-Wognsen, G., Palmer, M.K., and Nicholls, S.J. (2010). Effect of statins on HDL-C: a complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database. *J Lipid Res* 51(6)**,** 1546-1553. doi: 10.1194/jlr.P002816.

Biedermann, D., Vavrikova, E., Cvak, L., and Kren, V. (2014). Chemistry of silybin. *Nat Prod Rep* 31(9)**,** 1138-1157. doi: 10.1039/c3np70122k.

Billman, G.E., Kang, J.X., and Leaf, A. (1997). Prevention of ischemia-induced cardiac sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Lipids* 32(11)**,** 1161-1168.

Björkhem, I., Andersson, U., Ellis, E., Alvelius, G., Ellegård, L., Diczfalusy, U., et al. (2001). From brain to bile: Evidence that conjugation and ω-hydroxylation are important for elimination of 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) in humans. *Journal of Biological Chemistry* 276(40)**,** 37004-37010. doi: 10.1074/jbc.M103828200.

Björkhem, I., Lütjohann, D., Diczfalusy, U., Ståhle, L., Ahlborg, G., and Wahren, J. (1998). Cholesterol homeostasis in human brain: Turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *Journal of Lipid Research* 39(8)**,** 1594-1600.

Bolt, H.M., Roos, P.H., and Thier, R. (2003). The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *Int Arch Occup Environ Health* 76(3)**,** 174-185. doi: 10.1007/s00420-002-0407-4.

Bouderba, S., Sanchez-Martin, C., Villanueva, G.R., Detaille, D., and Koceir, E.A. (2014). Beneficial effects of silibinin against the progression of metabolic syndrome, increased oxidative stress, and liver steatosis in Psammomys obesus, a relevant animal model of human obesity and diabetes. *J Diabetes* 6(2)**,** 184-192. doi: 10.1111/1753-0407.12083.

Breckenridge, W.C., Little, J.A., Steiner, G., Chow, A., and Poapst, M. (1978). Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N Engl J Med* 298(23)**,** 1265-1273. doi: 10.1056/nejm197806082982301.

Burdge, G.C., and Calder, P.C. (2005). Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 45(5)**,** 581-597. doi: 10.1051/rnd:2005047.

Cederbaum, A.I. (2006). CYP2E1--biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med* 73(4)**,** 657-672.

Clayton, P.T. (1998). Disorders of cholesterol biosynthesis. *Archives of Disease in Childhood* 78(2)**,** 185.

Contreras, A.V., Torres, N., and Tovar, A.R. (2013). PPAR-α as a Key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation. *Advances in Nutrition* 4(4)**,** 439-452. doi: 10.3945/an.113.003798.

Cox, R.A., and Garcia-Palmieri, M.R. (1990). "Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins," in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations,* eds. rd, H.K. Walker, W.D. Hall & J.W. Hurst. (Boston: Butterworths

Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing.).

Das, S., Roy, P., Pal, R., Auddy, R.G., Chakraborti, A.S., and Mukherjee, A. (2014). Engineered silybin nanoparticles educe efficient control in experimental diabetes. *PLoS One* 9(7)**,** e101818. doi: 10.1371/journal.pone.0101818.

Davidson, M.H. (2006). Mechanisms for the Hypotriglyceridemic Effect of Marine Omega-3 Fatty Acids. *The American Journal of Cardiology* 98(4, Supplement 1)**,** 27-33. doi: https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.12.024.

Davidson, M.H., Dillon, M.A., Gordon, B., Jones, P., Samuels, J., Weiss, S., et al. (1999). Colesevelam hydrochloride (cholestagel): a new, potent bile acid sequestrant associated with a low incidence of gastrointestinal side effects. *Arch Intern Med* 159(16)**,** 1893-1900.

Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 279(32)**,** 33586-33592. doi: 10.1074/jbc.M405817200.

DeBose-Boyd, R.A., Ou, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2001). Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4)**,** 1477-1482. doi: 10.1073/pnas.98.4.1477.

DeFronzo, R.A., and Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14(3)**,** 173-194.

Demaison, L., Blet, J., Sergiel, J.P., Gregoire, S., and Argaud, D. (2000). Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on contractile function of hearts isolated from sedentary and trained rats. *Reprod Nutr Dev* 40(2)**,** 113-125.

Dietschy, J.M. (1984). Regulation of cholesterol metabolism in man and in other species. *Klinische Wochenschrift* 62(8)**,** 338-345. doi: 10.1007/bf01716251.

Doege, H., and Stahl, A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 21**,** 259-268. doi: 10.1152/physiol.00014.2006.

Dohmen, K., Wen, C.Y., Nagaoka, S., Yano, K., Abiru, S., Ueki, T., et al. (2005). Fenofibrate-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology* 11(48)**,** 7702-7703. doi: 10.3748/wjg.v11.i48.7702.

Draye, J.-P., and Vamecq, J. (1989). The glyconeogenicity of fatty acids in mammals. *Trends in Biochemical Sciences* 14(12)**,** 478-479. doi: https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90176-X.

Du, X.M., Kim, M.J., Hou, L., Le Goff, W., Chapman, M.J., Van Eck, M., et al. (2015). HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export. *Circ Res* 116(7)**,** 1133-1142. doi: 10.1161/circresaha.116.305485.

