

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra fyziologie**



**Bc. Kateřina Rybáková**

**PATOGENEZE HYPERCHOLESTEROLÉMIE  
U PRAŽSKÉHO HEREDITÁRNĚ  
HYPERCHOLESTEROLEMICKÉHO (PHHC) POTKANA**

**Pathogenesis of hypercholesterolemia  
in Prague hereditary hypercholesterolemic (PHHC) rat**

**Diplomová práce**

**Praha 2013**

**Vedoucí práce: Ing. Miluše Vlachová**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne .....

Podpis .....

Kateřina Rybáková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla vřele poděkovat své školitelce Ing. Miluši Vlachové za odborné vedení a trpělivost projevenou při zpracovávání mé diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za nesmírnou laskavost, kterou prokazoval při konzultacích, dále za odborné rady a podanou pomocnou ruku, bylo-li třeba. Mé poděkování náleží také zaměstnancům Lipidové laboratoře IKEM, Izotopového servisního střediska IKEM a pracovníkům zvěřince IKEM. Děkuji také RNDr. Věře Lánské, CSc. za pomoc se statistickým hodnocením výsledků, Mgr. Kateřině Zemánkové, Bc. Markétě Jirátové a paní Danuši Körberové za technickou pomoc při provádění pokusu.

Na závěr děkuji své rodině za podporu nejen ve studiu, ale především za láskyplnou péči, kterou mě zahrnují celý život, a mému manželovi za pochopení a ohromnou trpělivost, kterou mnohokrát prokázal při sepisování této práce.

## ABSTRAKT

Hypercholesterolémie představuje významný rizikový faktor pro vznik kardiovaskulárních chorob. Pro studium patogeneze i terapie hypercholesterolémie se využívá celé řady experimentálních modelů. V této diplomové práci se zaměřuji na charakterizaci jednoho z nich.

Pražský hereditárně hypercholesterolemický (PHHC) potkan je vhodným modelem pro studium hypercholesterolémie. Přestože na standardní dietě většinu plazmatického cholesterolu transportuje v lipoproteinech o vysoké hustotě, na cholesterolové dietě se u něj rozvíjí hypercholesterolémie srovnatelná s hypercholesterolémií u člověka. Výhodou tohoto modelu je, že pro zvýšení cholesterolové hladiny není nutné do diety přidávat žlučové kyseliny či jiné látky, které jsou pro játra svými účinky často toxické.

Hypercholesterolémie je u PHHC potkanů způsobena akumulací lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL), které jsou značně obohacovány cholesterolem již při svém vzniku v játrech. Tyto částice jsou pomaleji katabolizovány a zůstávají proto déle v cirkulaci.

Zjistili jsme, že po podání 1% cholesterolové diety dochází u PHHC potkana k akumulaci cholesterylesterů (CE) v játrech a že výrazně stoupá i jejich koncentrace ve VLDL. Na zvýšené inkorporaci CE do VLDL se v játrech mohou podílet acylkoenzymA:cholesterolacyltransfera (ACAT) a mikrosomální protein přenášející triacylglyceroly (MTP). Zjistili jsme, že aktivita ACAT ani MTP v játrech se neliší mezi PHHC potkany a kontrolními potkany Wistar a zároveň není ovlivněna podáním dietního cholesterolu. Rozdíly nebyly nalezeny ani v expresi genů kódujících tyto proteiny (*Mttp*, *Soat1*, *Soat2*).

Zvýšené inkorporaci CE do VLDL v játrech PHHC potkana neodpovídají tedy změny ani v expresi ani v aktivitě ACAT či MTP.

### **Klíčová slova**

Cholesterol, hypercholesterolémie, potkan, VLDL, ACAT, MTP.

## **ABSTRACT**

Hypercholesterolemia represents a major risk factor of cardiovascular disease. A number of experimental models is used for study of hypercholesterolemia pathogenesis and therapy. This thesis concentrates on characterization of one of these models.

Prague hereditary hypercholesterolemic (PHHC) rat is such a suitable model for study of hypercholesterolemia. Although the majority of plasma cholesterol is transported by high density lipoprotein in PHHC rat fed standard diet, PHHC rat fed cholesterol diet develops hypercholesterolemia comparable to that of humans. The advantage of this model is that hypercholesterolemia develops without the need for addition of bile acids or other hepatotoxic substances to the diet.

The hypercholesterolemia of PHHC rat is caused by slowed down catabolism of cholesterol-rich very low density lipoprotein (VLDL). These cholesterol-rich particles are synthesized in the liver.

We found out that PHHC rat fed 1% cholesterol diet accumulates cholesteryl esters (CE) in the liver and also in the VLDL. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) may participate in the increased incorporation CE into VLDL. We found out no difference in ACAT and MTP activities in the liver between PHHC rats and control animals. Neither ACAT activity nor MTP activity is influenced by cholesterol diet. No difference in expression of genes encoding these proteins (*Mtp*, *Soat1*, *Soat2*) was detected.

In conclusion, the increased incorporation of CE into VLDL in PHHC rat liver is not related to changes in gene expression or activities of ACAT and MTP.

### **Keywords**

Cholesterol, hypercholesterolemia, rat, VLDL, ACAT, MTP.

# OBSAH

1.	ÚVOD .....	8
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	9
2.1	Transport lipidů v cirkulaci.....	9
2.1.1	Metabolismus VLDL .....	10
2.1.1.1	Syntéza VLDL.....	10
2.1.1.2	Metabolismus VLDL.....	12
2.1.2	Metabolismus LDL .....	13
2.2	Hypercholesterolemie .....	13
2.3	Experimentální modely hypercholesterolemie .....	15
2.3.1	Geneticky modifikované modely hypercholesterolemie .....	15
2.3.2	Hypercholesterolemie indukovaná dietou .....	16
2.3.3	Modely se spontánní hypercholesterolemií .....	16
2.3.3.1	Watanabeho hereditárně hyperlipemický (WHHL) králik .....	17
2.3.3.2	Pražský hereditárně hypercholesterolemický (PHHC) potkan.....	17
2.3.3.2.1	Lipoproteinový profil PHHC potkana.....	18
2.3.3.2.2	Analýza transkriptomu v játrech u PHHC potkana.....	22
3.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	24
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
4.1	Schéma pokusu .....	25
4.2	Použité chemikálie, materiál a přístroje.....	27
4.2.1	Chemikálie .....	27
4.2.2	Materiál a další nástroje .....	29
4.2.3	Přístroje .....	29
4.3	Použité metody .....	31
4.3.1	Ultracentrifugace .....	31
4.3.2	Stanovení koncentrace celkového cholesterolu, volného cholesterolu, cholesterylesterů a triacylglycerolů .....	32
4.3.3	Měření exprese genů .....	34
4.3.4	Stanovení proteinu .....	38
4.3.5	Stanovení aktivity ACAT .....	39

4.3.6	Stanovení aktivity MTP .....	43
4.4	Statistické zpracování dat .....	45
5.	VÝSLEDKY .....	46
5.1	Stanovení koncentrace celkového cholesterolu, volného cholesterolu, cholesterylesterů a triacylglycerolů .....	46
5.1.1	Koncentrace lipidů v séru .....	46
5.1.2	Koncentrace lipidů ve VLDL .....	49
5.1.3	Koncentrace lipidů v játrech .....	53
5.1.4	Porovnání dvou metod stanovení cholesterolu .....	55
5.2	Vliv diety a kmene na expresi vybraných genů a aktivitu proteinů podílejících se na syntéze VLDL.....	56
5.2.1	Vliv diety a kmene na expresi vybraných genů.....	56
5.2.2	Stanovení aktivity ACAT .....	60
5.2.3	Stanovení aktivity MTP .....	62
6.	DISKUSE.....	65
6.1	Vliv podání dietního cholesterolu na koncentraci volného cholesterolu, cholesterylesterů a triacylglycerolů .....	65
6.1.1	Vliv podání dietního cholesterolu na koncentraci FC a CE v játrech.....	65
6.1.2	Vliv podání dietního cholesterolu na koncentraci FC a CE ve VLDL .....	65
6.2	Vliv diety a kmene na expresi vybraných genů a aktivitu proteinů podílejících se na syntéze VLDL.....	67
6.2.1	Vliv podání dietního cholesterolu na expresi vybraných genů.....	67
6.2.2	Vliv dietního cholesterolu na aktivitu ACAT a MTP.....	68
7.	ZÁVĚR .....	70
8.	LITERATURA .....	71

## SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Anglický název	Český název
<b>ACAT</b>	Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase	Acyl-CoA:cholesterolacytransferasa
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance	Analýza rozptylu
<b>apo</b>	Apolipoprotein	Apolipoprotein
<b>APOB</b>	Apolipoprotein B gene	Gen pro apolipoprotein B
<b>APOE/Apoe</b>	Apolipoprotein E gene	Gen pro apolipoprotein E
<b>Apof</b>	Apolipoprotein F gene	Gen pro apolipoprotein F
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid	Kyselina bicinchoninová
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin	Hovězí sérový albumin
<b>CE</b>	Cholesteryl ester	Cholesterylester
<b>CETP</b>	Cholesteryl ester transfer protein	Protein přenášející cholesterylestery
<b>CETP</b>	Cholesteryl ester transfer protein gene	Gen pro protein přenášející cholesterylestery
<b>Cyp7a1</b>	Cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase gene	Gen pro cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylasu
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
<b>cDNA</b>	Coding deoxyribonucleic acid	Kódující deoxyribonukleová kyselina
<b>dNTP</b>	Deoxyribonucleotide triphosphate	Deoxyribonukleotidtrifosfát
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid	Kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ER</b>	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické retikulum
<b>ERGIC</b>	ER Golgi intermediate compartment	Intermediální kompartment mezi ER a Golgiho aparátem
<b>FA</b>	Fatty acid	Mastná kyselina
<b>FAM</b>	6-carboxyfluorescein amidite	6-karboxyfluoresceinamidit
<b>FC</b>	Free cholesterol	Volný cholesterol

<b>HDL</b>	High density lipoprotein	Lipoprotein o vysoké hustotě
<b>HDL-C</b>	Cholesterol in HDL	Cholesterol v HDL
<b>HPLC</b>	High-performance liquid chromatography	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>HTGL</b>	Hepatic triglyceride lipase	Jaterní lipasa
<b>IDL</b>	Intermediate density lipoprotein	Lipoprotein o střední hustotě
<b>IDL-C</b>	Cholesterol in IDL	Cholesterol v IDL
<b>IKEM</b>	Institute for Clinical and Experimental Medicine	Institut Klinické a Experimentální Medicíny
<b>LCAT</b>	Lecithin:cholesterol acyltransferase	Lecithin:cholesterolacyltransferasa
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein	Lipoprotein o nízké hustotě
<b>LDL-C</b>	Cholesterol in LDL	Cholesterol v LDL
<b>LDLR</b>	LDL receptor	Receptor pro LDL
<b><i>LDLR/Ldlr</i></b>	LDL receptor gene	Gen pro receptor pro LDL
<b>LL IKEM</b>	Lipid Laboratory IKEM	Lipidová laboratoř IKEM
<b>LPL</b>	Lipoprotein lipase	Lipoproteinová lipasa
<b>MTP</b>	Microsomal TG transfer protein	Mikrosomální protein přenášející TG
<b><i>Mtp</i></b>	Microsomal TG transfer protein gene	Gen pro mikrosomální protein přenášející TG
<b>P_ctrl</b>	PHHC rat fed standard diet	Potkani kmene PHHC na kontrolní dietě
<b>P_chol</b>	PHHC rat fed cholesterol diet	Potkani kmene PHHC na cholesterolové dietě
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
<b><i>PCSK9</i></b>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene	Gen pro proprotein konvertasa subtilisin/kexin typ 9
<b>PHHC</b>	Prague hereditary hypercholesterolemic	Pražský hereditárně hypercholesterolemický
<b>rfg</b>	Reference gene	Referenční gen
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
<b><i>Soat1</i></b>	Sterol-O-acyltransferase 1 gene	Gen pro acyl-CoA:cholesterolacyltransferasu 1 (sterol-O-acyltransferasu 1)

<b><i>Soat2</i></b>	Sterol-O-acyltransferase 2 gene	Gen pro acyl-CoA:cholesterolacytransferasu (sterol-O-acyltransferasu 2)
<b>TC</b>	Total cholesterol	Celkový cholesterol
<b>TG</b>	Triglyceride	Triacylglycerol
<b>tg</b>	Target gene	Cílový gen
<b>TLC</b>	Thin layer chromatography	Chromatografie na tenké vrstvě
<b><i>Vars2l</i></b>	Valyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial) gene	Gen pro mitochondriální Valyl-tRNA syntetasu 2
<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein	Lipoprotein o velmi nízké hustotě
<b>VLDL-C</b>	Cholesterol in VLDL	Cholesterol ve VLDL
<b>VLDL-CE</b>	Cholesteryl ester in VLDL	Cholesterylestery ve VLDL
<b>VLDL-FC</b>	Free cholesterol in VLDL	Volný cholesterol ve VLDL
<b>VLDL-TG</b>	Triglyceride in VLDL	Triacylglyceroly ve VLDL
<b>W_ctrl</b>	Wistar rat fed standard diet	Potkani kmene Wistar na kontrolní dietě
<b>W_chol</b>	Wistar rat fed cholesterol diet	Potkani kmene Wistar na cholesterolové dietě
<b>WHHL</b>	Watanabe hereditary hyperlipemic	Watanabeho hereditárně lipemický

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Syntéza VLDL.....	11
Obr. 2: Metabolismus VLDL.....	13
Obr. 3: Lipoproteinový profil PHHC potkana a potkana Wistar na kontrolní a 1% cholesterolové dietě .....	18
Obr. 4: Koncentrace cholesterolu a TG .....	19
Obr. 5: Clearance <sup>125</sup> I-LDL z cirkulace .....	20
Obr. 6: Clearance <sup>125</sup> I-VLDL z cirkulace .....	21
Obr. 7: Vliv cholesterolové diety na expresi genů účastnících se biosyntézy cholesterolu nebo metabolismu lipoproteinů u potkanů PHHC a Wistar .....	22
Obr. 8: Rozdíly v expresi genů mezi potkany kmene PHHC a Wistar.....	23
Obr. 9: Koncentrace cholesterolu v séru.....	46
Obr. 10: Koncentrace FC (A) a CE (B) v séru.....	47
Obr. 11: Koncentrace TG v séru.....	48
Obr. 12: Koncentrace cholesterolu ve VLDL.....	49
Obr. 13: Koncentrace FC (A) a CE (B) ve VLDL.....	50
Obr. 14: Koncentrace TG ve VLDL.....	51
Obr. 15: Poměr VLDL-C/VLDL-TG (A) a VLDL-CE/VLDL-FC (B).....	52
Obr. 16: Koncentrace TC v játrech.....	53
Obr. 17: Koncentrace FC (A) a CE (B) v játrech.....	54
Obr. 18: Korelace testů stanovení koncentrace VLDL-C komerční soupravou společnosti BioVision (USA) a Lipidovou laboratoří IKEM (komerční souprava firmy Roche, Německo).....	55
Obr. 19: Vliv kmene na expresi vybraných genů .....	57
Obr. 20: Vliv diety na expresi vybraných genů.....	58
Obr. 21: Srovnání exprese genů <i>Soat1</i> a <i>Soat2</i> v játrech.....	59
Obr. 22: Aktivita ACAT.....	60
Obr. 23: Vynesení aktivity enzymu ACAT proti expresi genů <i>Soat1</i> (A) a <i>Soat2</i> (B).....	61
Obr. 24: Průběh aktivity částečně purifikovaného lidského MTP.....	62
Obr. 25: Průběh aktivity MTP v čase na cholesterolové (A) a kontrolní (B) dietě.....	63
Obr. 26: Aktivita MTP.....	64
Obr. 27: Vynesení aktivity MTP v 30. min proti expresi genu <i>Mttp</i> .....	64

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Klasifikace lipoproteinů u člověka (upraveno podle Gotto, 2003). .....	9
Tab. 2: Fredricksonova klasifikace dyslipidemií (Češka <i>et al.</i> , 2005). .....	14
Tab. 3: Pokusné skupiny. ....	25
Tab. 4: Stanovení celkového a volného cholesterolu – příprava vzorků. ....	33
Tab. 5: Stanovení TC a FC – příprava reakční směsi. ....	34
Tab. 6: Reverzní transkripce – příprava vzorků. ....	36
Tab. 7: Reverzní transkripce – příprava reakční směsi. ....	36
Tab. 8: Měření exprese genů – příprava vzorků. ....	37
Tab. 9: Měření exprese genů – účinnost amplifikace. ....	37
Tab. 10: Stanovení aktivity ACAT – příprava reakční směsi. ....	41

# 1. ÚVOD

Cholesterol je základní složkou buněčných membrán živočichů. Udržuje jejich fluiditu a je součástí tzv. lipidových raftů. Podílí se na signalizaci a zároveň hraje důležitou roli v metabolismu, neboť je současně prekurzorem steroidních hormonů, vitamínu D, žlučových kyselin a oxysterolů.

Cholesterol přijímáme společně s potravou nebo si jej můžeme sami syntetizovat. Syntézy je schopná každá jaderná buňka. Odstraňování přebytku cholesterolu z těla je však omezené. Významnou úlohu zde hrají játra, která cholesterol přeměňují na žlučové kyseliny. V těle je cholesterol transportován v částicích zvaných lipoproteiny.

Zvýšenou hladinu cholesterolu označujeme jako hypercholesterolémii. V současnosti představuje hypercholesterolémie vážný zdravotní problém, jelikož zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob, které se v České republice podílí na celkové mortalitě zhruba z poloviny. V roce 2008 zemřelo v České republice na kardiovaskulární choroby 45 % mužů a 51 % žen (Cífková *et al.*, 2010).

Hypercholesterolémie vzniká v důsledku nezdravého životního stylu, případně na základě genetických predispozic. Zvýšená hladina cholesterolu je způsobena nerovnováhou v jeho metabolismu. Ačkoli známe hypercholesterolémie způsobené poruchou v jednom genu, mnohem častější jsou onemocnění polygenního charakteru. Doposud ale nebyly identifikovány všechny geny, které jsou za rozvoj hypercholesterolémie odpovědné.

Pro studium patogeneze i terapie hypercholesterolémie se využívá celé řady experimentálních modelů. Tato diplomová práce se zaměřuje na charakterizaci jednoho z nich.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Transport lipidů v cirkulaci

Mezi tkáněmi jsou lipidy transportovány částicemi zvanými lipoproteiny. Jsou to sférické partikule, které rozdělujeme podle hustoty do 5 základních skupin (Tab. 1).

Součástí lipoproteinů jsou lipidy a proteiny zvané apolipoproteiny (apo). Povrch lipoproteinů je tvořen fosfolipidy, volným cholesterolem (FC) a apolipoproteiny. Hydrofobní jádro lipoproteinů je potom tvořeno triacylglyceroly (TG) a cholesterylestery (CE).

Tab. 1: Klasifikace lipoproteinů u člověka (upraveno podle Gotto, 2003).

Lipoproteiny	Velikost [nm]	Relativní hustota	% Podíl lipidů	% Podíl proteinů	Hlavní lipidová složka	Hlavní apoprotein	Pohyblivost na gelu
Chylomikron	90-1000	< 0,95	98-99	1-2	TG	B-48, C, E	start
VLDL	30-90	0,95-1,006	90-93	7-10	TG	B-100, C	pre-β
IDL	25-30	1,006-1,019	89	11	cholesterol, TG	B-100	pre-β
LDL	20-25	1,019-1,063	79	21	cholesterol	B-100	β
HDL	7,5-20	1,063-1,210	43-67	33-57	cholesterol	A, C, E	α

Jednotlivé třídy lipoproteinů se liší nejen velikostí a asociovanými apolipoproteiny, ale především jejich lipidovým složením, místem vzniku a původem lipidů.

Lipidy z potravy (hlavně TG) jsou transportovány největšími a zároveň nejméně denzními částicemi zvanými chylomikrony. Tato cesta transportu je rovněž označována jako exogenní transport.

Endogenní dráha transportu lipidů začíná v játrech produkcí lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). VLDL transportují především TG k mimojaterním tkáním. V cirkulaci jsou částice VLDL postupně metabolizovány. Zmenšují se a jsou označovány jako lipoproteiny o střední hustotě (IDL), z nichž dalším působením enzymů vznikají lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). V částicích LDL již nepřevažují svým obsahem TG, ale CE. U člověka transportují LDL až dvě třetiny plazmatického cholesterolu.

Poslední třídou částic jsou lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL), které zprostředkovávají tzv. reverzní transport – transportují cholesterol z tkání do jater, kde dochází k jeho přeměně na žlučové kyseliny. Většina savců transportuje v HDL téměř všechen plazmatický cholesterol. Výjimkou je např. člověk, který v HDL transportuje zhruba jednu čtvrtinu plazmatického cholesterolu.

Zatímco vysoká hladina HDL v plazmě má protektivní charakter, vysoká hladina LDL a VLDL je spojena se vznikem aterosklerózy, a tedy i se vznikem kardiovaskulárních chorob.

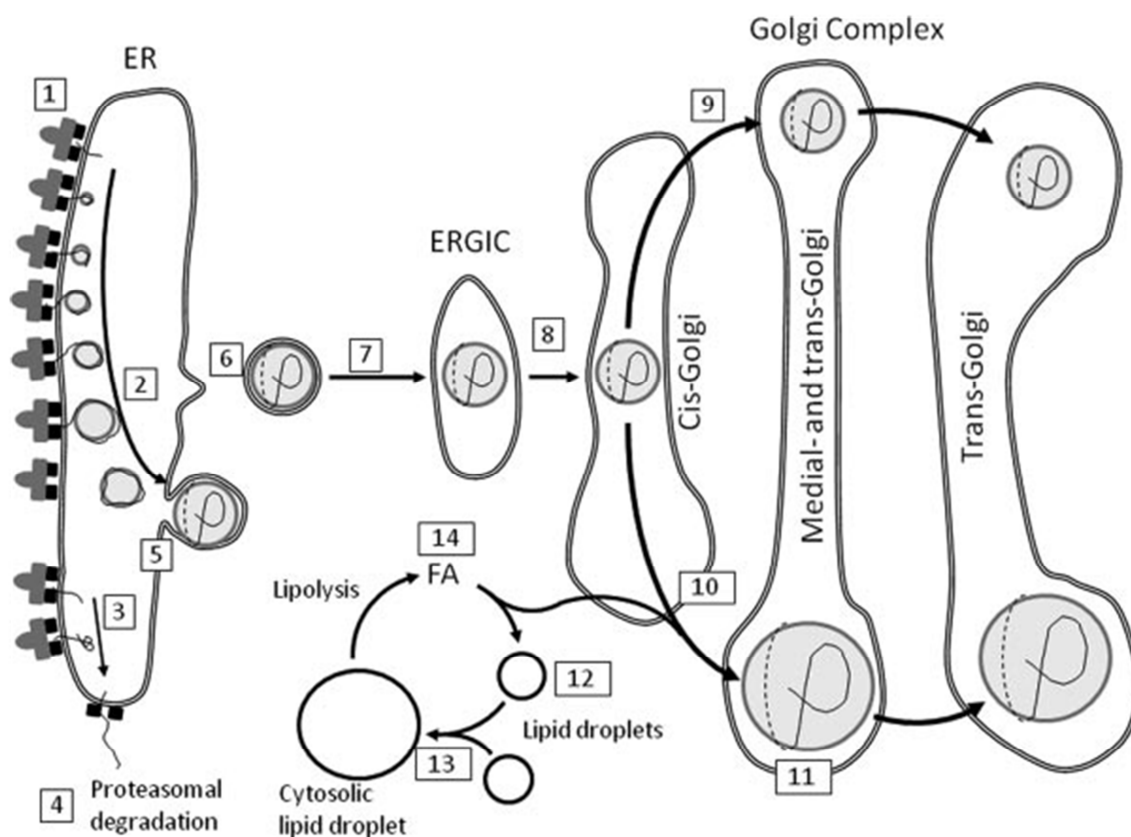
Následující podkapitoly se věnují syntéze a metabolismu VLDL a LDL, jelikož právě porozumění metabolismu VLDL a LDL je nutné pro objasnění mechanismů vzniku onemocnění spjatých s hypercholesterolémií.

## **2.1.1 Metabolismus VLDL**

### **2.1.1.1 SYNTÉZA VLDL**

Částice VLDL jsou syntetizované v játrech. Uvnitř hydrofobního jádra mají neutrální lipidy (převážně TG). Na hydrofilním povrchu asociují vždy jen s jednou molekulou apo B, který se u savců vyskytuje ve dvou hlavních formách – delší apo B-100 a kratší apo B-48 (Elovson *et al.*, 1988; Kane *et al.*, 1980). V játrech člověka je syntetizován pouze apo B-100, zatímco v játrech potkana jsou syntetizovány obě varianty apolipoproteinu (Glickman *et al.*, 1986; Wu and Windmueller, 1981).

Syntéza VLDL začíná v drsném endoplazmatickém retikulu, na jehož membráně je translatován apo B. Apo B je kotranslačně i posttranslačně lipidován mikrosomálním proteinem přenášejícím TG (MTP). Vznikající částice buď opouští buňku sekretorickou drahou jako VLDL<sub>2</sub>, anebo může fúzovat s tukovou kapénkou – vznikají tak větší částice VLDL<sub>1</sub> (Obr. 1), (Adiels *et al.*, 2008).



Obr. 1: Syntéza VLDL (Adiels *et al.*, 2008).

Na membráně endoplazmatického retikula je syntetizován apo B (1), který je současně lipidován MTP (2). Pokud v buňce chybí TG, apo B není dostatečně lipidován (3) a je směrován k degradaci do proteazomu (4). Vznikající částice pre-VLDL jsou uvolňovány do cytoplazmy, odkud jsou sekretorickou drahou dopravovány k plazmatické membráně a jako VLDL<sub>2</sub> secernovány ven z buňky (5 – 9). Alternativně pre-VLDL fúzí s tukovou kapénkou a do cirkulace vstupují jako tzv. VLDL<sub>1</sub> (10 – 11). Metabolické přeměny tukových kapének (12 – 14). Vysvětlivky: ER – endoplazmatické retikulum, ERGIC – intermediální kompartment mezi ER a Golgiho aparátem, FA – mastná kyselina.

### Regulace syntézy VLDL

Syntéza VLDL závisí na dietě a dostupnosti lipidů (mastných kyselin, TG, cholesterolu, fosfolipidů).

Pro syntézu nových VLDL je nezbytná syntéza apo B, případně jeho snížená degradace (Dixon *et al.*, 1991), poněvadž exprese genu, který ho kóduje, je konstitutivní (Pullinger *et al.*, 1989). Zároveň s apo B je nutná přítomnost MTP – jeho deficit vede k tzv. abetalipoproteinémii (Zamel *et al.*, 2008).

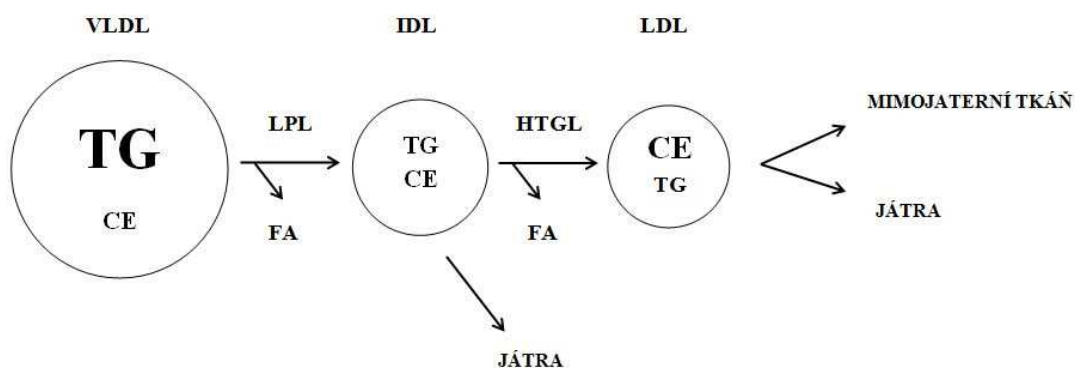
Jak již bylo zmíněno, VLDL slouží k transportu především TG. Produkce VLDL je v zásadě určována nabídkou TG, které jsou v játrech tvořeny *de novo* nebo syntetizovány z mastných kyselin dietního původu či uvolněných z tukové tkáně (Wiggins and Gibbons, 1992). Pokud je TG málo, je apo B degradováno. Pokud je TG nadbytek, vznikají vedle VLDL<sub>2</sub> i velké částice VLDL<sub>1</sub> (Boren *et al.*, 2013).

Pro syntézu VLDL je rovněž důležitý cholesterol – FC je součástí povrchu lipoproteinů, a je tedy nutný pro jeho formování. Zároveň je podstatný esterifikovaný cholesterol – vzniklé CE tvoří základ lipidového jádra lipoproteinů. Pokud je totiž syntéza cholesterolu inhibována, hladina CE v játrech klesá a naopak koncentrace TG roste – nevznikají nové VLDL (Khan *et al.*, 1989). Cholesterol přidaný v dietě zvyšuje koncentraci FC a CE v játrech a zároveň stimuluje syntézu VLDL, včetně syntézy asociovaných proteinů (apo B), (Fungwe *et al.*, 1992).

Syntéza VLDL je také regulována hormonálně (Gibbons, 1990; Keyes and Heimberg, 1979). Nejdůležitějším hormonem, který ji ovlivňuje, je insulin. Ten je po jídle uvolňován z Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, zvyšuje degradaci apo B, zvyšuje retenci TG v buňce a inhibuje MTP (Au *et al.*, 2003; Brown and Gibbons, 2001; Gibbons *et al.*, 2002; Malmstrom *et al.*, 1998).

#### **2.1.1.2 METABOLISMUS VLDL**

V cirkulaci částice VLDL získávají od HDL apo C a apo E. Na lumenální povrchu cévního endotelu interagují s lipoproteinovou lipasou (LPL), která hydrolyzuje TG z jádra lipoproteinu na monoacylglycerol a mastné kyseliny. Uvolňované mastné kyseliny jsou vychytány okolními tkáněmi. Postupně se partikule zmenšují, uvolňují nabyté apo C a apo E a v podobě IDL se vracejí do jater. Játra vychytají zhruba dvě třetiny kolujících IDL. Zbylé částice jsou metabolizovány jaterní lipasou (HTGL) a vznikají tak částice LDL (Obr. 2), (Berman *et al.*, 1978; Olivecrona and Olivecrona, 1995).



Obr. 2: Metabolismus VLDL.

Vysvětlivky: FA – mastná kyselina.

### 2.1.2 Metabolismus LDL

Na rozdíl od VLDL a IDL lipoproteiny o nízké hustotě transportují ve svém hydrofobním jádře především CE. LDL vznikají v cirkulaci postupným odbouráváním VLDL. Část LDL je zpětně vychytána játry. Částice, které nejsou játry odstraněny, cirkulují v krevním řečišti do té doby, než jsou eliminovány prostřednictvím specifických receptorů či jiných nespecifických mechanismů. LDL přináší cholesterol mimojaterním tkáním.

## 2.2 Hypercholesterolémie

Zvýšená hladina cholesterolu neboli hypercholesterolémie vzniká při nadbytečném příjmu cholesterolu a nasycených tuků potravou, nedostatku pohybu, ale také v závislosti na věku, pohlaví a genetických predispozicích (Češka *et al.*, 2005).

Vzestup koncentrace cholesterolu souvisí s hromaděním lipoproteinů v krevním oběhu, které vede k metabolickým onemocněním zvaným hyperlipoproteinémie. Hyperlipoproteinémii rozdělujeme dle Fredricksona na základě pohyblivosti lipoproteinů v elektrickém poli do 6 tříd (Tab. 2).

Tab. 2: Fredricksonova klasifikace dyslipidemií (Češka *et al.*, 2005).

Vysvětlivky: TC – celkový cholesterol.

Fenotyp	Zvýšený lipoprotein	TC v séru	TG v séru	Aterogenicita	Prevalence
<b>I</b>	Chylomikrony	Norma - ↑	↑↑↑↑	Nepozorována	Vzácné
<b>IIa</b>	LDL	↑↑	Norma	+++	Běžné
<b>IIb</b>	LDL a VLDL	↑↑	↑↑	+++	Běžné
<b>III</b>	IDL a remnanty	↑↑	↑↑↑	+++	Střední
<b>IV</b>	VLDL	Norma - ↑	↑↑	+	Běžné
<b>V</b>	VLDL a chylomikrony	Norma - ↑	↑↑↑↑	+	Vzácné

Hypercholesterolemie u člověka je podmíněna především akumulací částic LDL (hyperlipoproteinémie typu IIa), případně v kombinaci se zvýšenou koncentrací VLDL (typ IIb). Méně často je způsobena zvýšenou koncentrací IDL a remnantních částic (typ III), které velikostně odpovídají VLDL, ale na rozdíl od nich jsou obohaceny o cholesterol. Poměr obsahu cholesterolu k obsahu TG ve VLDL – VLDL-C/VLDL-TG – u zdravých jedinců je 0,45, zatímco pacienti s hyperlipoproteinemií typu III mají tento poměr okolo jedné.

Přestože jsou v současné době známy monogenní poruchy v metabolismu cholesterolu, velká část onemocnění spojených s hypercholesterolmií je dána polygenně.

Mezi nejčastější monogenně podmíněné choroby patří dominantní familiární hypercholesterolemie, která je podmíněna buď defektem v receptoru pro LDL (LDLR) u familiární hypercholesterolemie, nebo jeho defektním ligandem apo B-100, a recesivní familiární dysbetalipoproteinémie, která je spojena s isoformou apo E-2 (Češka *et al.*, 2005).

Celá řada genů, jejichž varianty jsou u lidí odpovědné za vzestup cholesterolemie (*APOB*<sup>1</sup>, *LDLR*<sup>2</sup>, *CETP*<sup>3</sup>, *PCSK9*<sup>4</sup> ad.) již byla identifikována, přesto však všechny geny pravděpodobně ještě neznáme.