Duane, W.C., and Javitt, N.B. (1999). 27-Hydroxycholesterol: Production rates in normal human subjects. *Journal of Lipid Research* 40(7)**,** 1194-1199.

El Sherif, F., Khattab, S., Ibrahim, A.K., and Ahmed, S.A. (2013). Improved silymarin content in elicited multiple shoot cultures of Silybum marianum L. *Physiol Mol Biol Plants* 19(1)**,** 127-136. doi: 10.1007/s12298-012-0141-7.

Farsi, P.F., Djazayery, A., Eshraghian, M.R., Koohdani, F., Saboor-Yaraghi, A.A., Derakhshanian, H., et al. (2014). Effects of supplementation with omega-3 on insulin sensitivity and non-esterified free fatty acid (NEFA) in type 2 diabetic patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 58(4)**,** 335-340.

Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000). "Introduction to Lipids and Lipoproteins," in *Endotext,* eds. L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer & A. Vinik. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.).

Feng, B., Meng, R., Huang, B., Shen, S., Bi, Y., and Zhu, D. (2016). Silymarin alleviates hepatic oxidative stress and protects against metabolic disorders in high-fat diet-fed mice. *Free Radic Res* 50(3)**,** 314-327. doi: 10.3109/10715762.2015.1116689.

Ferenci, P., and Beinhardt, S. (2013). Silibinin: an old drug in the high tech era of liver transplantation. *J Hepatol* 58(3)**,** 409-411. doi: 10.1016/j.jhep.2012.11.030.

Ferenci, P., Scherzer, T.M., Kerschner, H., Rutter, K., Beinhardt, S., Hofer, H., et al. (2008). Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. *Gastroenterology* 135(5)**,** 1561-1567. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.072.

Fidge, N.H. (1999). High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res* 40(2)**,** 187-201.

Fournier, N., Sayet, G., Vedie, B., Nowak, M., Allaoui, F., Solgadi, A., et al. (2017). Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages by reducing the cholesteryl ester mobilization from lipid droplets. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862(10 Pt A)**,** 1079-1091. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.07.011.

Friedberg, C.E., Janssen, M.J., Heine, R.J., and Grobbee, D.E. (1998). Fish oil and glycemic control in diabetes. A meta-analysis. *Diabetes Care* 21(4)**,** 494-500.

Friedman, A., and Moe, S. (2006). Review of the effects of omega-3 supplementation in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 1(2)**,** 182-192. doi: 10.2215/cjn.00740805.

Gandhi, N., Lenton, R., Bhartia, M., Abbas, A., Raju, J., and Ramachandran, S. (2014). Effect of fibrate treatment on liver function tests in patients with the metabolic syndrome. *SpringerPlus* 3**,** 14. doi: 10.1186/2193-1801-3-14.

Garrigues, A., Escargueil, A.E., and Orlowski, S. (2002). The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16)**,** 10347-10352. doi: 10.1073/pnas.162366399.

Goldberg, I.J., Scheraldi, C.A., Yacoub, L.K., Saxena, U., and Bisgaier, C.L. (1990). Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 265(8)**,** 4266-4272.

Graf, T.N., Cech, N.B., Polyak, S.J., and Oberlies, N.H. (2016). A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (Silybum marianum) extracts. *J Pharm Biomed Anal* 126**,** 26-33. doi: 10.1016/j.jpba.2016.04.028.

Griffin, M.D., Sanders, T.A., Davies, I.G., Morgan, L.M., Millward, D.J., Lewis, F., et al. (2006). Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on insulin sensitivity, lipoprotein size, and postprandial lipemia in men and postmenopausal women aged 45-70 y: the OPTILIP Study. *Am J Clin Nutr* 84(6)**,** 1290-1298. doi: 10.1093/ajcn/84.6.1290.

Grundy, S.M., Brewer, H.B., Jr., Cleeman, J.I., Smith, S.C., Jr., Lenfant, C., American Heart, A., et al. (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109(3)**,** 433-438. doi: 10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6.

Guo, Y., Wang, S., Wang, Y., and Zhu, T. (2016). Silymarin improved diet-induced liver damage and insulin resistance by decreasing inflammation in mice. *Pharm Biol* 54(12)**,** 2995-3000. doi: 10.1080/13880209.2016.1199042.

Harris, W.S. (1997). n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 65(5 Suppl)**,** 1645s-1654s. doi: 10.1093/ajcn/65.5.1645S.

Harris, W.S., and Bulchandani, D. (2006). Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol* 17(4)**,** 387-393. doi: 10.1097/01.mol.0000236363.63840.16.

Hassan El-Mallah, M., M. El-Shami, S., and Hassanein, M.M. (2003). Detailed studies on some lipids of Silybum marianum (L.) seed oil. *2003* 54(4)**,** 6. doi: 10.3989/gya.2003.v54.i4.227.

Herz, J., and Strickland, D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 108(6)**,** 779-784. doi: 10.1172/jci13992.

Hevonoja, T., Pentikainen, M.O., Hyvonen, M.T., Kovanen, P.T., and Ala-Korpela, M. (2000). Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 1488(3)**,** 189-210.

Hofmann, A.F., and Borgstroem, B. (1964). The intraluminal phase of fat digestion in man: the lipid content of the micellar and oil phases of intestinal content obtained during fat digestion and absorption. *J Clin Invest* 43**,** 247-257. doi: 10.1172/jci104909.

Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Shimano, H. (1998). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* 101(11)**,** 2331-2339. doi: 10.1172/jci2961.

Hossain, M.A., Tsujita, M., Gonzalez, F.J., and Yokoyama, S. (2008). Effects of fibrate drugs on expression of ABCA1 and HDL biogenesis in hepatocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 51(3)**,** 258-266. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181624b22.

Houten, S.M., and Wanders, R.J. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis* 33(5)**,** 469-477. doi: 10.1007/s10545-010-9061-2.

Hsu, M.-H., Savas, Ü., Griffin, K.J., and Johnson, E.F. (2007). Human Cytochrome P450 Family 4 Enzymes: Function, Genetic Variation and Regulation. *Drug Metabolism Reviews* 39(2-3)**,** 515-538. doi: 10.1080/03602530701468573.

Hua, X., Wu, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Hobbs, H.H. (1995). 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. doi: https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80009-B.

Chajek, T., Stein, O., and Stein, Y. (1978). Lipoprotein lipase of cultured mesenchymal rat heart cells: I. Synthesis, secretion and releasability by heparin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 528(3), 456-465. doi: https://doi.org/10.1016/0005-2760(78)90035-8.

Chambers, C.S., Holečková, V., Petrásková, L., Biedermann, D., Valentová, K., Buchta, M., et al. (2017). The silymarin composition… and why does it matter??? *Food Research International* 100, 339-353. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.017.

Chapus, C., Rovery, M., Sarda, L., and Verger, R. (1988). Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie* 70(9), 1223-1234.

Chen, I.S., Chen, Y.C., Chou, C.H., Chuang, R.F., Sheen, L.Y., and Chiu, C.H. (2012). Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. *J Sci Food Agric* 92(7), 1441-1447. doi: 10.1002/jsfa.4723.

Chen, K., Zhao, L., He, H., Wan, X., Wang, F., and Mo, Z. (2014). Silibinin protects beta cells from glucotoxicity through regulation of the Insig-1/SREBP-1c pathway. *Int J Mol Med* 34(4), 1073-1080. doi: 10.3892/ijmm.2014.1883.

Illingworth, D.R., Stein, E.A., Mitchel, Y.B., Dujovne, C.A., Frost, P.H., Knopp, R.H., et al. (1994). Comparative effects of lovastatin and niacin in primary hypercholesterolemia. A prospective trial. *Arch Intern Med* 154(14), 1586-1595.

Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292(5519), 1160-1164. doi: 10.1126/science.1059344.

James, M.J., Gibson, R.A., and Cleland, L.G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 71(1 Suppl), 343s-348s. doi: 10.1093/ajcn/71.1.343s.

Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., et al. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1), 266-271.

Jia, R., Cao, L., Du, J., Xu, P., Jeney, G., and Yin, G. (2013). The protective effect of silymarin on the carbon tetrachloride (CCl4)-induced liver injury in common

carp (Cyprinus carpio). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 49(3)**,** 155-161. doi: 10.1007/s11626-013-9587-3.

Jones, P., Kafonek, S., Laurora, I., and Hunninghake, D. (1998). Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 81(5)**,** 582-587.

Jun, M., Foote, C., Lv, J., Neal, B., Patel, A., Nicholls, S.J., et al. (2010). Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375(9729)**,** 1875-1884. doi: 10.1016/s0140-6736(10)60656-3.

Kang, J.X., and Leaf, A. (2000). Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 71(1 Suppl)**,** 202s-207s. doi: 10.1093/ajcn/71.1.202S.

Khan, M.A., Blackshaw, R.E., and Marwat, K.B. (2009). Biology of milk thistle (Silybum marianum) and the management options for growers in north-western Pakistan. *Weed Biology and Management* 9(2)**,** 99-105. doi: doi:10.1111/j.1445-6664.2009.00326.x.

Kharasch, E.D., and Thummel, K.E. (1993). Identification of cytochrome P450 2E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane, and methoxyflurane. *Anesthesiology* 79(4)**,** 795-807.

Kheiripour, N., Karimi, J., Khodadadi, I., Tavilani, H., Goodarzi, M.T., and Hashemnia, M. (2018). Silymarin prevents lipid accumulation in the liver of rats with type 2 diabetes via sirtuin1 and SREBP-1c. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 29(3)**,** 301-308. doi: 10.1515/jbcpp-2017-0122.

Klimes, I., Vrana, A., Kunes, J., Sebokova, E., Dobesova, Z., Stolba, P., et al. (1995). Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Press* 4(3)**,** 137-142.

Knapp, H.R., Reilly, I.A., Alessandrini, P., and FitzGerald, G.A. (1986). In vivo indexes of platelet and vascular function during fish-oil administration in patients with atherosclerosis. *N Engl J Med* 314(15)**,** 937-942. doi: 10.1056/nejm198604103141501.

Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., et al. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with

lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346(6)**,** 393-403. doi: 10.1056/NEJMoa012512.

Koh, K.K., Han, S.H., and Quon, M.J. (2005). Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 46(11)**,** 1978-1985. doi: 10.1016/j.jacc.2005.06.082.