Důležitou úlohu ve studiu patogeneze hypercholesterolemie hrají zvířecí experimentální modely.

<sup>1</sup> *APOB* – lidský gen pro apolipoprotein B

<sup>2</sup> *LDLR* – lidský gen pro receptor pro lipoproteiny o nízké hustotě

<sup>3</sup> *CETP* – lidský gen pro protein přenášející cholesterylestery

<sup>4</sup> *PCSK9* – lidský gen pro proprotein konvertasu subtilisin/kexin typ 9

### 2.3 Experimentální modely hypercholesterolémie

Transport cholesterolu z jater do těla je zprostředkován částicemi VLDL a LDL. Na rozdíl od člověka je u většiny savců poločas LDL extrémně krátký a LDL u nich v cirkulaci v podstatě chybí. Většinu cholesterolu pak tyto živočichové transportují v HDL a označujeme je jako tzv. „HDL savce“. Do této skupiny patří z běžných laboratorních zvířat např. potkan a myš. „HDL savci“ jsou odolní vůči vzniku aterosklerózy. Na druhou stranu člověk, králík a prase transportují většinu svého cholesterolu v LDL. Majoritní cesta transportu cholesterolu se však může lišit i u jedinců stejného druhu, ale jiného kmene, pohlaví či stáří. Důležitou roli hraje i životní styl, resp. typ potravy (rostlinného / živočišného původu) a u hibernantů dokonce i sezóna (Chapman, 1986).

Historicky prvním experimentálním modelem hypercholesterolémie se stal na počátku minulého století králík. Postupně byly využívány další zvířecí druhy (potkan, myš, prase, pes, opice). Modely hypercholesterolémie jsou získávány metodami molekulární biologie, krmením cholesterolovou dietou, případně šlechtěním.

Nalézt vhodný experimentální model pro studium hypercholesterolémie a aterosklerózy není jednoduché. Někteří živočichové téměř neodpovídají na podávání cholesterolové či vysokotukové diety. Proto se u nich hypercholesterolémie vyvolává podáváním nefyziologického množství dietního cholesterolu, žlučových kyselin, případně léků ovlivňujících štítnou žlázu. Anebo u nich hypercholesterolémie může být způsobena odstraněním zmíněné žlázy. Na druhou stranu u některých živočišných druhů lze snadno vyvolat hypercholesterolémii podáním dietního cholesterolu. Přestože tyto živočichové rozvinou těžkou hypercholesterolémii, nevyvíjejí se u nich aterosklerotické léze - jako model pro výzkum aterosklerózy jsou tudíž nevhodní.

#### 2.3.1 Geneticky modifikované modely hypercholesterolémie

V dnešní době jsou nejčastěji používanými modely organismy, které byly upraveny metodami molekulární biologie (knock-out či transgeneze). Tyto modely jsou vhodné pro studium genů s předpokládanou úlohou v patogenezi. Avšak u polygenní hypercholesterolémie je známa pouze malá část genů, které se na jejím vzniku podílejí.

Nejrozšířenějšími geneticky modifikovanými modely jsou myši. Cílenou delecí genu *ApoE*, jehož produkt – apo E – je ligandem receptoru vychytávajícího lipoproteiny s apo B-48 (protein příbuzný LDLR) z cirkulace, u nich vzniká hypercholesterolémie

a následně i ateroskleróza (Smithies and Maeda, 1995). Dalším modelem hypercholesterolémie jsou myši deficitní v LDLR (*Ldlr*<sup>-/-</sup>), (Ishibashi *et al.*, 1993). U těchto myší nedochází k odstraňování LDL z oběhu. Částice se hromadí v krvi a vzniká hypercholesterolémie analogická familiární hypercholesterolémii. Ateroskleróza se u nich rozvíjí až na vysokotukové dietě (Knowles and Maeda, 2000).

Příkladem transgenního modelu hypercholesterolémie jsou myši *apoE*\*3<sup>leiden</sup>, které produkují mutovanou variantu lidského *APOE3* (*van den Maagdenberg et al.*, 1993). Mutovaná alela způsobuje dominantní formu dysbetalipoproteinémie. Myši jsou hyperlipidemické a na cholesterolové dietě vyvíjejí aterosklerotické léze (*van Vlijmen et al.*, 1994).

### 2.3.2 Hypercholesterolémie indukovaná dietou

Hypercholesterolémii můžeme u pokusných modelů vyvolat podáváním diety obohacené nasycenými tuky a cholesterolem, nebo u vnímavějších druhů kombinací vysoké koncentrace tuku a sacharosy.

Citlivost k dietám tohoto typu se mezi živočichy liší. Např. králíci, ptáci a někteří primáti jsou k cholesterolové dietě vnímavější, zatímco u prasat a psů je zapotřebí dieta vysoce obohacená o nasycené tuky.

U druhů s nízkou sensitivitou k cholesterolové dietě (prase, pes, potkan) je hypercholesterolémie vyvolávána dalšími metodami jako např. chirurgickým odstraněním štítné žlázy, jejím farmakologickým ovlivněním nebo podáváním diety bohaté na soli žlučových kyselin (kyseliny cholové). Při této metodě se mohou projevit nežádoucí vedlejší hepatotoxické účinky (Poedne and Vrána, 1989).

### 2.3.3 Modely se spontánní hypercholesterolémií

Zvířata se spontánní hypercholesterolémií byla vyšlechtěna příbuzenským křížením jedinců s vysokou koncentrací cholesterolu. Tyto modely mají na standardní dietě zvýšenou hladinu cholesterolu a jsou celkově sensitivnější vůči dietám se zvýšeným obsahem tuku a cholesterolu (Poedne and Vrána, 1989).

Významnými modely se spontánní hypercholesterolémií jsou Watanabeho hereditárně hyperlipemický (WHHL) králík a Pražský hereditárně hypercholesterolemický (PHHC) potkan.

### **2.3.3.1 WATANABEHO HEREDITÁRNĚ HYPERLIPEMICKÝ (WHHL) KRÁLÍK**

WHHL králíka vyšlechtil v 70. letech minulého století Watanabe rozmnožením mutantního hyperlipidemického samce (Watanabe, 1980). WHHL králík hromadí v cirkulaci částice LDL a není schopen je účinně odbourávat – je deficitní v LDLR (Attie *et al.*, 1981; Kita *et al.*, 1981; Tanzawa *et al.*, 1980). Popsaný fenotyp odpovídá fenotypu pacientů s familiární hypercholesterolémií. WHHL králík je vhodným modelem pro studium metabolismu lipoproteinů, hypercholesterolémie a aterosklerózy (Shiomi and Ito, 2009).

### **2.3.3.2 PRAŽSKÝ HEREDITÁRNĚ HYPERCHOLESTEROLEMICKÝ (PHHC) POTKAN**

Potkan není příliš vhodným modelem pro výzkum hypercholesterolémie a aterosklerózy. Patří mezi živočichy transportující většinu svého cholesterolu v HDL a jejich sérová hladina cholesterolu je obvykle nižší než 2 mmol/l (Chapman, 1986).

Potkani nejsou sensitivní k cholesterolové ani tukové dietě, pokud jim nejsou podány žlučové kyseliny či látky ovlivňující štítnou žlázu (Cole *et al.*, 1984; DeLamatre and Roheim, 1981; Mahley and Holcombe, 1977). Degenerativní změny se u nich objevují až při extrémních podmínkách.

V minulosti se leč podařilo vyšlechtit několik kmenů citlivých k cholesterolové dietě (Mashimo *et al.*, 2007). Na druhou stranu pokusy vyšlechtit linie potkanů s vyšší bazální hladinou cholesterolu byly často neúspěšné – zvýšená hladina cholesterolu odpovídala zvýšenému transportu cholesterolu v HDL, anebo u nich v určité generaci došlo ke ztrátě plodnosti (Ouguerram *et al.*, 1996; Poledne and Vrána, 1989). Zlomovým bodem v hledání vhodného modelu pro studium hypercholesterolémie bylo vyšlechtění PHHC potkana.

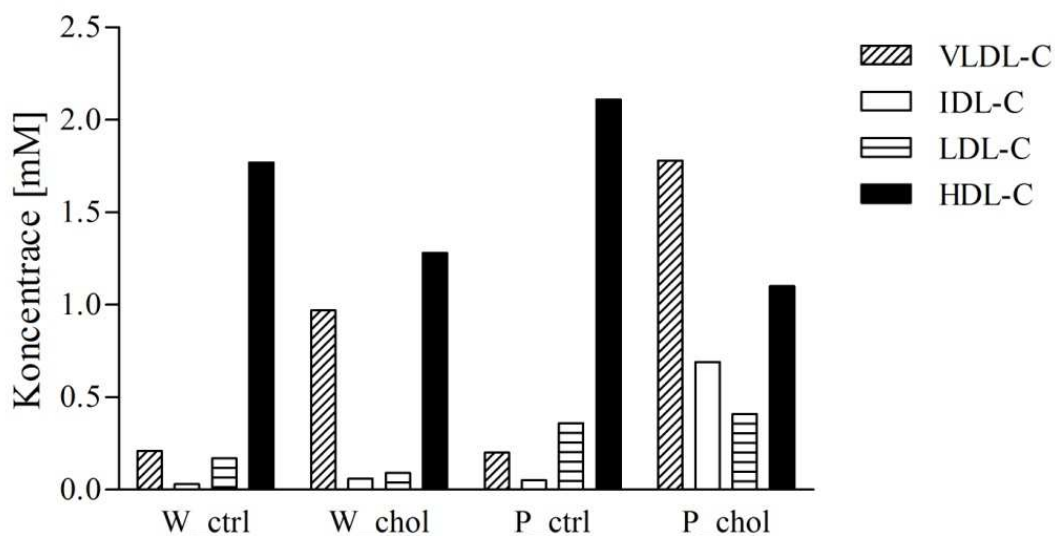
PHHC potkan byl vyšlechtěn v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze (Poledne, 1986). Nový kmen laboratorního potkana vznikl křížením potkanů kmene Wistar, kteří na cholesterolové dietě vyvinuli hypercholesterolémii, aniž by jim v dietě byly podávány žlučové soli či látky inhibující štítnou žlázu. Opakovaným křížením byla získána zvířata, která na standardní laboratorní dietě měla mírně zvýšený cholesterol v krvi a na cholesterolové dietě vyvíjela mnohonásobně zvýšenou hypercholesterolémii proti potkanům kmene Wistar.

Při zpětném křížení PHHC potkanů s kontrolními zvířaty bylo zjištěno, že hypercholesterolémie je u PHHC potkanů polygenního charakteru (Reysserová

and Poledne, unpublished data). Přestože hladina cholesterolu je u PHHC potkanů na cholesterolové dietě srovnatelná s hladinou cholesterolu u pacientů s hypercholesterolémií, nevyvíjí se u PHHC potkanů po 6 měsících na 2% cholesterolové dietě ateroskleróza (Kovář *et al.*, 2009).

### 2.3.3.2.1 Lipoproteinový profil PHHC potkana

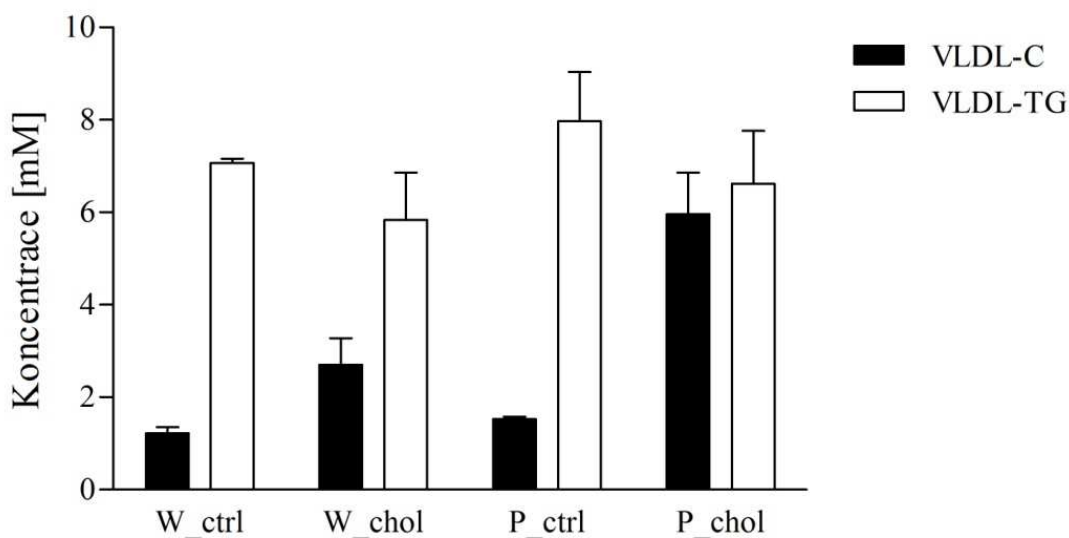
Na standardní dietě je většina plazmatického cholesterolu transportována v HDL jak u potkanů kmene Wistar, tak i PHHC. Na cholesterolové dietě se u potkanů Wistar zvyšuje podíl transportovaného cholesterolu ve VLDL, u PHHC potkanů navíc i v IDL a LDL (Obr. 3). Zatímco u potkanů Wistar zůstává dominantním přenašečem cholesterolu HDL i na cholesterolové dietě, u PHHC potkanů přebírá tuto roli VLDL. Částice VLDL jsou u obou linií na cholesterolové dietě obohaceny cholesterolem, ale u PHHC potkanů je poměr VLDL-C/VLDL-TG výrazně vyšší. Přitom koncentrace cholesterolu v játrech se mezi oběma liniemi potkana neliší (Vlachová *et al.*, 2013).



Obr. 3: Lipoproteinový profil PHHC potkana a potkana Wistar na kontrolní a 1% cholesterolové dietě (Vlachová *et al.*, 2013).

Vysvětlivky: HDL-/IDL-/LDL-C - cholesterol v částicích HDL/IDL/LDL, P\_chol – potkani kmene PHHC na cholesterolové dietě, P\_ctrl – potkani kmene PHHC na kontrolní dietě, W\_chol – potkani kmene Wistar na cholesterolové dietě, W\_ctrl – potkani kmene Wistar na kontrolní dietě.

Dvě hodiny po intravenózním podání tyloxapolu (inhibitoru LPL) nebyly mezi kmeny zjištěny rozdíly v koncentraci VLDL-TG. Koncentrace VLDL-C u PHHC potkana je však na cholesterolové dietě 2krát vyšší. Poměr VLDL-C/VLDL-TG je u PHHC potkanů na cholesterolové dietě roven přibližně jedné, zatímco u potkanů Wistar na téže dietě je roven cca 0,45 (Obr. 4), (Vlachová *et al.*, 2013). Podíl FC a CE ve VLDL (VLDL-FC a VLDL-CE) nebyl zatím ještě charakterizován.



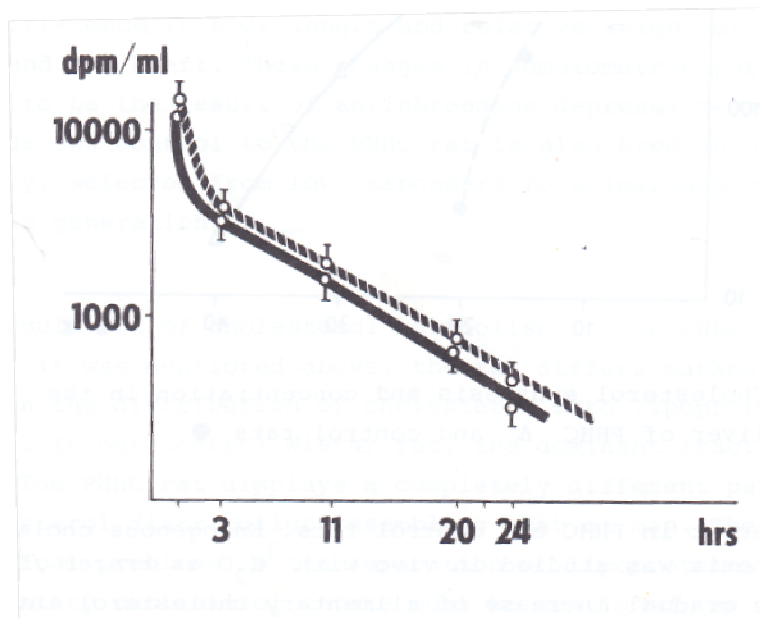
Obr. 4: Koncentrace cholesterolu a TG ve VLDL izolovaných z plazmy 2 hodiny po intravenózní aplikaci tyloxapolu (Vlachová *et al.*, 2013).

Lipoproteinový profil PHHC potkanů na cholesterolové dietě odpovídá profilu pacientů s familiární dysbetalipoproteinémií, u nichž je s lipoproteiny bohatými na TG asociována isoforma apo E-2. Apo E-2 má nižší afinitu k receptoru pro tyto partikule, a dochází tak k jejich hromadění v cirkulaci (Češka *et al.*, 2005).

Při sekvenování genu kódujícího apo E u PHHC potkanů byla v prvním exonu objevena jednonukleotidová záměna (G>C v pozici +24 od začátku transkripce). První exon tohoto genu sice není překládán do proteinu, ale mohl by mít vliv na jeho expresi. Role apo E v hypercholesterolémii PHHC potkanů byla však vyloučena poté, co nebyly mezi liniemi nalezeny rozdíly v koncentraci zkoumaného proteinu (Heczková, 2010).

V původní práci z 80. let nebyl pozorován mezi PHHC potkany a kontrolními zvířaty rozdíl v rychlosti vychytávání LDL z cirkulace, a proto byl u PHHC potkanů vyloučen defekt v LDLR (Obr. 5). Mezi liniemi nebyly rovněž zjištěny rozdíly v rychlosti vstřebávání dietního cholesterolu (Poledne, 1986), ani zásadní rozdíly

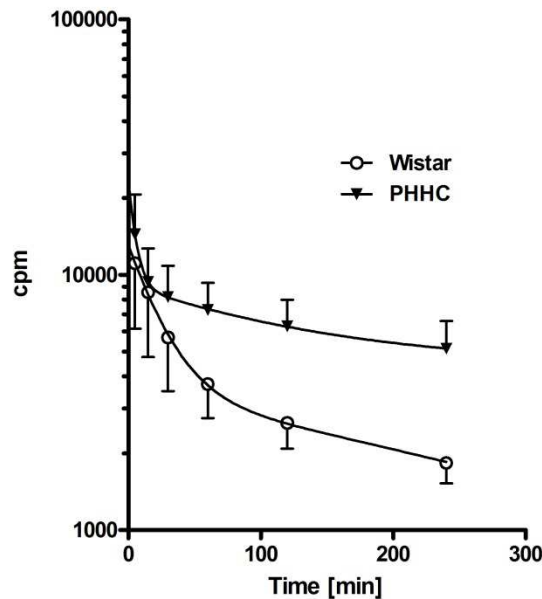
v aktivitě lecithin:cholesterolacyltransferasy (LCAT), (Kovář, 1991), či aktivitě LPL a HTGL (Bařinka, 1995).



Obr. 5: Clearance  $^{125}\text{I}$ -LDL z cirkulace (Poledne, 1986).

LDL potkanů Wistar byly izolovány, označeny radioaktivním jódem ( $^{125}\text{I}$ -LDL) a intravenózně aplikovány potkanům PHHC a Wistar. Pokles radioaktivity  $^{125}\text{I}$  v plazmě se u obou kmenů nelišil.

Mezi liniemi byl nicméně pozorován rozdíl v clearance VLDL (Obr. 6). VLDL potkanů PHHC a Wistar na cholesterolové dietě byly izolovány, označeny radioaktivním jódem ( $^{125}\text{I}$ -VLDL) a aplikovány do žíly potkanům Wistar. Z tohoto pokusu vyplývá, že VLDL obohacené cholesterolem u PHHC potkanů přetrvávají v cirkulaci déle než VLDL potkanů Wistar (Vlachová *et al.*, 2013). Hypercholesterolemie je u PHHC potkana dána zpomaleným katabolismem VLDL jakožto převládajícího přenašeče cholesterolu po jeho dietním podání. Mechanismus, který je odpovědný za zpomalenou clearance VLDL PHHC potkanů, zatím není známý. Vzhledem k vysokému obsahu cholesterolu nemohou být pravděpodobně částice normálně metabolizovány.



Obr. 6: Clearance <sup>125</sup>I-VLDL z cirkulace (Vlachová *et al.*, 2013).

Na cholesterolové dietě stoupá u PHHC potkana koncentrace cholesterolu ve VLDL. Podíl obou forem cholesterolu – VLDL-FC a VLDL-CE – na vzestupu VLDL-C ale zatím neznáme. PHHC potkani odstraňují tyto obohacené částice z cirkulace podstatně pomaleji – jsou zřejmě metabolicky defektní.

Z pokusu s tyloxapolem vyplývá, že u PHHC potkana dochází k zvýšené inkorporaci cholesterolu do VLDL přímo v hepatocytu. Proč se u PHHC potkanů přesouvá více cholesterolu do VLDL než u potkanů Wistar, i když je koncentrace cholesterolu v játrech u obou linií srovnatelná, stále zůstává neobjasněno. To by mohla vysvětlit zvýšená aktivita acylkoenzymA:cholesterolacyltransferasy (ACAT), nebo MTP.

ACAT je mikrosomální protein, vyskytuje se ve dvou isoformách ACAT1 a ACAT2, které jsou kódovány geny *Soat1* a *Soat2*. Hlavní isoformou hepatocytů a enterocytů u myši i lidí je ACAT2 (Cases *et al.*, 1998; Oelkers *et al.*, 1998; Parini *et al.*, 2004). Mají-li isoformy mezi sebou rozdělenou funkci, je stále diskutováno. V tkáních, jako jsou varlata či nadledviny, převažuje u myši isoforma ACAT1 a cholesterol je zde ukládán především v podobě CE v tukových kapénkách. Na druhou stranu v játrech a střevě může být přímo transportován do nově vznikajících lipoproteinů s apo B na svém povrchu (Rudel *et al.*, 2001).

Při syntéze VLDL hraje významnou roli MTP, který je kódován genem *Mtp*. MTP je součástí mikrosomů a transportuje lipidy (CE, TG a fosfatidylcholin) na vznikající částice VLDL (Jamil *et al.*, 1998; Wetterau and Zilversmit, 1984).

### 2.3.3.2.2 Analýza transkriptomu v játrech u PHHC potkana

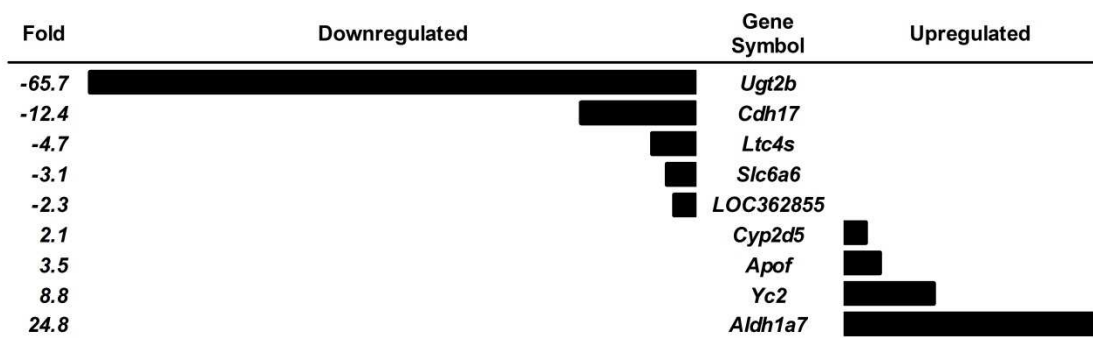
Analýza transkriptomu v játrech u potkanů kmene PHHC a Wistar na kontrolní i cholesterolové dietě ukázala, že zvýšený příjem cholesterolu potlačuje u obou kmenů expresi genů nezbytných pro jeho syntézu a transport (Obr. 7). Tento pokles exprese byl v souladu s očekáváním, ale překvapivě nebyly mezi oběma liniemi nalezeny rozdíly. Naproti tomu bylo identifikováno několik genů, jejichž exprese se bez ohledu na dietu mezi kmeny zásadně lišila (Obr. 8). Funkce těchto genů u potkana není dosud objasněna, a proto by se jim měla v dalším výzkumu věnovat pozornost (Vlachová *et al.*, 2013).

Wistar Fold	Gene Symbol	PHHC Fold
<b>cholesterol biosynthesis</b>		
-2.9	<i>Acat2</i>	-3.9
-2.2	<i>Hmgcs1</i>	-3.5
-3.7	<i>Idi1</i>	-4.8
-2.6	<i>Fdft1</i>	-2.7
-8.8	<i>Sqle</i>	-13.6
-3.8	<i>Cyp51</i>	-4.3
-3.0	<i>Tm7sf2</i>	-3.7
-5.0	<i>Sc4mol</i>	-6.8
<b>lipoprotein metabolism</b>		
-4.6	<i>Insig1</i>	-3.0
-2.8	<i>Fads1</i>	-3.0
-2.1	<i>Pcsk9</i>	-2.5

Obr. 7: Vliv cholesterolové diety na expresi genů účastnících se biosyntézy cholesterolu nebo metabolismu lipoproteinů u potkanů PHHC a Wistar (Vlachová *et al.*, 2013).

V grafu jsou uvedeny pouze geny, jejichž exprese byla u zvířat na cholesterolové dietě alespoň 2krát nižší než u zvířat na dietě kontrolní ( $p < 0,05$ ).

Geny kódují tyto proteiny: *Acat2* – acetylCoA:acetyltransferasa 2, *Hmgcs1* – 3-hydroxy-3-methylglutaryl:CoA-synthasa 1, *Idi1* – isopentyl-difosfát- $\Delta$ -isomerasa 1, *Fdft1* – farnesyldifosfát-farnesyltransferasa 1, *Sqle* – skvalenepoxidasa, *Cyp51* – sterol-14-demethylasa, *Tm7sf2* –  $\Delta$ 14-sterolreduktasa, *Sc4mol* – protein podobný sterol-C4-methyloxidase, *Insig1* – gen indukovaný insulinem 1, *Fads1* – desaturasa mastných kyselin 1, *Pcsk9* – proproteinkonvertasa subtilisin/kexin typ 9.



Obr. 8: Rozdíly v expresi genů mezi potkany kmene PHHC a Wistar (Vlachová *et al.*, 2013).

V grafu jsou uvedeny pouze geny, jejichž exprese se mezi kmeny potkanů na stejné dietě lišila alespoň dvakrát ( $p < 0,05$ ).

Geny kódují tyto proteiny: *Ugt2b* – podjednotka UTP-glukuronosyltransferasy, *Cdh17* – kadherin 17, *Ltc4s* – leukotrien-C4-synthasa, *Slc6a6* – taurinový transportér, *LOC362855* – predikovaný protein P55, *Cyp2d5* – protein z rodiny cytochromů P450, *ApoF* – apolipoprotein F, *Yc2* – podjednotka glutathion-S-transferasy, *Aldh1a7* – aldehyddehydrogenasa 1a7.

Zajímavý rozdíl v expresi mezi kmeny byl pozorován u genu pro apo F. U PHHC potkanů byla exprese proti potkanům Wistar zvýšena na obou typech pokusné diety. Lidský analog apo F inhibuje protein přenášející CE (CETP), který mezi lipoproteiny vyměňuje CE, TG a v menší míře i fosfolipidy (Morton and Zilversmit, 1981; Tall, 1993). U potkanů ale CETP zcela chybí (Guyard-Dangremont *et al.*, 1998). Funkce apo F je u potkanů neznámá.

Při další analýze genu byla sekvenací objevena 17nukleotidová inserce ve druhém exonu, která vede ke vzniku předčasného STOP kodónu. PHHC potkani jsou v této mutaci homozygotní. S relativně nízkou frekvencí se tato inserce vyskytuje i u potkanů Wistar. Předčasné ukončení přepisu genu pravděpodobně způsobuje tvorbu nefunkčního proteinu, což by mohlo být odůvodněním pro zvýšenou expresi příslušného genu (Heczková, 2010).

### 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Podíl volného a esterifikovaného cholesterolu po podání dietního cholesterolu nebyl zatím charakterizován ani v játrech ani ve VLDL PHHC potkana.

Zvýšená produkce VLDL obohacených cholesterolem v játrech PHHC potkana by mohla být způsobena změnami v aktivitě proteinů, které se v játrech podílí na jeho syntéze. Mezi tyto proteiny patří acylkoenzymA:cholesterolacyltransferasa (ACAT) a protein přenášející triacylglyceroly (MTP).

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit u PHHC potkanů a kontrolních potkanů Wistar:

- Jak se mění koncentrace FC a CE v játrech po podání dietního cholesterolu.
- Jak podání dietního cholesterolu ovlivní koncentraci FC a CE ve VLDL.
- Jak podání dietního cholesterolu ovlivní expresi genů *ApoB*, *Cyp7a1*, *Mtp*, *Soat1* a *Soat2*.
- Jak podání dietního cholesterolu ovlivní aktivitu dvou proteinů (ACAT a MTP) s předpokládanou úlohou v regulaci syntézy a sekrece VLDL.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Schéma pokusu

#### MODELOVÝ ORGANISMUS A PODMÍNKY CHOVU

V pokusu bylo použito po 12 samcích potkanů PHHC a Wistar. Byla vybrána zdravá zvířata o hmotnosti 360 – 460 g.

Potkani kmene PHHC byli odchováni v konvenčním zvěřinci malých laboratorních zvířat IKEM za standardních světelných podmínek (12 h světlo : 12 h tma) při teplotě 22 °C. Potkani kmene Wistar byli dodáni společností AnLab s.r.o. (Česká republika) a před zahájením pokusu byli 3 týdny aklimatizováni na podmínky konvenčního chovu IKEM.

K potravě a vodě měli potkani po celou dobu přístup *ad libitum*.

#### EXPERIMENTÁLNÍ DIETY

- Kontrolní dieta

Standardní laboratorní dieta M2 (SEMED, Česká republika) s přidaným 5% palmitojádrovým olejem.

- Cholesterolová dieta

Standardní laboratorní dieta M2 (SEMED, Česká republika) s přidaným 1% cholesterolem rozpuštěným v 5% palmitojádrovém oleji.

#### USPOŘÁDÁNÍ EXPERIMENTU A ODBĚR TKÁNÍ

Zvířata byla rozdělena do 4 pokusných skupin podle podávané diety a kmene (viz Tab. 3). Po 3 týdnech byla zvířata pod etherovou narkózou usmrcena dekapitací. Zvířata byla vykřvena do zkumavek a byl proveden odběr vzorků jater.

Tab. 3: Pokusné skupiny.

Zkratka Kmen_dieta	Příslušnost ke kmeni	Experimentální dieta	Počet zvířat ve skupině
P_chol	PHHC	cholesterolová	6
P_ctrl	PHHC	kontrolní	6
W_chol	Wistar	cholesterolová	6
W_ctrl	Wistar	kontrolní	6

Ihned po usmrcení byly ze stejného jaterního laloku odebrány dva kusy jater o hmotnosti cca 50 mg. Vzorky, určené pro izolaci RNA, byly vhozeny do předem připravených zkumavek s 1 ml TRIzol<sup>®</sup> a do dalšího zpracování byly ponechány v ledové lázni.

Následně byla vyjmuta celá játra. Ta byla opláchnuta fyziologickým roztokem, zvážena a rozdělena na přibližně stejně velké díly (~ 1 g). Zvážené vzorky jater byly okamžitě zamraženy v tekutém dusíku a poté uskladněny v -80 °C.

Centrifugací krve (3 000 g, 15 min, 4 °C) bylo získáno sérum, ve kterém ještě téhož dne mezinárodně certifikovaná Lipidová laboratoř IKEM (LL IKEM) stanovila koncentraci celkového cholesterolu (TC) a TG. Alikvoty séra (300 µl) každého pokusného zvířete byly uloženy do -80 °C pro měření koncentrace TC a FC komerční soupravou společnosti BioVision (USA). Ze zbývajících séra byly izolovány VLDL ultracentrifugací. LL IKEM byla stanovena koncentrace VLDL-C a VLDL-TG a později soupravou firmy BioVision (USA) koncentrace VLDL-C a VLDL-FC.

Dvě minuty před homogenizací byly z ledu vyňaty vzorky s 50 mg jaterní tkáně. Ty byly homogenizovány pomocí elektrického homogenizátoru, který byl vždy mezi jednotlivými vzorky očištěn (2x vodou z kohoutku, ethanolem, 2x destilovanou vodou). Homogenáty byly ponechány 10 min při laboratorní teplotě a poté byly centrifugovány (12 000 g, 10 min, 4 °C). Odebraný supernatant byl uložen do -80 °C.