Kok, T., Bloks, V.W., Wolters, H., Havinga, R., Jansen, P.L., Staels, B., et al. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-mediated regulation of multidrug resistance 2 (Mdr2) expression and function in mice. *Biochem J* 369(Pt 3)**,** 539-547. doi: 10.1042/bj20020981.

Kuki, Á., Nagy, L., Deák, G., Nagy, M., Zsuga, M., and Kéki, S. (2012). Identification of Silymarin Constituents: An Improved HPLC–MS Method. *Chromatographia* 75(3)**,** 175-180. doi: 10.1007/s10337-011-2163-7.

Kurien, B.T., and Scofield, R.H. (2006). Western blotting. *Methods* 38(4)**,** 283-293. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007.

Kwan, B.C.H., Kronenberg, F., Beddhu, S., and Cheung, A.K. (2007). Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 18(4)**,** 1246.

Kwong, E., Li, Y., Hylemon, P.B., and Zhou, H. (2015). Bile acids and sphingosine-1-phosphate receptor 2 in hepatic lipid metabolism. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5(2)**,** 151-157. doi: https://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.12.009.

Leaf, A., Kang, J.X., Xiao, Y.F., and Billman, G.E. (2003). Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation* 107(21)**,** 2646-2652. doi: 10.1161/01.cir.0000069566.78305.33.

Lehnen, A.M., Rodrigues, B., Irigoyen, M.C., De Angelis, K., and Schaan, B.D. (2013). Cardiovascular changes in animal models of metabolic syndrome. *J Diabetes Res* 2013**,** 761314. doi: 10.1155/2013/761314.

Leung, T.M., and Nieto, N. (2013). CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 58(2)**,** 395-398. doi: 10.1016/j.jhep.2012.08.018.

Lewin, G.A., Schachter, H.M., Yuen, D., Merchant, P., Mamaladze, V., and Tsertsvadze, A. (2005). Effects of omega-3 fatty acids on child and maternal health. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* (118)**,** 1-11.

Li, Y., and Wu, S. (2018). Epigallocatechin gallate suppresses hepatic cholesterol synthesis by targeting SREBP-2 through SIRT1/FOXO1 signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 448(1-2)**,** 175-185. doi: 10.1007/s11010-018-3324-x.

Lindsay, R.S., and Howard, B.V. (2004). Cardiovascular risk associated with the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 4(1)**,** 63-68.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4)**,** 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lo Surdo, P., Bottomley, M.J., Calzetta, A., Settembre, E.C., Cirillo, A., Pandit, S., et al. (2011). Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep* 12(12)**,** 1300-1305. doi: 10.1038/embor.2011.205.

Loguercio, C., Andreone, P., Brisc, C., Brisc, M.C., Bugianesi, E., Chiaramonte, M., et al. (2012). Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Free Radic Biol Med* 52(9)**,** 1658-1665. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.008.

Loguercio, C., Federico, A., Trappoliere, M., Tuccillo, C., de Sio, I., Di Leva, A., et al. (2007). The effect of a silybin-vitamin e-phospholipid complex on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* 52(9)**,** 2387-2395. doi: 10.1007/s10620-006-9703-2.

Lucena, M.I., Andrade, R.J., de la Cruz, J.P., Rodriguez-Mendizabal, M., Blanco, E., and Sanchez de la Cuesta, F. (2002). Effects of silymarin MZ-80 on oxidative stress in patients with alcoholic cirrhosis. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40(1)**,** 2-8.

Lund, E.G., Guileyardo, J.M., and Russell, D.W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(13)**,** 7238-7243. doi: 10.1073/pnas.96.13.7238.

Mahley, R.W., and Huang, Y. (1999). Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 10(3)**,** 207-217.

Mahmoud, A.A., and Elshazly, S.M. (2014). Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One* 9(9)**,** e106993. doi: 10.1371/journal.pone.0106993.

Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., et al. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284(5418)**,** 1362-1365.

Malekzadeh, M., Mirmazloum, S.I., Anguorani, H.R., Mortazavi, S.N., and Panahi, M. (2011). The physicochemical properties and oil constituents of milk thistle (silybum marianum gaertn. cv. budakalászi) under drought stress. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(8)**,** 1485-1488.

Mamikutty, N., Thent, Z.C., Sapri, S.R., Sahruddin, N.N., Mohd Yusof, M.R., and Haji Suhaimi, F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res Int* 2014**,** 263897. doi: 10.1155/2014/263897.

Martignoni, M., Groothuis, G.M., and de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2(6)**,** 875-894. doi: 10.1517/17425255.2.6.875.

Martin, K.O., Reiss, A.B., Lathe, R., and Javitt, N.B. (1997). 7α-hyroxylation of 127-hydroxycholesterol: Biologic role in the regulation of cholesterol synthesis. *Journal of Lipid Research* 38(5)**,** 1053-1058.

Martin, R.J., Lauren, D.R., Smith, W.A., Jensen, D.J., Deo, B., and Douglas, J.A. (2006). Factors influencing silymarin content and composition in variegated thistle (Silybum marianum). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34(3)**,** 239-245. doi: 10.1080/01140671.2006.9514413.

Martinez, M. (1992). Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 120(4 Pt 2)**,** S129-138.