## 4.2 Použité chemikálie, materiál a přístroje

### 4.2.1 Chemikálie

- Agarosa, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo.
- Diethylether, MERCK, Německo.
- EDTA, AppliChem, Německo.
- Ethanol, PENTA, Česká republika.
- Ethidium bromid, Sigma-Aldrich, Německo.
- Fyziologický roztok, B. Braun, Německo.
- Hexan, MERCK, Německo.
- Hovězí sérový albumin (BSA; bez mastných kyselin), PAA Laboratories GmbH, Rakousko.
- Hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextran, Sigma-Aldrich, Čína.
- Chloroform, PENTA, Česká republika.
- Cholesterol, Sigma-Aldrich, USA.
- Cholesteryloleát ( $\geq 98\%$  čistota pro HPLC), Sigma-Aldrich, USA.
- Isopropanol, HPLC, PENTA, Česká republika.
- Kyselina boritá, AppliChem, Německo.
- Kyselina octová, PENTA, Česká republika.
- Krystalický jód, PENTA, Česká republika.
- Leupeptin 95% (HPLC), Sigma-Aldrich, USA.
- Methanol, J. T. Baker, Nizozemsko.
- MTP, lidský, částečně purifikovaný, Roar Biomedical, Inc., USA.
- N<sub>2</sub> technický, stlačený, SIAD, Česká republika.
- NP-40 10%, BioVision, USA.
- <sup>14</sup>C-OleoylCoA ( $\beta$ -zářič), specifická aktivita 2,22 GBq/mmol, PerkinElmer<sup>®</sup>, USA.
- Palmitojádrový olej - dar doc. Ing. Bráta, CSc., Unilever, Česká republika.
- PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride), Sigma-Aldrich, Německo.
- Sacharosa, PENTA, Česká republika.
- Scintilační tekutina Rotiszint ecco plus, Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo.
- Souprava QIAquick<sup>®</sup> pro purifikaci produktů PCR, QIAGEN<sup>®</sup>, Německo:

- Kolonky.
- Promývací pufr.
- Vazebný pufr.
- Souprava pro stanovení aktivity MTP, Roar Biomedical, Inc., USA:
  - Donorové částice, 260 nmol/ml.
  - Akceptorové částice.
  - Pufr (10x koncentrovaný).
- Souprava pro reverzní transkripci, Fermentas, Thermo Scientific, Litva:
  - Inhibitor RNAs, 2 u/μl.
  - Reakční pufr (5x koncentrovaný).
  - 10mM Mix dNTP.
  - Náhodné hexamerní primery.
  - Oligo dT primery.
  - Reverzní transkriptasa, 200 u/μl.
  - RNasa H, Fermentas, 5 u/μl.
- Souprava pro stanovení exprese genů, Applied Biosystems™, USA:
  - Směs primerů a fluorescenčních sond, TaqMan® MGB probes, FAM™ dye-labeled.
    - *Apof (Rn01756260\_g1).*
    - *Cyp7a1 (Rn00564065\_m1).*
    - *Mttp (Rn01522961\_m1).*
    - *Soat1 (Rn00579605\_m1).*
    - *Soat2 (Rn00596636\_m1).*
    - *Vars2l (Rn01531995\_m1).*
  - Reakční pufr TaqMan® Gene Expression Master mix.
- Souprava pro stanovení cholesterolu/cholesterylesterů, BioVision, USA:
  - Pufr.
  - Cholesterolová sonda v DMSO.
  - Mix lyofilizovaných enzymů.
  - Lyofilizovaná cholesterolesterasa.
  - Standardní roztok cholesterolu, 2 μg/μl.
- Souprava pro stanovení cholesterolu (Cholesterol SYS 1 Cobas), Roche, Německo.

- Souprava pro stanovení proteinu, Pierce Biotechnology, USA:
  - Reagencie A (obsahuje  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  v 0,1M NaOH, kys. bichinoninovou).
  - Reagencie B (obsahuje 4%  $\text{CuSO}_4$ ).
  - Ampule s albuminovým standardem, 2 mg/ml.
- Souprava pro stanovení triacylglycerolů, GPO-PAP Sys 917 Cobas, Roche, Německo.
- Superčistá voda, Sigma-Aldrich, Německo.
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, PENTA, Česká republika.
- TRIzol<sup>®</sup>, Invitrogen, Nový Zéland.
- Další běžné chemikálie: HCl (úprava pH),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , KCl, KOH (úprava pH), NaCl, NaOH (úprava pH).

#### 4.2.2 Materiál a další nástroje

- Chirurgické nástroje (pinzety, nůžky, skalpel), MEDIN<sup>®</sup>, Česká republika.
- Chromatografické desky Silica on TLC Alu foils, Fluka<sup>®</sup> Analytical, Sigma-Aldrich, Německo.
- Chromatografické vany.
- Skleněný homogenizátor.
- Ultracentrifugační zkumavky:
  - Ultra-Clear, 13 x 64 mm, Beckman Coulter, USA.
  - Zkumavky, 13 x 60 mm, Hitachi Koki Co., Ltd., Japonsko.
- Další běžný spotřební materiál: špičky, zkumavky, vialky, 96jamkové destičky s plochým dnem (průhledné i neprůhledné), Pasteurovy pipety ad.

#### 4.2.3 Přístroje

- Analytické váhy, BOECO, Německo.
- Autoanalyzátor Hitachi 902, Roche, Německo.
- Beta Counter TRI-CARB 2900TR, PerkinElmer<sup>®</sup>, USA.
- Biologický termostat BT120, Laboratorní přístroje, Československo.
- Centrifuga 5415R, Eppendorf, Německo.
- Centrifuga Allegra X-12R, Beckman Coulter, USA.
- Centrifuga Combi-Spin FVL-2400N, BioSan, Lotyšsko.

- Centrifuga chlazená MR22i, Jouan, Francie.
- Centrifuga miniSpinPlus, Eppendorf, Německo.
- Centrifuga MPW-250e, P-LAB a.s., Polsko.
- Centrifuga Z300K, HERMLE Labortechnik, Německo.
- Elektroforetické zařízení HU10 Mini-Plus, Scie-Plas Ltd., Velká Británie.
- Homogenizátor T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA, Německo.
- Homogenizátor nožový TissueRuptor, QIAGEN Hilden, Německo.
- Kombinovaný destičkový reader Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., USA (Gen5™).
- Kontaminační monitor LB 124, BERTHOLD Technologies, Německo.
- Laboratorní váhy HF-200G-EC, AND Instruments Ltd., Japonsko.
- Laminární box s UV lampou, BioSan, Lotyšsko.
- LightCycler® 96, Roche Diagnostics GmbH, Německo.
- Magnetická míchadla ESP, VELP® Scientifica, Itálie.
- Mikroultracentrifuga Himac CS 120GX, Hitachi Medical Systems, USA.
- Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA.
- Sterilizátor HS 62A, LABO-MS, Česká republika.
- pH-metr CyberScan510<sup>PC</sup>, EUTECH Instruments, Thermo Scientific, USA.
- Termocykler Alpha™ Unit Block Assembly for DNA Engine® Systems, BIO-RAD, USA.
- Třepačka s vodní lázní 1083, GFL®, Německo.
- Ultracentrifuga LE 80-K, Beckman Coulter, USA.
- Vortex MS3, IKA, Německo.
- Zdroj elektrického proudu, BIO-RAD, USA.

## 4.3 Použité metody

### 4.3.1 Ultracentrifugace

#### PRINCIP METODY:

Metoda izolace lipoproteinů ze séra ultracentrifugací využívá rozdílných hustot jednotlivých tříd (Havel *et al.*, 1955). Lipoproteiny o nižší hustotě, než je hustota roztoku, flotují na povrch a je možné je separovat. Částice VLDL jsou izolovány při hustotě 1,006 g/ml, která odpovídá hustotě fyziologického roztoku.

#### PRACOVNÍ POSTUP:

Na základě výsledků stanovení koncentrace TC a TG v séru v LL IKEM byly v rámci jedné pokusné skupiny smíchány definované objemy (1,3 – 4 ml) dvou vzorků séra o přibližně stejné koncentraci TC a TG. Poté byl definovaný objem vzniklé směsi (2,3 – 5 ml) přenesen do ultracentrifugačních zkumavek a doplněn fyziologickým roztokem o hustotě 1,006 g/ml na celkový objem 6,5 ml. Zkumavky byly uzavřeny a ultracentrifugovány v rotoru 50.4 Ti (39 000 rpm, 18 h, 8 °C). Zkumavky byly přeříznuty přibližně 20 mm pod jejich horním okrajem. Horní fáze (06T) obsahující částice VLDL i fáze spodní (06B) byly kvantitativně přeneseny do nových zkumavek. Z horní i spodní frakce bylo odebráno 200 µl ke stanovení TC a TG Lipidovou laboratoří IKEM. Izolované VLDL byly před další analýzou uskladněny v -80 °C.

#### *Výpočet koncentrace VLDL-C a VLDL-TG*

$$c_{VLDL-C} = c_{06T-C} \times \frac{V_{06T}}{V}$$
$$c_{VLDL-TG} = c_{06T-TG} \times \frac{V_{06T}}{V}$$

Vysvětlivky:  $c_{06T-C}$  – koncentrace cholesterolu v horní ultracentrifugační fázi [mmol/l],  $c_{06T-TG}$  – koncentrace TG v horní ultracentrifugační fázi [mmol/l],  $c_{VLDL-C}$  – koncentrace cholesterolu ve VLDL [mmol/l],  $c_{VLDL-TG}$  – koncentrace TG ve VLDL [mmol/l],  $V_{06T}$  – objem horní ultracentrifugační fáze [ml],  $V$  – celkový objem vzorku [ml].

### **4.3.2 Stanovení koncentrace celkového cholesterolu, volného cholesterolu, cholesterylesterů a triacylglycerolů**

LL IKEM stanovila koncentraci TC v séru, ultracentrifugačních frakcích (06T a 06B) a játrech pomocí komerční sady Cholesterol SYS 1 Cobas (Roche, Německo). Stanovení TG v séru a ultracentrifugačních frakcích (06T a 06B) provedla LL IKEM pomocí komerční soupravy GPO-PAP Sys 917 Cobas (Roche, Německo). Stanovení TC i TG bylo provedeno na autoanalyzátoru Hitachi 902 (Roche, Německo).

Koncentrace TC v séru, VLDL a játrech byla ještě stanovována společně s koncentrací FC komerční soupravou společnosti BioVision (USA).

Obě metody stanovení TC byly mezi sebou porovnány.

#### PRINCIP METODY STANOVENÍ TC A FC SOUPRAVOU SPOLEČNOSTI BIOVISION (USA):

Komerční souprava společnosti BioVision (USA) umožňuje kvantifikovat TC (FC + CE), případně FC v séru, buněčném či tkáňovém substrátu.

Během inkubace vzorků s reakční směsí oxiduje cholesteroxidasa FC. Vznikající peroxid vodíku reaguje s cholesterolovou sondou. Tato vazba je detekovatelná kolorimetricky ( $\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$ ), nebo fluorometricky (excitace/emise  $\sim 535/587 \text{ nm}$ ). Koncentrace TC je stanovena, je-li ke vzorku navíc přidána cholesterolesteraasa, která štěpí CE na cholesterol a mastné kyseliny. Koncentrace CE je vypočtena jako rozdíl hodnot TC a FC.

#### PRACOVNÍ POSTUP:

Pufry a sonda byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Lyofilizovaná cholesterolesteraasa a mix enzymů byly dle pokynů výrobce rozpuštěny v 220  $\mu\text{l}$  pufru.

#### *Příprava standardů*

Přidáním 20  $\mu\text{l}$  standardního roztoku cholesterolu k 140  $\mu\text{l}$  pufru byl získán roztok o koncentraci 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Ten byl v dubletu pipetován na 96jamkovou destičku po 0, 4, 8, 12, 16 a 20  $\mu\text{l}$ . Posloupná řada standardů o koncentraci 0 až 5  $\mu\text{g}$  na jamku byla získána doplněním pufru do celkového objemu 50  $\mu\text{l}$ .

### *Příprava vzorků*

#### Sérum a částice VLDL

Vzorky sér a VLDL byly rozmraženy v lázni voda-led, kde byly uchovávány po celou dobu manipulace. Před ředěním (Tab. 4) byly všechny vzorky vortexovány.

Tab. 4: Stanovení celkového a volného cholesterolu – příprava vzorků.

Vzorky	Ředění	CELKOVÝ CHOLESTEROL		VOLNÝ CHOLESTEROL	
		Objem vzorku [μl]	Objem pufru [μl]	Objem vzorku [μl]	Objem pufru [μl]
<b>SÉRUM</b>					
P_chol	10x	10	40	50	0
P_ctrl	5x	10	40	50	0
W_chol	5x	10	40	50	0
W_ctrl	5x	10	40	50	0
<b>VLDL</b>					
P_chol	5x	10	40	50	0
P_ctrl	-	20	30	40	10
W_chol	2,5x	10	40	40	10
W_ctrl	-	20	30	40	10
<b>JÁTRA</b>					
P_chol	-	10	40	30	20
P_ctrl	-	30	20	30	20
W_chol	-	10	40	30	20
W_ctrl	-	30	20	30	20

#### Extrakce lipidů z jater

Ze zmraženého vzorku jater bylo odebráno cca 50 mg (max. 70 mg) tkáně, ke které bylo přidáno [20 × hmotnost jaterního vzorku] μl směsi chloroform : isopropanol : NP-40 (7 : 11 : 0,1). Játra byla homogenizována elektrickým homogenizátorem (mezi jednotlivými vzorky byl homogenizátor čištěn 2x v kohoutkové vodě, 1x v ethanolu a 2x v destilované vodě) a poté centrifugována (15 000 g, 10 min). Ze všech vzorků bylo přeneseno 800 μl organické fáze do skleněných zkumavek, které byly následně vloženy do vodní lázně (50 °C). Pod dusíkem zde byla odpařována organická

rozpouštědla (30 až 50 min), dokud nebyly zkumavky zcela suché. Extrahované lipidy byly za vortexování rozpuštěny v 800  $\mu$ l pufru.

Pipetované objemy vzorků extrahovaných lipidů z jater jsou v tabulce 4. LL IKEM ve vzorcích stanovila koncentraci TC. Zbylý materiál byl uložen do -20 °C.

#### *Příprava reakční směsi*

Reakční směs byla připravena dle tabulky 5.

Tab. 5: Stanovení TC a FC – příprava reakční směsi.

	<b>CELKOVÝ CHOLESTEROL</b>	<b>VOLNÝ CHOLESTEROL</b>
Složka	Objem [ $\mu$ l]/jamka	Objem [ $\mu$ l]/jamka
Pufr	44	46
Cholesterolová sonda	2	2
Mix enzymů	2	2
Cholesterolesterasa	2	0

#### *Měření absorbance*

Každá jamka obsahovala 50  $\mu$ l vzorku, nebo standardu a 50  $\mu$ l reakční směsi. Po 60min inkubaci destičky v temnu při 37 °C byla na kombinovaném destičkovém readeru Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., Gen5<sup>TM</sup>, USA) detekována absorbance při vlnové délce 570 nm. Koncentrace cholesterolu byla odečtena ze standardní křivky.

Koncentrace TC, FC v séru a VLDL-C byla stanovována v singletu, koncentrace FC ve VLDL a játrech byla stanovována v dubletu.

### **4.3.3 Měření exprese genů**

K měření exprese genů byla použita dvoukroková kvantitativní polymerázová řetězová reakce.

V prvním kroku byla pomocí reverzní transkriptasy převedena izolovaná RNA na kódující DNA (cDNA). V kroku druhém pak byly pomocí specifických primerů amplifikovány sekvence cílových genů.

#### PRINCIP METODY:

Amplifikace cílové sekvence DNA je dosaženo pomocí rychlého střídání inkubačních teplot (95 °C a 50 – 60 °C; 25 – 40 cyklů). Při 95 °C je rozplétána dvouřetězcová DNA, s kterou interagují na základě komplementarity primery (50 – 60 °C). Vlákno je poté prodlužováno DNA-polymerasou. Při amplifikaci je zároveň uvolňována fluorescenční sonda značená barvou FAM (excitace/emise ~ 494/518 nm). V každém cyklu je toto vyzářené světlo detekováno a jeho množství odpovídá expresi daného genu.

#### PRACOVNÍ POSTUP:

##### *Izolace RNA z jater*

RNA byla izolována z již homogenizovaných 50mg vzorků jater odebraných ze stejného jaterního laloku ihned po usmrcení zvířete (viz Schéma pokusu).

Homogenáty byly rozmrazeny v lázni voda-led a doplněny TRIzol<sup>®</sup> na přibližně stejný objem. Do každého vzorku bylo přidáno 0,2 ml chloroformu (~ 1/5 objemu TRIzolu<sup>®</sup>). Vzorky byly cca 15 s důkladně míchány převrácením v ruce. Poté byly ponechány 5 min při pokojové teplotě a následně byly centrifugovány (12 000 g, 15 min, 4 °C). Horní vodná fáze (cca 600 µl) byla opatrně přenesena do nové zkumavky, kam bylo přidáno 0,5 ml isopropanolu. Vzniklý roztok byl řádně promíchán, nechán 10 min při pokojové teplotě a následně centrifugován (12 000 g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl odsán a k peletě byl přidán 1 ml 75% ethanolu. Intenzivním mícháním zkumavek byla od její stěny uvolněna peleta. Vzorky byly opět centrifugovány (8 000 g, 5 min, 4 °C), supernatant byl odsán a k peletě byl znovu přidán 1 ml 75% ethanolu. Promývání ethanolem bylo 2krát opakováno.

Po posledním odsání ethanolu byly vzorky zhruba 1 hodinu sušeny v laminárním boxu v otevřené zkumavce, zakryté pouze buničinou. Poté byla peleta rozpuštěna v 50 µl superčisté vody. Spektrofotometricky byla změřena koncentrace a čistota RNA. Vzhledem k vysoké koncentraci byly vzorky ředěny (přidáním 200 – 600 µl) na koncentraci v rozmezí 500 – 1 000 ng/µl.

Úspěšnost izolace a stabilita RNA byla po zahřátí přibližně 1 µg RNA na teplotu 70 °C po dobu 2 min zkontrolována na 1,5% agarosovém gelu (120 mV, 20 min). Na gelu byly u všech vzorků pozorovatelné 2 ribosomální podjednotky. Zkumavky s izolovanou RNA byly uloženy do -20 °C.

## Reverzní transkripce

Tab. 6: Reverzní transkripce

– příprava vzorků.

Složka	Množství
RNA	3 µg
Náhodné hexamerní primery	1 µl
Oligo dT primery	1 µl
<b>Celkový objem - doplňen vodou</b>	<b>12 µl</b>

Tab. 7: Reverzní transkripce

– příprava reakční směsi.

Složka	Objem [µl]/jamku
5x Koncentrovaný reakční pufr	4
Inhibitory RNas	1
10 mM mix dNTP	2
<b>Celkový objem</b>	<b>7</b>

Vzorky byly připraveny dle rozpisu v Tab. 6 a inkubovány 5 min při 70 °C. Následně byla směs chlazená na ledu (více jak 1 min). Během inkubace byla připravena reakční směs (Tab. 7).

Po přidání reakční směsi byly vzorky promíchány a nechány 2 až 5 min při pokojové teplotě. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,8 µl reverzní transkriptasy. Promíchané vzorky byly inkubovány nejprve 10 min při laboratorní teplotě, poté 60 min při 42 °C a 15 min při 70 °C. Vzápětí byly vzorky chlazeny na ledu (déle jak 2 min). Ke každému vzorku bylo pipetováno 0,8 µl RNasy H. Zkumavky byly inkubovány nejprve 20 min při 37 °C a poté 10 min při 65 °C.

Vzniklá směs byla přečištěna pomocí soupravy pro purifikaci produktů PCR<sup>5</sup> (QIAGEN®, Německo). Vzorky byly přeneseny do kolonek s membránou. Ke každému vzorku bylo pipetováno [5 × množství vzorku] µl vazebného pufru. Vzorky byly centrifugovány (14 000 g, 1 min). Do kolonky s navázanou cDNA bylo pipetováno 750 µl promývacího pufru a poté za sebou proběhly dvě centrifugace (9 000 g, 1 min a 14 000 g, 2 min). Kolonka byla přenesena do čisté zkumavky a promývána nejprve 20 µl (centrifugace 14 000 g, 1 min) a poté 10 µl vody. Na závěr byly vzorky opět centrifugovány (14 000 g, 2 min).

---

<sup>5</sup> PCR – polymerázová řetězová reakce

### Kvantifikace exprese genů *Apof*, *Cyp7a1*, *Mttp*, *Soat1* a *Soat2*

Vzorky byly připraveny dle rozpisu v Tab. 8. Destička se vzorky byla přelepena fólií, lehce promíchána a krátce stočena v centrifuze Z300K (1 000 g, 1 min). U každého vzorku jater (2x 50 mg od 1 zvířete) byla v duplikátech měřena exprese genů *Apof*, *Cyp7a1*, *Mttp*, *Soat1* a *Soat2*.

Tab. 8: Měření exprese genů – příprava vzorků.

Složka	Množství
cDNA	20 ng
Reakční směs	10 $\mu$ l
Směs primerů a fluorescenční sondy	1 $\mu$ l
<b>Celkový objem – doplněn vodou</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Cílená amplifikace templátů cDNA byla provedena na stroji LightCycler<sup>®</sup> 96. Vzorky byly inkubovány nejprve 10 min při 95 °C, poté se 40krát vystřídal cyklus inkubace 15 s při 95 °C a 1 min při 60 °C. Na závěr byla destička se vzorky ochlazena na 37 °C.

Pro stanovení exprese genů byla použita relativní kvantifikace, jako referenční gen byl zvolen *Vars2l*, který vyšel v předchozích měřeních jako nejméně odlišný jak v rámci diet, tak mezi oběma kmeny potkanů (Vlachová *et al.*, 2013). Jako kontrola, mezi jednotlivými měřeními destičkami, sloužil vždy stejný vzorek cDNA s fluorescenční sondou pro gen *Vars2l*. Slepé vzorky (1 – 5) obsahovaly 9  $\mu$ l vody, 10  $\mu$ l reakční směsi a 1  $\mu$ l směsi primerů s fluorescenční sondou pro každý gen zvlášť. Účinnost amplifikace pro každý gen byla vypočtena ze standardní křivky postupné ředicí řady se 100, 10, 1, 0,1 a 0,01 ng cDNA (Tab. 9).

Tab. 9: Měření exprese genů – účinnost amplifikace.

Složka	Objem [ $\mu$ l]
Reakční směs	10
cDNA (0,01 – 100 ng)	2
Směs primerů a fluorescenční sondy	1
Voda	7
<b>Celkový objem</b>	<b>20</b>

Expres genů byla vypočítána dle Pfaffla (Pfaffl, 2001).

Výpočet účinnosti amplifikace ( $E$ ):

$$E = \left(10 - \frac{1}{k}\right) - 1$$

Vysvětlivky:  $E$  – účinnost amplifikace,  $k$  – směrnice přímky.

Výpočet exprese genu s korekcí účinnosti podle Pfaffla:

$$\text{genová exprese} = \frac{E_{tg}^{\Delta Ct_{tg} \text{ (kontrola-vzorek)}}}{E_{rfg}^{\Delta Ct_{rfg} \text{ (kontrola-vzorek)}}$$

Vysvětlivky:  $E_{tg}$  – účinnost amplifikace cílového genu,  $E_{rfg}$  – účinnost amplifikace referenčního genu,  $Ct_{tg}$  – počet cyklů, který byl nutný k dosažení prahu intenzity fluorescence pro cílový gen,  $Ct_{rfg}$  – počet cyklů, který byl nutný k dosažení prahu intenzity fluorescence pro referenční gen.

#### 4.3.4 Stanovení proteinu

Stanovení proteinu bylo provedeno ve vzorcích určených pro měření aktivity ACAT a MTP.

##### PRINCIP METODY:

Komerční souprava pro stanovení celkového proteinu od společnosti Pierce Biotechnology (USA) je vysoce sensitivní (20 – 2 000  $\mu\text{g/ml}$ ) kolorimetrická metoda detekující měďné ionty ( $\text{Cu}^{1+}$ ), které vznikají redukcí iontů měďnatých reagujících v alkalickém prostředí s peptidovými vazbami.  $\text{Cu}^{1+}$  ionty vážou dvě molekuly kyseliny bicinchoninové (BCA) a vzniká tak fialové zbarvení. Tento komplex vykazuje vysokou absorpenci při vlnové délce 562 nm a lineárně odpovídá na rostoucí množství proteinu v roztoku. Koncentrace proteinu je odečtena ze standardní křivky.

##### PRACOVNÍ POSTUP:

###### *Příprava standardů a reakční směsi*

Ze standardního roztoku albuminu (2 mg/ml) byly připraveny standardy ST0 – ST8 o koncentraci 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1 000, 1 500, a 2 000  $\mu\text{g/ml}$ .

Reakční směs byla připravena smícháním reagensů A a B v poměru 50:1.

### *Stanovení proteinu*

Do 96jamkové destičky bylo pipetováno 25  $\mu$ l standardů, nebo 10  $\mu$ l vzorků s 15  $\mu$ l pufru (pro výpočet byl poté použit faktor ředění:  $f = 2,5$ ). Do každé jamky bylo přidáno 200  $\mu$ l reakční směsi. Destička byla promíchána a ve tmě inkubována 30 minut při 37 °C. Absorbance byla měřena při vlnové délce 562 nm na kombinovaném destičkovém readeru Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., Gen5<sup>TM</sup>, USA).

### **4.3.5 Stanovení aktivity ACAT**

#### PRINCIP METODY:

Enzym ACAT přenáší zbytky mastných kyselin na cholesterol za vzniku cholesterylesterů. Během inkubace mikrosomální frakce, která obsahuje protein ACAT, s radioaktivně značeným <sup>14</sup>C-OleoylCoA a volným cholesterolem vzniká cholesteryloleát. Ten je od ostatních lipidů oddělen tenkovrstvou chromatografií (TLC) a poté je stanovena jeho radioaktivita (Temel *et al.*, 2003; Temel *et al.*, 2007).

#### PRACOVNÍ POSTUP:

##### *Příprava reagensů*

- Homogenizační pufr, pH 7,4

0,1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71 g
0,25M sacharosa	42,78 g
1mM EDTA	0,19 g

Rozpustit v 400 ml destilované vody, pomocí 6M HCl, příp. 30% KOH upravit pH na 7,4 a doplnit destilovanou vodou do 500 ml.

- Reakční pufr, pH 7,4

0,1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,42 g
--------------------------------------	---------

Rozpustit v 800 ml destilované vody, pomocí 6M HCl, či 30% KOH upravit pH na 7,4 a doplnit destilovanou vodou do 1 l.

- Nasycený roztok cholesterolu v hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextranu, 45% w/v

Hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextran	2,250 g
Cholesterol	0,008 g

Do 10ml kádinky bylo naváženo 2,25 g hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextranu. Po kapkách byly přidávány 3 ml vody a směs byla opatrně promíchávána tyčinkou.

Ještě než se cyklodextran úplně rozpustil, bylo k němu přidáno magnetické míchadlo. Objem roztoku byl doplněn vodou na 5 ml.

Směs nesmí být během míchání zahřívána!

Na analytických vahách bylo do skleněné zkumavky se šroubovacím uzávěrem naváženo 8 mg cholesterolu vytemperovaného na laboratorní teplotu.

K cholesterolu byl přidán připravený roztok hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextranu. Roztok byl vortexován a umístěn do vodní lázně (60 °C), přičemž každých 30 min byla směs vortexována, dokud se cholesterol zcela nerozpustil (cca 20 h – přes noc necháno ve třepačce).

Rozpuštěný cholesterol byl ochlazen na laboratorní teplotu a pomocí 10ml stříkačky přefiltrován přes 0,2 $\mu$ m filtr.

Výsledná koncentrace cholesterolu byla stanovena LL IKEM.

- 5% BSA (50  $\mu$ g/ $\mu$ l)

BSA 2,5 g

Rozpustit v 50 ml destilované vody.

- 0,88% KCl

KCl 4,4 g

Rozpustit v 500 ml destilované vody.

- Neznačený cholesteryleát v chloroformu, 0,5 mg/ml

Cholesteryleát 0,025 g

Rozpustit v 50 ml chloroformu.

- Mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii

Hexan 70 ml

Diethylether 30 ml

Ledově studená kyselina octová 1 ml

### *Izolace mikrosomů*

Vzorek jater (~ 1 g) byl zvážen na analytických vahách, rozstříhán nejprve nůžkami a poté homogenizován ve skleněném nebo nožovém homogenizátoru ve 2 ml ledově studeného homogenizačního pufru. Homogenát byl převeden do zkumavky s 2 ml homogenizačního pufru a centrifugován (12 000 g, 15 min, 4 °C). Supernatant

byl centrifugován ve zkumavkách určených pro mikroultracentrifugaci (100 000 g, 60 min, 4 °C). Mikrosomální peletka byla rozpuštěna nejprve v malém množství (0,5 ml) reakčního pufru a poté doplněna na celkový objem 3 ml. Ve vzorcích byl stanoven protein pomocí komerční soupravy (Pierce Biotechnology, USA).

Izolované mikrosomy byly zmraženy v tekutém dusíku a poté uskladněny v -80 °C.

Játra i všechny vznikající produkty byly po dobu manipulace, včetně homogenizace, drženy na ledu.

#### *Stanovení aktivity ACAT*

Standardní test je prováděn v konečném objemu 300 µl a obsahuje:

- 100 µg proteinu (mikrosomální frakce),
- 50 nmol cholesterolu v hydroxypropyl-β-cyklodextranu,
- 1 mg hovězího sérového albuminu,
- 30 nmol <sup>14</sup>C-OleoylCoA.

Tab. 10: Stanovení aktivity ACAT – příprava reakční směsi.

<b>Složka</b>	<b>Množství/jamka</b>
5% BSA	20 µl
Cholesterol v hydroxypropyl-β-cyklodextranu (4,41 mmol/l)	11 µl
Mikrosomální frakce	100 µg proteinu
<b>Celkový objem - doplněn reakčním pufrem</b>	<b>280 µl</b>

Reakční směs byla pipetována dle rozpisu (Tab. 10) do zkumavek se šroubovacím uzávěrem. Zkumavky byly řádně vortexovány a preinkubovány 30 min při 37 °C v třepací vodní lázni.

Během preinkubace byla připravena směs chloroform : methanol v poměru 2:1 a slepý vzorek A s 300 µl reakčního pufru (bez <sup>14</sup>C-OleoylCoA!). Připravený slepý vzorek B neobsahoval protein, ale <sup>14</sup>C-OleoylCoA ano.

Po ukončení 30min preinkubace byla zahájena reakce přidáním 20 µl <sup>14</sup>C-OleoylCoA. Směs byla vortexována a umístěna zpět do vodní lázně. Každý vzorek byl inkubován 20 min.

Reakce byla zastavena přidáním 6 ml směsi chloroform : methanol. Zkumavky byly uzavřeny a okamžitě vortexovány. Vzorky byly ponechány 1,5 - 2 h při laboratorní teplotě.

Do každé zkumavky bylo pipetováno 1,2 ml 0,88% KCl. Směs byla vortexována a potom ponechána v klidu, dokud se fáze od sebe neoddělily. Zkumavky byly centrifugovány ve výkyvném rotoru (1 697 g, 10 min, 25 °C). Na zkumavce se slepým vzorkem A bylo označeno místo rozhraní a byl zaznamenán objem dolní fáze.

Druhý den byla čerstvě připravená mobilní fáze pro TLC nalita do chromatografické vany, kde byla ponechána stát alespoň 60 min, aby došlo k nasycení prostoru vany jejími parami. Zároveň byla připravena druhá chromatografická vana s krystaly jódu. Chromatografické desky byly aktivovány zahřátím v peci na 100 °C po dobu 60 min.

Po odstranění horní vodné fáze byly ze spodní organické fáze přeneseny přesně 3 ml do skleněné zkumavky bez uzávěru. Chloroform byl poté odpařen pod dusíkem na vodní lázni (60 °C). Stěny zkumavky byly dvakrát opláchnuty cca 500 µl chloroformu, aby byl veškerý cholesteryloleát skutečně na dně zkumavky. Chloroform byl znovu odpařen do sucha.

Ke každému vzorku bylo pak přidáno 100 µl chloroformu s nezačteným cholesteryloleátem. Zkumavkami bylo jemně zamícháno, aby se značený cholesterylester dobře rozpustil.

#### *Chromatografie na tenké vrstvě a detekce $\beta$ záření*

Vzorky rozpuštěné v chloroformu byly naneseny na start chromatografické desky, nechány uschnout a vloženy do chromatografické vany s mobilní fází na TLC. Mobilní fáze pro TLC vzlínala cca do 80 % chromatografické desky. Usušené chromatografické desky pak byly několik minut vystaveny parám jódu. Na deskách byly tužkou označeny vizualizované pruhy s cholesteryloleátem. Chromatografické desky byly přes noc ponechány v digestoři, aby mohl přebytečný jód sublimovat.

Další den byly opatrně vystříženy ohraničené oblasti obsahující cholesteryloleát a vloženy do příslušných scintilačních vialek radioaktivním materiálem nahoru. K vzorkům bylo opatrně přidáno 8 ml scintilační tekutiny.

Vzorky stály přes noc při laboratorní teplotě v řádně uzavřených vialkách. Další den bylo na beta counteru (PerkinElmer®) měřeno  $\beta$  záření po dobu 5 min. Na závěr práce bylo zkontrolováno pracoviště kontaminačním monitorem.

Výpočet aktivity enzymu:

$$[\text{nmol/mg/min}] = \frac{[\text{dpm}]}{60} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{m} \times \frac{1}{A_s} \times \frac{V_c}{V}$$

Vysvětlivky:  $A_s$  – specifická aktivita [Bq/nmol],  $m$  – množství proteinu ve vzorku [0,1 mg],  $t$  – čas inkubace [min],  $V_c$  – celkový objem spodní fáze slepého vzorku A [ml],  $V$  – odpařovaný objem spodní fáze [ml].

### 4.3.6 Stanovení aktivity MTP

#### PRINCIP METODY:

Komerční souprava společnosti Roar Biomedical, Inc. (USA) umožňuje sledování aktivity MTP v čase. Aktivita MTP odpovídá přírůstku intenzity fluorescence (excitace/emise ~ 465/535 nm), který je spojen s přenosem substrátu značeného fluorescenční sondou z donorových částic na částice akceptorové. (Na donorové částici je fluorescence substrátu zhášena.)

#### PRACOVNÍ POSTUP:

##### *Příprava standardů*

Do 5 zkumavek (T0 – T4) bylo pipetováno po 1 ml isopropanolu o stupni čistoty HPLC. Do zkumavky T5 byly pipetovány 2 ml isopropanolu téže čistoty a zároveň do ní bylo přidáno 5  $\mu$ l donorové částice. Směs byla důkladně vortexována a ředící řadou byly připraveny standardy o koncentraci 0,04, 0,08, 0,16, 0,325 a 0,65 nmol/ml, přičemž T0 obsahovala pouze čistý isopropanol. Na 96jamkovou destičku byly pipetovány standardy v objemu 200  $\mu$ l.

##### *Příprava reagensí*

- Homogenizační pufr, pH 7,4

150mM NaCl                    4,35 g

10mM Tris                      0,60 g

1mM EDTA                      0,19 g

0,5mM PMSF                    0,04 g

2 $\mu$ g/ml leupeptin              0,001 g

Rozpustit v 400 ml destilované vody, pomocí 6M HCl, či 10M NaOH upravit pH na 7,4 a doplnit destilovanou vodou do 500 ml.