Masson, S., Latini, R., Tacconi, M., and Bernasconi, R. (2007). Incorporation and washout of n-3 polyunsaturated fatty acids after diet supplementation in clinical studies. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 8 Suppl 1**,** S4-10. doi: 10.2459/01.jcm.0000289269.98105.65.

Matsubara, S., Yamamoto, S., Sogawa, K., Yokotani, N., Fujii-Kuriyama, Y., Haniu, M., et al. (1987). cDNA cloning and inducible expression during pregnancy of the mRNA for rabbit pulmonary prostaglandin omega-hydroxylase

(cytochrome P-450p-2). *Journal of Biological Chemistry* 262(27)**,** 13366-13371.

McCann, J.C., and Ames, B.N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am J Clin Nutr* 82(2)**,** 281-295. doi: 10.1093/ajcn.82.2.281.

McLennan, P.L. (2001). Myocardial membrane fatty acids and the antiarrhythmic actions of dietary fish oil in animal models. *Lipids* 36 Suppl**,** S111-114.

Mead, J.R., Irvine, S.A., and Ramji, D.P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)* 80(12)**,** 753-769. doi: 10.1007/s00109-002-0384-9.

Mhamdi, B., Abbassi, F., Smaoui, A., Abdelly, C., and Marzouk, B. (2016). Fatty acids, essential oil and phenolics composition of Silybum marianum seeds and their antioxidant activities. *Pak J Pharm Sci* 29(3)**,** 953-959.

Miguez, M.P., Anundi, I., Sainz-Pardo, L.A., and Lindros, K.O. (1994). Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact* 91(1)**,** 51-63.

Miller, P.E., Van Elswyk, M., and Alexander, D.D. (2014). Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Hypertens* 27(7)**,** 885-896. doi: 10.1093/ajh/hpu024.

Minihane, A.M., Khan, S., Leigh-Firbank, E.C., Talmud, P., Wright, J.W., Murphy, M.C., et al. (2000). ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(8)**,** 1990-1997.

Miserez, A.R., Cao, G., Probst, L.C., and Hobbs, H.H. (1997). Structure of the Human Gene Encoding Sterol Regulatory Element Binding Protein 2 (SREBF2). *Genomics* 40(1)**,** 31-40. doi: https://doi.org/10.1006/geno.1996.4525.

Mjos, O.D., Faergeman, O., Hamilton, R.L., and Havel, R.J. (1975). Characterization of remnants produced during the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins of blood plasma and intestinal lymph in the rat. *J Clin Invest* 56(3)**,** 603-615. doi: 10.1172/jci108130.

Moir, A.M., and Zammit, V.A. (1992). Selective labelling of hepatic fatty acids in vivo. Studies on the synthesis and secretion of glycerolipids in the rat. *Biochem J* 283 (Pt 1)**,** 145-149.

Montesinos, R.N., Moulari, B., Gromand, J., Beduneau, A., Lamprecht, A., and Pellequer, Y. (2014). Coadministration of P-glycoprotein modulators on loperamide pharmacokinetics and brain distribution. *Drug Metab Dispos* 42(4)**,** 700-706. doi: 10.1124/dmd.113.055566.

More, V.R., Campos, C.R., Evans, R.A., Oliver, K.D., Chan, G.N., Miller, D.S., et al. (2017). PPAR-alpha, a lipid-sensing transcription factor, regulates blood-brain barrier efflux transporter expression. *J Cereb Blood Flow Metab* 37(4)**,** 1199-1212. doi: 10.1177/0271678x16650216.

Mozaffarian, D., Geelen, A., Brouwer, I.A., Geleijnse, J.M., Zock, P.L., and Katan, M.B. (2005). Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation* 112(13)**,** 1945-1952. doi: 10.1161/circulationaha.105.556886.

Mozaffarian, D., Gottdiener, J.S., and Siscovick, D.S. (2006a). Intake of tuna or other broiled or baked fish versus fried fish and cardiac structure, function, and hemodynamics. *Am J Cardiol* 97(2)**,** 216-222. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.08.025.

Mozaffarian, D., Prineas, R.J., Stein, P.K., and Siscovick, D.S. (2006b). Dietary fish and n-3 fatty acid intake and cardiac electrocardiographic parameters in humans. *J Am Coll Cardiol* 48(3)**,** 478-484. doi: 10.1016/j.jacc.2006.03.048.

Mullard, A. (2012). Cholesterol-lowering blockbuster candidates speed into Phase III trials. *Nat Rev Drug Discov* 11(11)**,** 817-819. doi: 10.1038/nrd3879.

Namiki, M. (2007). Nutraceutical functions of sesame: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47(7)**,** 651-673. doi: 10.1080/10408390600919114.

Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., et al. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6(1)**,** 1-42.

O'Keefe, J.H., Jr., Abuissa, H., Sastre, A., Steinhaus, D.M., and Harris, W.S. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on resting heart rate, heart rate recovery after exercise, and heart rate variability in men with healed myocardial infarctions

and depressed ejection fractions. *Am J Cardiol* 97(8)**,** 1127-1130. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.11.025.

Omura, M., Kobayashi, S., Mizukami, Y., Mogami, K., Todoroki-Ikeda, N., Miyake, T., et al. (2001). Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca(2+)-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *FEBS Lett* 487(3)**,** 361-366.

Omura, T., and Sato, R. (1964). THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *J Biol Chem* 239**,** 2370-2378.