- Reakční pufr, pH 7,4

150mM NaCl                    0,88 g

10mM Tris                     0,12 g

2mM EDTA                    0,07 g

Rozpustit v 80 ml destilované vody, pomocí 6M HCl, či 10M NaOH upravit pH na 7,4 a doplnit destilovanou vodou do 100 ml.

### *Příprava vzorků*

Vzorky jater o hmotnosti cca 1 g byly nejprve rozstříhány nůžkami a poté homogenizovány pomocí skleněného homogenizátoru ve 2 ml ledově studeného homogenizačního pufru. Homogenát byl převeden do zkumavky s 8 ml ledově studeného homogenizačního pufru a centrifugován (700 g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl přenesen do nových zkumavek a byla v něm změřena koncentrace proteinu pomocí komerční sady (Pierce Biotechnology, USA).

Po celou dobu manipulace, včetně homogenizace, byly vzorky drženy na ledu.

Vzorky byly připraveny v zatemněné místnosti smícháním 4  $\mu$ l donorové částice, 4  $\mu$ l akceptorové částice a supernatantu obsahujícího 100  $\mu$ g proteinu. Na celkový objem 200  $\mu$ l byly vzorky doplněny reakčním pufrem. Slepý vzorek obsahoval 4  $\mu$ l donorové částice, 4  $\mu$ l akceptorové částice a pufr v celkovém objemu 200  $\mu$ l.

Částečně purifikovaný lidský MTP byl použit jako pozitivní kontrola.

### *Měření fluorescence*

Fluorescence byla průběžně zaznamenávána v časech 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 a 360 min. Mezi jednotlivými měřeními byla destička inkubována v temnu při 37 °C. Fluorescence byla detekována v triplikátech na kombinovaném destičkovém readeru Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., Gen5<sup>TM</sup>, USA) při nastavení sensitivity na 50 a optické pozice Top510nm a za použití filtrů Ex 460/40 a Em 540/25.

### *Vyhodnocení*

Aktivita MTP byla vypočtena z počáteční rychlosti přenosu neutrálního lipidu mezi donorovou a akceptorovou částicí, která byla určena na základě grafické extrapolace rozdílů intenzity fluorescence k nulovému času (Macholán, 1979). Z kalibrační křivky nezhášeného fluorescenčně značeného substrátu pro MTP bylo zjištěno, že 100 pmol substrátu odpovídá intenzita fluorescence 16 400.

#### **4.4 Statistické zpracování dat**

##### *Statistické hodnocení stanovení lipidů, genové exprese a aktivity ACAT*

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly hodnoceny pomocí počítačového programu GraphPad InStat 3. U normálně rozdělených dat byla použita jednosměrná analýza rozptylu (ANOVA). Byly-li mezi skupinami zjištěny významné rozdíly, pak byla tato významnost hodnocena pomocí *post-hoc* t-testu s Bonferroniho korekcí. Pokud data nespĺňovala podmínku normálního rozdělení, byla provedena analýza pomocí Kruskal-Wallisova testu (tj. neparametrický analog ANOVA testu) s následnými neparametrickými *post-hoc* testy s Dunnovou korekcí.

##### *Statistické hodnocení stanovení aktivity MTP*

Rozdíly v aktivitě MTP byly hodnoceny dvěma způsoby. Statistickou analýzu rozdílů v průběhu aktivity MTP v čase provedla RNDr. Věra Lánská, CSc. pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu s opakovaným měřením v programu JMP® 10.0.0 SAS Institute Inc. Rozdíly mezi skupinami v aktivitě MTP vyjádřené množstvím přenesených pmol fluorescenčně značeného substrátu byly hodnoceny jednosměrnou analýzou rozptylu (GraphPad InStat 3).

Výsledky jsou prezentovány v podobě průměru skupiny  $\pm$  směrodatná odchylka.

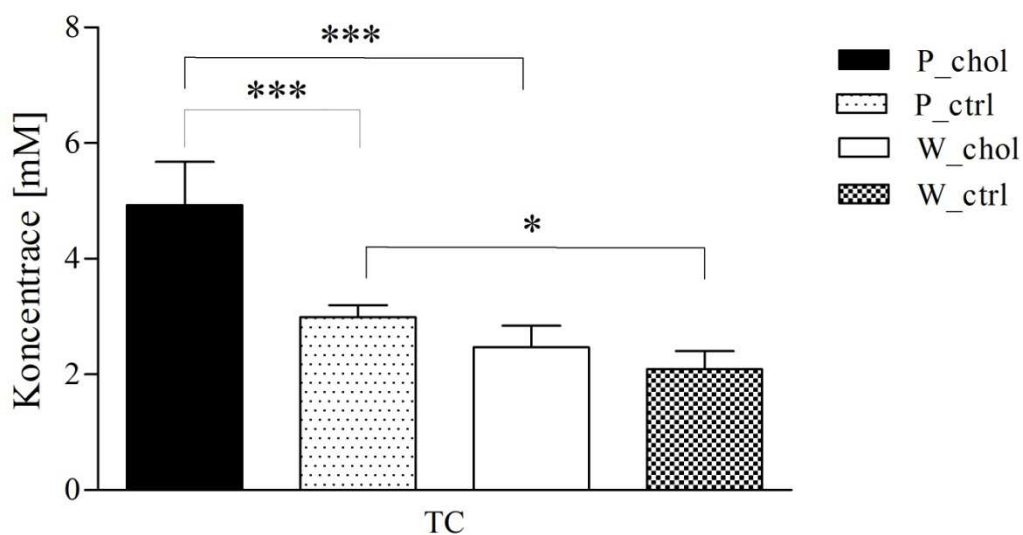
Rozdíly mezi daty jsou statisticky významné, pokud  $p < 0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení koncentrace celkového cholesterolu, volného cholesterolu, cholesterylesterů a triacylglycerolů

#### 5.1.1 Koncentrace lipidů v séru

Potkani kmene PHHC měli proti potkanům Wistar 1,4krát vyšší koncentraci TC v séru na kontrolní dietě ( $p < 0,05$ ) a dvakrát vyšší na dietě cholesterolové ( $p < 0,001$ ), (Obr. 9). Po podání 1% cholesterolové diety vzrostla u potkanů kmene PHHC cholesterolemie o 65 % ( $p < 0,001$ ), zatímco u potkanů kmene Wistar se významně nezměnila.

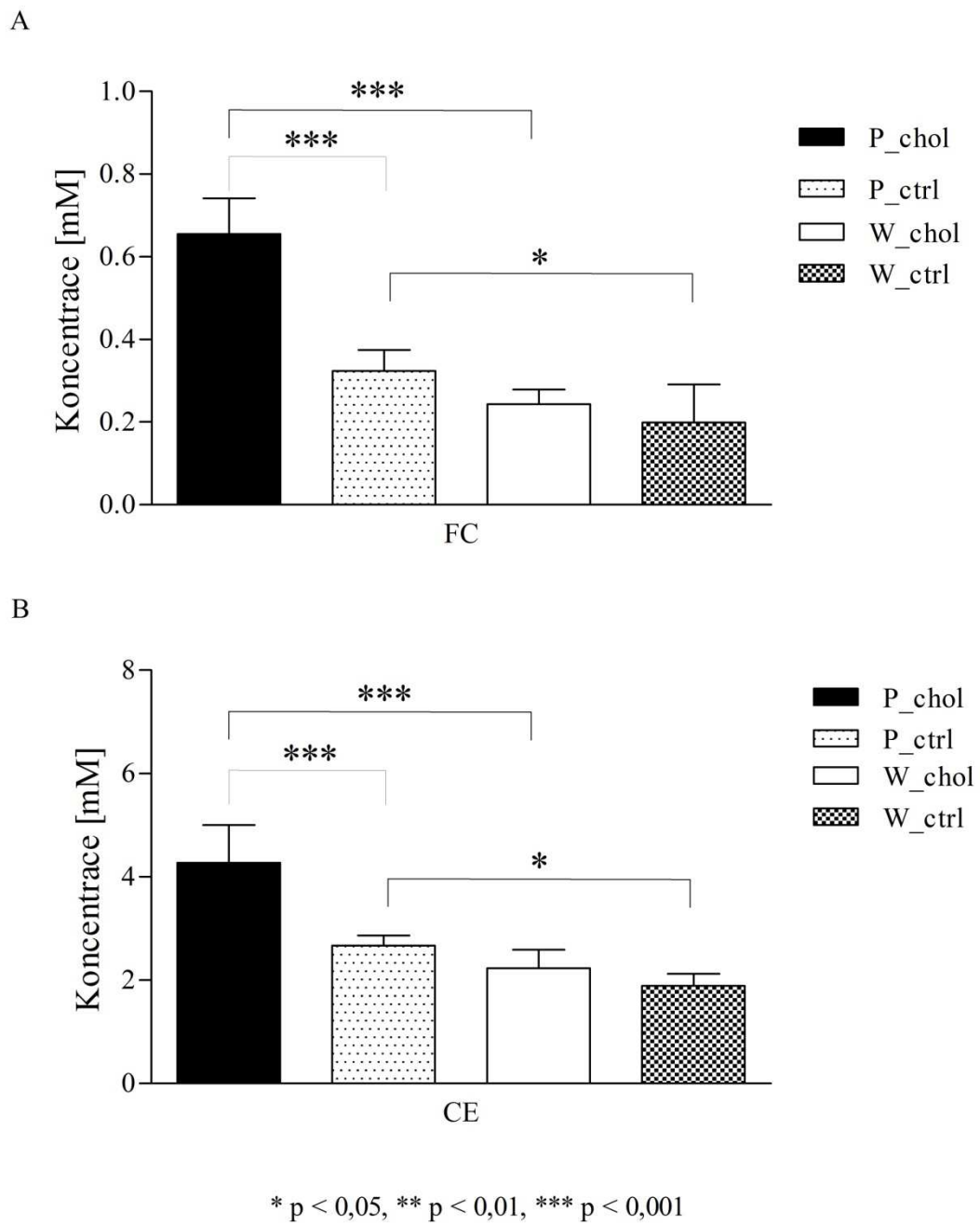


\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Obr. 9: Koncentrace TC v séru.

Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny pomocí ANOVA testu s příslušným post-hoc testem.

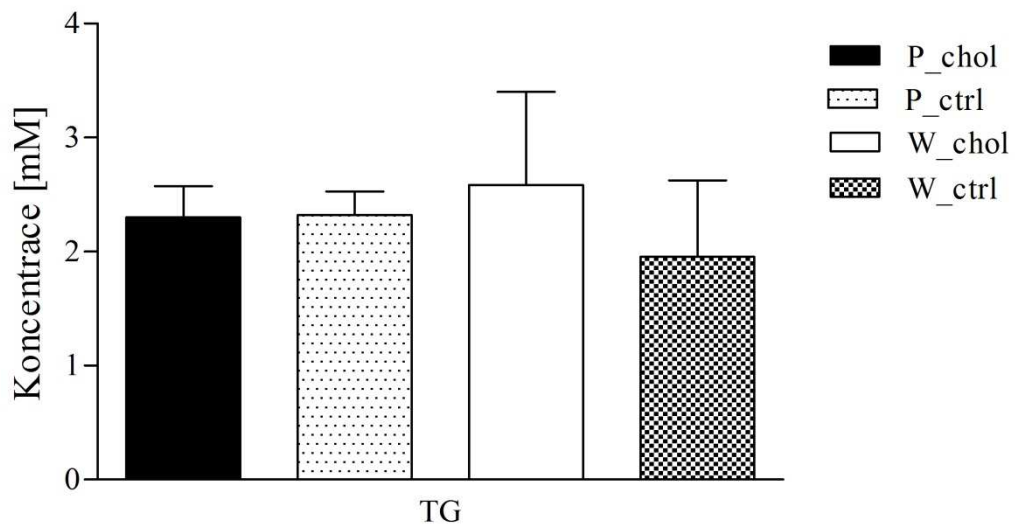
Za rozdíly v koncentraci cholesterolu mezi oběma kmeny jsou odpovědné rozdíly v koncentraci FC i CE (Obr. 10). Vzestup cholesterolémie u PHHC potkanů na cholesterolové dietě je rovněž způsoben nárůstem koncentrace FC i CE.



Obr. 10: Koncentrace FC (A) a CE (B) v séru.

A, B – Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny pomocí ANOVA testu s příslušným post-hoc testem.

Mezi pokusnými skupinami se sérová koncentrace TG statisticky významně nelišila (Obr. 11).



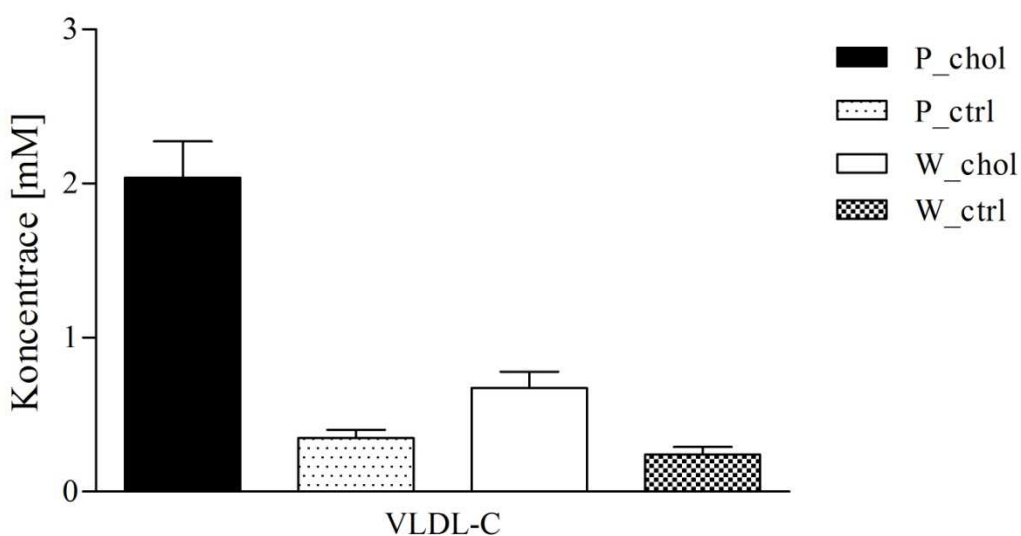
Obr. 11: Koncentrace TG v séru.

*Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem.*

### 5.1.2 Koncentrace lipidů ve VLDL

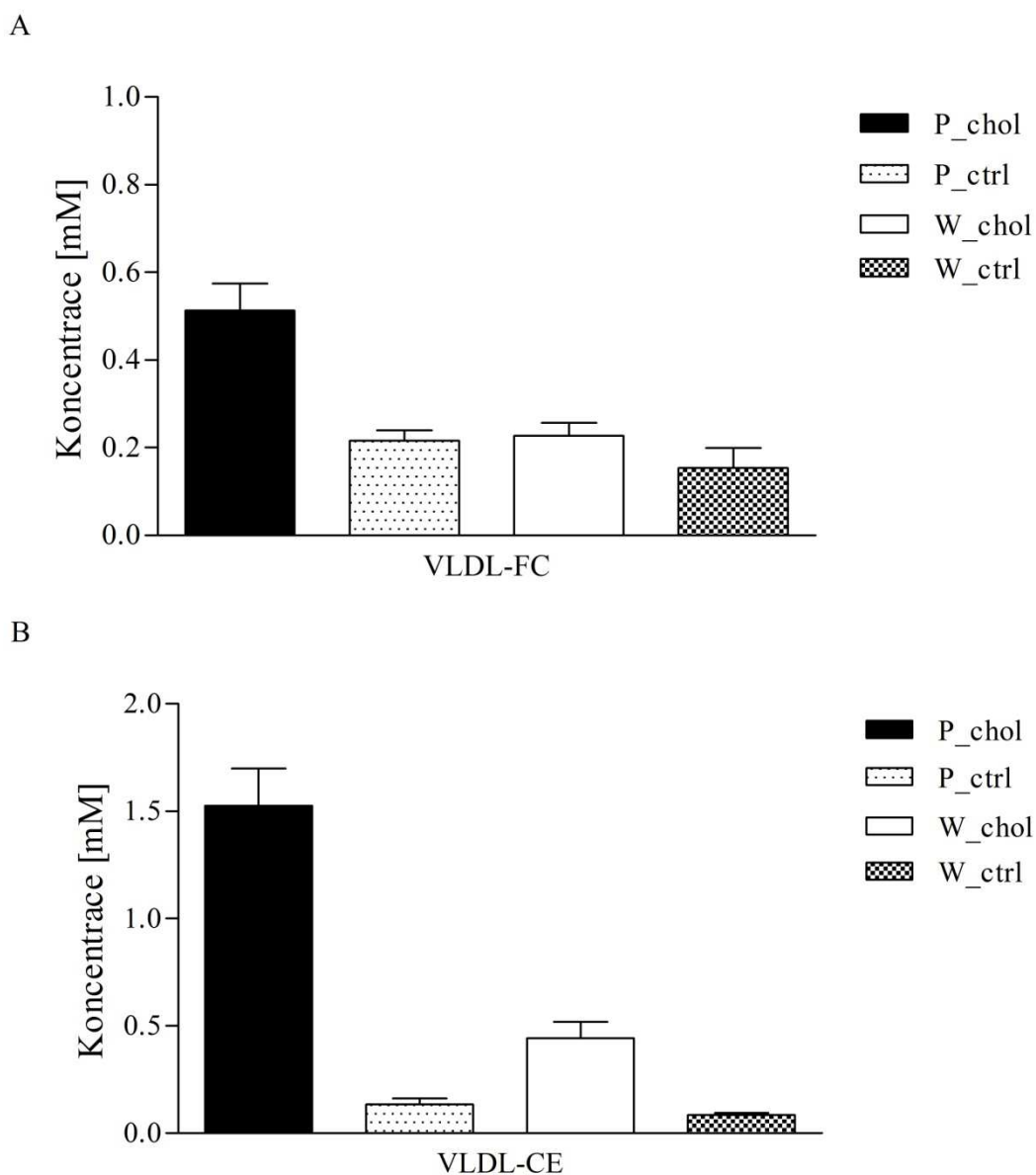
Mezi pokusnými skupinami byly zjištěny signifikantní rozdíly v koncentraci VLDL-C ( $p = 0,0151$ ), (Obr. 12), VLDL-FC ( $p = 0,0241$ ) a VLDL-CE ( $p = 0,0151$ ), (Obr. 13). Vzhledem k nízkému počtu vzorků ale nebylo možné provést *post-hoc* testy.