Orolin, J., Vecera, R., Jung, D., Meyer, U.A., Skottova, N., and Anzenbacher, P. (2007). Hypolipidemic effects of silymarin are not mediated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Xenobiotica* 37(7)**,** 725-735. doi: 10.1080/00498250701463333.

Papackova, Z., Heczkova, M., Dankova, H., Sticova, E., Lodererova, A., Bartonova, L., et al. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One* 13(1)**,** e0191353. doi: 10.1371/journal.pone.0191353.

Pares, A., Planas, R., Torres, M., Caballeria, J., Viver, J.M., Acero, D., et al. (1998). Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. *J Hepatol* 28(4)**,** 615-621.

Parks, D.J., Blanchard, S.G., Bledsoe, R.K., Chandra, G., Consler, T.G., Kliewer, S.A., et al. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284(5418)**,** 1365-1368.

Peter, R., Bocker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., and Yang, C.S. (1990). Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem Res Toxicol* 3(6)**,** 566-573.

Petit, D., Bonnefis, M.T., Rey, C., and Infante, R. (1988). Effects of ciprofibrate and fenofibrate on liver lipids and lipoprotein synthesis in normo- and hyperlipidemic rats. *Atherosclerosis* 74(3)**,** 215-225. doi: https://doi.org/10.1016/0021-9150(88)90240-7.

Plenty, N.L., Faulkner, J.L., Cotton, J., Spencer, S.K., Wallace, K., LaMarca, B., et al. (2018). Arachidonic acid metabolites of CYP4A and CYP4F are altered in women with preeclampsia. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 136**,** 15-22. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2018.03.001.

Poppe, L., and Petersen, M. (2016). Variation in the flavonolignan composition of fruits from different Silybum marianum chemotypes and suspension cultures derived therefrom. *Phytochemistry* 131**,** 68-75. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.09.003.

Prakash, P., Singh, V., Jain, M., Rana, M., Khanna, V., Barthwal, M.K., et al. (2014). Silymarin ameliorates fructose induced insulin resistance syndrome by reducing de novo hepatic lipogenesis in the rat. *Eur J Pharmacol* 727**,** 15-28. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.038.

Pullinger, C.R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A.K., Erickson, S.K., et al. (2002). Human cholesterol 7α-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *Journal of Clinical Investigation* 110(1)**,** 109-117. doi: 10.1172/JCI200215387.

Qi, N., Kazdova, L., Zidek, V., Landa, V., Kren, V., Pershadsingh, H.A., et al. (2002). Pharmacogenetic evidence that cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. *J Biol Chem* 277(50)**,** 48501-48507. doi: 10.1074/jbc.M206655200.

Radjabian, T., and Fallah Huseini, H. (2010). Anti-hyperlipidemic and anti-atherosclerotic activities of silymarins from cultivated and wild plants of Silybum marianum L. with different content of flavonolignans. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 9(2)**,** 63-67.

Rainone, F. (2005). Milk thistle. *Am Fam Physician* 72(7)**,** 1285-1288.

Ratner, R.E., Christophi, C.A., Metzger, B.E., Dabelea, D., Bennett, P.H., Pi-Sunyer, X., et al. (2008). Prevention of diabetes in women with a history of gestational diabetes: effects of metformin and lifestyle interventions. *J Clin Endocrinol Metab* 93(12)**,** 4774-4779. doi: 10.1210/jc.2008-0772.

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

Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277(21)**,** 18793-18800. doi: 10.1074/jbc.M109927200.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., et al. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c

gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14(22)**,** 2819-2830.

Roberts, D.M., Hall, M.J., Falkland, M.M., Strasser, S.I., and Buckley, N.A. (2013). Amanita phalloides poisoning and treatment with silibinin in the Australian Capital Territory and New South Wales. *Med J Aust* 198(1)**,** 43-47.

Robinson, J.G., and Stone, N.J. (2006). Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 98(4a)**,** 39i-49i. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.12.026.

Roglans, N., Vazquez-Carrera, M., Alegret, M., Novell, F., Zambon, D., Ros, E., et al. (2004a). Fibrates modify the expression of key factors involved in bile-acid synthesis and biliary-lipid secretion in gallstone patients. *Eur J Clin Pharmacol* 59(12)**,** 855-861. doi: 10.1007/s00228-003-0704-1.

Roglans, N., Vázquez-Carrera, M., Alegret, M., Novell, F., Zambón, D., Ros, E., et al. (2004b). Fibrates modify the expression of key factors involved in bile-acid synthesis and biliary-lipid secretion in gallstone patients. *European Journal of Clinical Pharmacology* 59(12)**,** 855-861. doi: 10.1007/s00228-003-0704-1.

Rosenson, R.S. (2003). Rosuvastatin: a new inhibitor of HMG-coA reductase for the treatment of dyslipidemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 1(4)**,** 495-505. doi: 10.1586/14779072.1.4.495.

Rosenzweig, J.L., Ferrannini, E., Grundy, S.M., Haffner, S.M., Heine, R.J., Horton, E.S., et al. (2008). Primary prevention of cardiovascular disease and type 2 diabetes in patients at metabolic risk: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93(10)**,** 3671-3689. doi: 10.1210/jc.2008-0222.

Russell, D.W. (2003). "The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis", in: *Annual Review of Biochemistry.*).

Russell, D.W., and Setchell, K.D. (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31(20)**,** 4737-4749.

Rye, K.A., Clay, M.A., and Barter, P.J. (1999). Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 145(2)**,** 227-238.

Saha, S.A., Kizhakepunnur, L.G., Bahekar, A., and Arora, R.R. (2007). The role of fibrates in the prevention of cardiovascular disease--a pooled meta-analysis of long-term randomized placebo-controlled clinical trials. *Am Heart J* 154(5)**,** 943-953. doi: 10.1016/j.ahj.2007.07.011.

Saleh, I.A., Kamal, S.A., Shams, K.A., Abdel-Azim, N.S., Aboutabl, E.A., and Hammouda, F.M. (2015). Effect of particle size on total extraction yield and silymarin content of Silybum marianum L. seeds. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6(2)**,** 803-809.

Sarrazin, J.F., Comeau, G., Daleau, P., Kingma, J., Plante, I., Fournier, D., et al. (2007). Reduced incidence of vagally induced atrial fibrillation and expression levels of connexins by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *J Am Coll Cardiol* 50(15)**,** 1505-1512. doi: 10.1016/j.jacc.2007.05.046.

Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T., and Maeda, M. (1996). Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* 271(43)**,** 26461-26464.

Senaphan, K., Kukongviriyapan, U., Sangartit, W., Pakdeechote, P., Pannangpetch, P., Prachaney, P., et al. (2015). Ferulic Acid Alleviates Changes in a Rat Model of Metabolic Syndrome Induced by High-Carbohydrate, High-Fat Diet. *Nutrients* 7(8)**,** 6446-6464. doi: 10.3390/nu7085283.

Sharma, R., Lake, B.G., Foster, J., and Gordon Gibson, G. (1988). Microsomal cytochrome P-452 induction and peroxisome proliferation by hypolipidaemic agents in rat liver. A mechanistic inter-relationship. *Biochemical Pharmacology* 37(7)**,** 1193-1201. doi: 10.1016/0006-2952(88)90770-8.

Sharma, R.K., Doig, M.V., Lewis, D.F.V., and Gibson, G.G. (1989). Role of hepatic and renal cytochrome p-450 iva1 in the metabolism of lipid substrates. *Biochemical Pharmacology* 38(20)**,** 3621-3629. doi: 10.1016/0006-2952(89)90135-4.

Shefer, S., Hauser, S., Bekersky, I., and Mosbach, E.H. (1970). Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J Lipid Res* 11(5)**,** 404-411.

Shepherd, J., Packard, C.J., Morgan, H.G., Third, J.L., Stewart, J.M., and Lawrie, T.D. (1979). The effects of cholestyramine on high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis* 33(4)**,** 433-444.

Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S., and 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. doi: 10.1172/JCI118951.

Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). 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. doi: 10.1172/JCI119248.

Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., and 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. doi: 10.1172/JCI119247.

Sinclair, H.M. (2007). The Diet of Canadian Indians and Eskimos. *Proceedings of the Nutrition Society* 12(1)**,** 69-82. doi: 10.1079/PNS19530016.

Skottova, N., Kazdova, L., Oliyarnyk, O., Vecera, R., Sobolova, L., and Ulrichova, J. (2004). Phenolics-rich extracts from Silybum marianum and Prunella vulgaris reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacol Res* 50(2)**,** 123-130. doi: 10.1016/j.phrs.2003.12.013.

Skottova, N., and Krecman, V. (1998). Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiol Res* 47(1)**,** 1-7.

Skottova, N., Vecera, R., Urbanek, K., Vana, P., Walterova, D., and Cvak, L. (2003). Effects of polyphenolic fraction of silymarin on lipoprotein profile in rats fed cholesterol-rich diets. *Pharmacol Res* 47(1)**,** 17-26.

Sobolova, L., Skottova, N., Vecera, R., and Urbanek, K. (2006). Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharmacol Res* 53(2)**,** 104-112. doi: 10.1016/j.phrs.2005.09.004.

Suman, R.K., Ray Mohanty, I., Borde, M.K., Maheshwari, U., and Deshmukh, Y.A. (2016). Development of an Experimental Model of Diabetes Co-Existing with Metabolic Syndrome in Rats. *Adv Pharmacol Sci* 2016**,** 9463476. doi: 10.1155/2016/9463476.

Tan, N.S., Michalik, L., Desvergne, B., and Wahli, W. (2005). Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 93(2)**,** 99-105. doi: https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.025.

Temel, R.E., Tang, W., Ma, Y., Rudel, L.L., Willingham, M.C., Ioannou, Y.A., et al. (2007). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol

concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest* 117(7)**,** 1968-1978. doi: 10.1172/jci30060.

Torres-Vergara, P., and Penny, J. (2018). Pro-inflammatory and anti-inflammatory compounds exert similar effects on P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells. 70(6)**,** 713-722. doi: 10.1111/jphp.12893.

Trigatti, B., Rigotti, A., and Krieger, M. (2000). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol* 11(2)**,** 123-131.

Valmaseda, A., Carmona, M.C., Barberá, M.J., Viñas, O., Mampel, T., Iglesias, R., et al. (1999). Opposite regulation of PPAR-α and -γ gene expression by both their ligands and retinoic acid in brown adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 154(1)**,** 101-109. doi: https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00081-7.

Vecera, R., Zacharova, A., Orolin, J., Skottova, N., and Anzenbacher, P. (2011). The effect of silymarin on expression of selected ABC transporters in the rat. *Veterinarni Medicina* 56(2)**,** 59-62.

Volpe, J.J., and Vagelos, P.R. (1973). Saturated fatty acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* 42**,** 21-60. doi: 10.1146/annurev.bi.42.070173.000321.

von Eckardstein, A., Huang, Y., and Assmann, G. (1994). Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 5(6)**,** 404-416.

Voroneanu, L., Nistor, I., Dumea, R., Apetrii, M., and Covic, A. (2016). Silymarin in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Diabetes Res* 2016**,** 5147468. doi: 10.1155/2016/5147468.

Vrana, A., and Kazdova, L. (1990). The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* 22(6)**,** 2579.

Vranckx, P., Valgimigli, M., and Heidbuchel, H. (2018). The Significance of Drug-Drug and Drug-Food Interactions of Oral Anticoagulation. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 7(1)**,** 55-61. doi: 10.15420/aer.2017.50.1.

Wallace, S., Carrier, D.J., Beitle, R.R., Clausen, E.C., and Griffis, C.L. (2003). HPLC-UV and LC-MS-MS Characterization of Silymarin in Milk Thistle Seeds

and Corresponding Products. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods* 4(2)**,** 37-48. doi: 10.1300/J133v04n02_05.

Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M., Kupelnick, B., et al. (2006). n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 84(1)**,** 5-17. doi: 10.1093/ajcn/84.1.5.

Wang, C., Chung, M., Lichtenstein, A., Balk, E., Kupelnick, B., DeVine, D., et al. (2004). Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* (94)**,** 1-8.

Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L.C., and Forman, B.M. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 3(5)**,** 543-553.

Wang, L., Rotter, S., Ladurner, A., Heiss, E.H., Oberlies, N.H., Dirsch, V.M., et al. (2015). Silymarin Constituents Enhance ABCA1 Expression in THP-1 Macrophages. *Molecules (Basel, Switzerland)* 21(1)**,** 10.3390/molecules21010055 E21010055. doi: 10.3390/molecules21010055.

Wang, Z., Hall, S.D., Maya, J.F., Li, L., Asghar, A., and Gorski, J.C. (2003). Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans. *Br J Clin Pharmacol* 55(1)**,** 77-85.

Waterman, M.R., and Lepesheva, G.I. (2005). Sterol 14 alpha-demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1)**,** 418-422. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.118.

Whelan, J., and Rust, C. (2006). Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annu Rev Nutr* 26**,** 75-103. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092605.

Wianowska, D., and Wisniewski, M. (2015). Simplified procedure of silymarin extraction from Silybum marianum L. Gaertner. *J Chromatogr Sci* 53(2)**,** 366-372. doi: 10.1093/chromsci/bmu049.

Xiao, P., Ji, H., Ye, Y., Zhang, B., Chen, Y., Tian, J., et al. (2017). Dietary silymarin supplementation promotes growth performance and improves lipid metabolism and health status in grass carp (Ctenopharyngodon idellus) fed diets with elevated lipid levels. *Fish Physiol Biochem* 43(1)**,** 245-263. doi: 10.1007/s10695-016-0283-6.

Xie, C., Zhou, Z.S., Li, N., Bian, Y., Wang, Y.J., Wang, L.J., et al. (2012). Ezetimibe blocks the internalization of NPC1L1 and cholesterol in mouse small intestine. *J Lipid Res* 53(10)**,** 2092-2101. doi: 10.1194/jlr.M027359.

Yamamoto, S., Kusunose, E., Ogita, K., Kaku, M., Ichihara, K., and Kusunose, M. (1984). Isolation of cytochrome P-450 highly active in prostaglandin ω-hydroxylation from lung microsomes of rabbits treated with progesterone. *Journal of Biochemistry* 96(3)**,** 593-603. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134874.

Yamazaki, M., Li, B., Louie, S.W., Pudvah, N.T., Stocco, R., Wong, W., et al. (2005). Effects of fibrates on human organic anion-transporting polypeptide 1B1-, multidrug resistance protein 2- and P-glycoprotein-mediated transport. *Xenobiotica* 35(7)**,** 737-753. doi: 10.1080/00498250500136676.

Yokoyama, S. (1998). Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 1392(1)**,** 1-15.

Yu, L., Hammer, R.E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., et al. (2002). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25)**,** 16237-16242. doi: 10.1073/pnas.252582399.

Yu, X.H., Qian, K., Jiang, N., Zheng, X.L., Cayabyab, F.S., and Tang, C.K. (2014). ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 428**,** 82-88. doi: 10.1016/j.cca.2013.11.010.

Zanger, U.M., and Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138(1)**,** 103-141. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.

Zhang, D.W., Lagace, T.A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J.D., et al. (2007). Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 282(25)**,** 18602-18612. doi: 10.1074/jbc.M702027200.

Zicha, J., Pechanova, O., Cacanyiova, S., Cebova, M., Kristek, F., Torok, J., et al. (2006). Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiol Res* 55 Suppl 1**,** S49-63.