U obou kmenů dochází na cholesterolové dietě k vzestupu podílu VLDL na transportu cholesterolu v cirkulaci – PHHC potkani transportují ve VLDL přibližně 41 % celkového cholesterolu, zatímco potkani kmene Wistar 27 % TC (Obr. 9, 12).



Obr. 12: Koncentrace cholesterolu ve VLDL.

Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem. Vzhledem k nízkému počtu vzorků (v každé skupině 3 smíchané vzorky) nebyly rozdíly v lipidovém složení VLDL hodnoceny *post-hoc* testy.

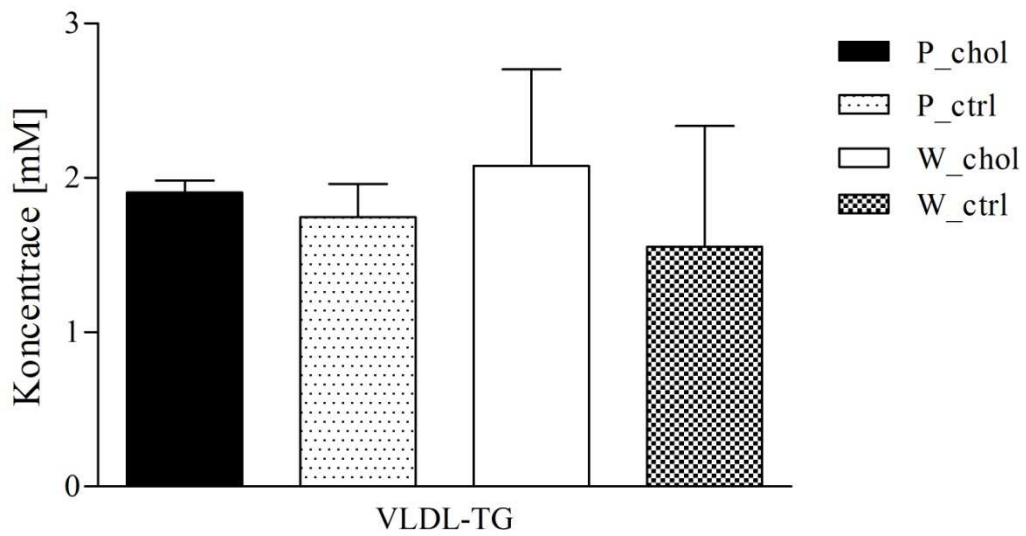


Obr. 13: Koncentrace FC (A) a CE (B) ve VLDL.

*A, B – Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem. Vzhledem k nízkému počtu vzorků (v každé skupině 3 smíchané vzorky) nebyly rozdíly v lipidovém složení VLDL hodnoceny post-hoc testy.*

Z obrázku 9 a 13 je patrné, že za nárůst koncentrace VLDL-C zvířat na cholesterolové dietě odpovídá vzestup koncentrace VLDL-CE. U PHHC potkanů se koncentrace VLDL-CE na cholesterolové dietě zvýšila 11,7krát, zatímco u potkanů Wistar jen 5,2krát. Tomu odpovídá i změna poměru VLDL-CE/VLDL-FC (Obr. 15B).

Koncentrace TG ve VLDL se mezi skupinami nelišila (Obr. 14).

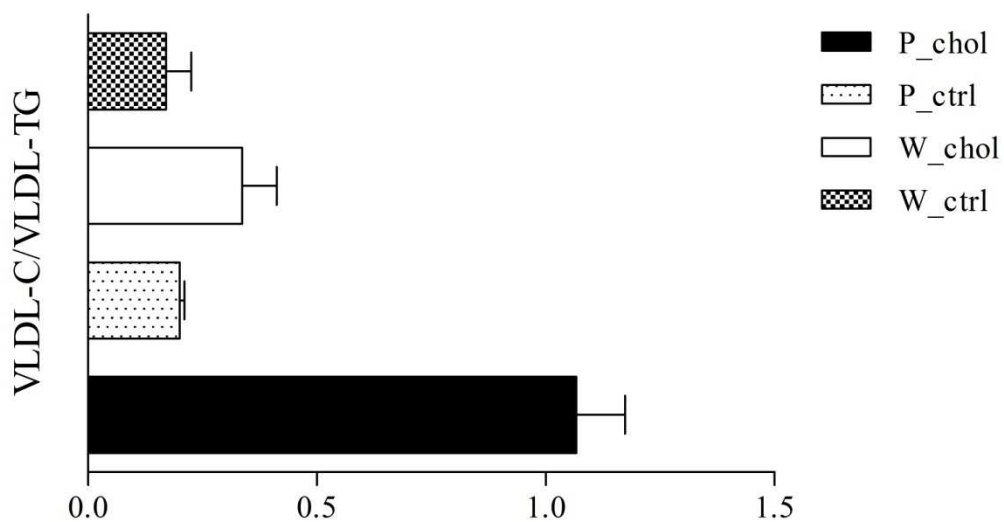


Obr. 14: Koncentrace TG ve VLDL.

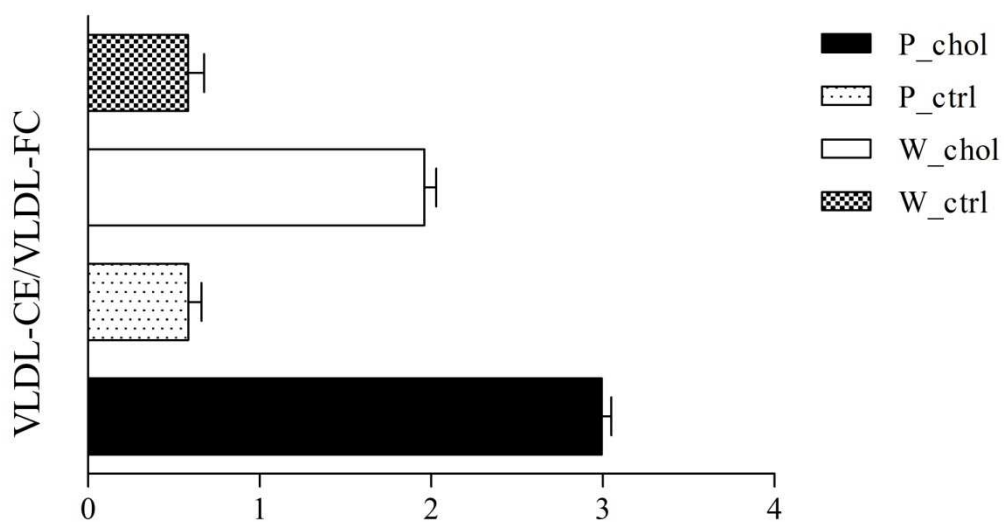
*Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem. Vzhledem k nízkému počtu vzorků (v každé skupině 3 smíchané vzorky) nebyly rozdíly v lipidovém složení VLDL hodnoceny post-hoc testy.*

Poměr VLDL-C/VLDL-TG byl u obou linií potkana na kontrolní dietě výrazně nižší než u člověka (cca 0,2 vs. 0,45). Na cholesterolové dietě tento poměr vzrostl u potkanů Wistar na 0,3 a u PHHC dokonce na 1,1 (Obr.15A).

A



B

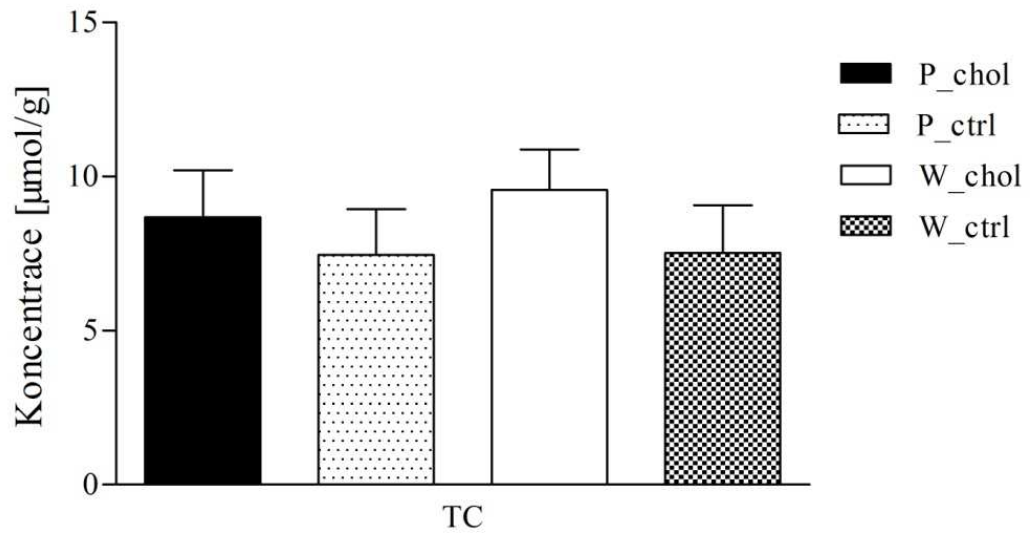


Obr. 15: Poměr VLDL-C/VLDL-TG (A) a VLDL-CE/VLDL-FC (B).

*A, B – Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem. Vzhledem k nízkému počtu vzorků (v každé skupině 3 smíchané vzorky) nebyly rozdíly v lipidovém složení VLDL hodnoceny post-hoc testy.*

### 5.1.3 Koncentrace lipidů v játrech

Koncentrace TC v játrech se v závislosti na dietě, ani kmeni významně neměnila (Obr. 16).

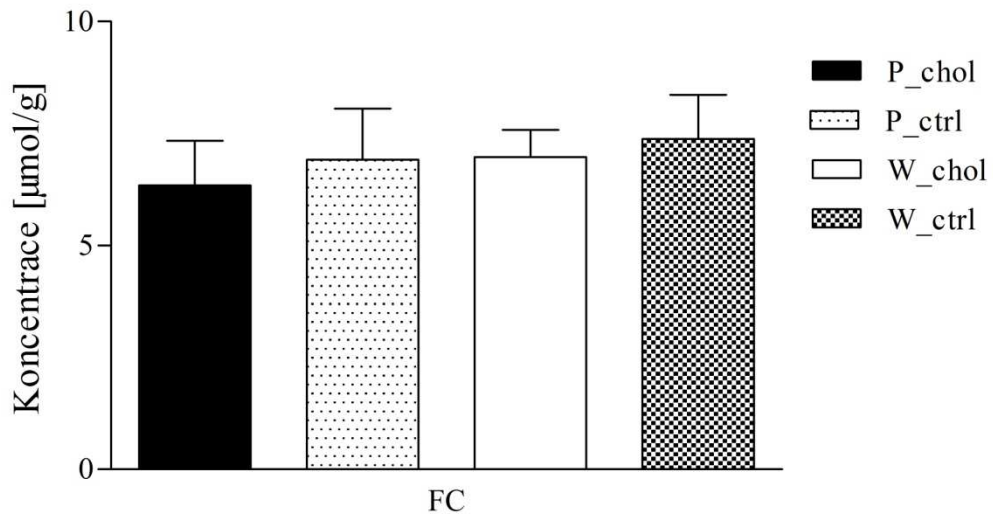


Obr. 16: Koncentrace TC v játrech.

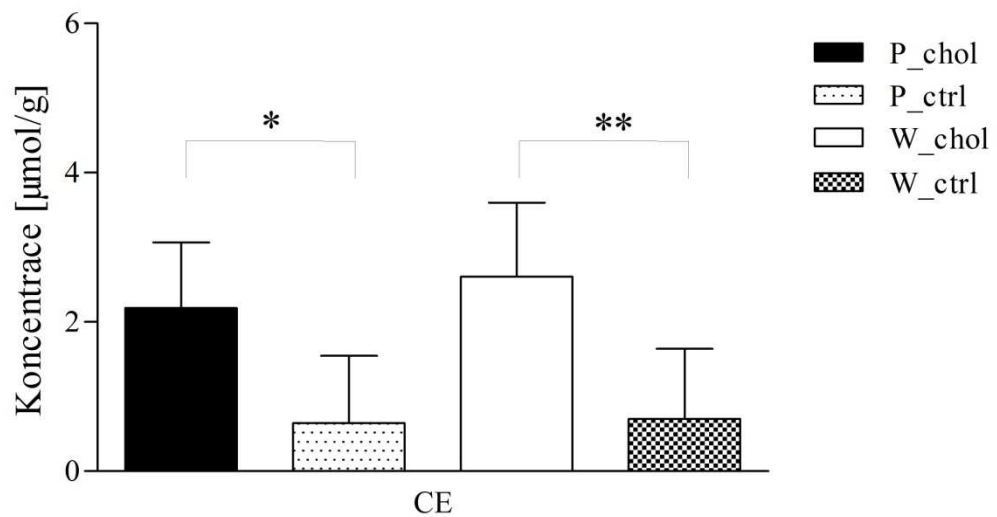
*Rozdíly mezi skupinami byly zjišťovány pomocí ANOVA testu.*

Koncentrace FC se mezi skupinami téměř nelišila (Obr. 17A). U obou kmenů však po podání cholesterolu významně vzrostla koncentrace CE. U kmene PHHC vzrostla 3,4krát ( $p < 0,05$ ) a u kmene Wistar 3,7krát ( $p < 0,01$ ), (Obr. 17B).

A



B



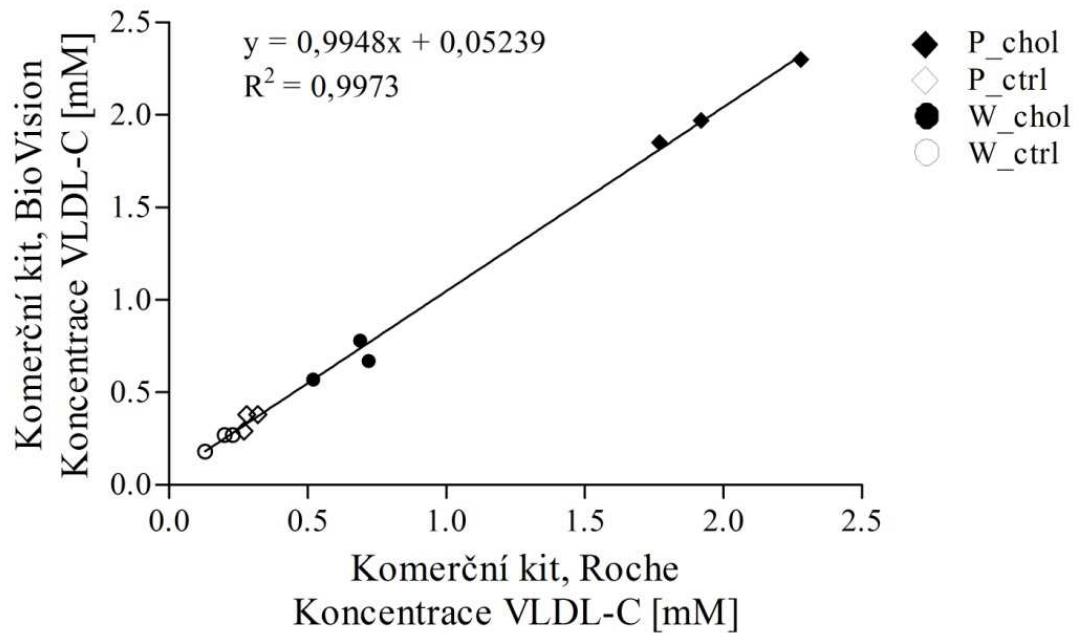
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Obr. 17: Koncentrace FC (A) a CE (B) v játrech.

A, B – Rozdíly v lipidovém složení jater byly zjišťovány pomocí ANOVA testu s příslušným post-hoc testem.

### 5.1.4 Porovnání dvou metod stanovení cholesterolu

Byla provedena korelace dvou metod stanovení cholesterolu – komerční soupravy společnosti BioVision (USA) a soupravy společnosti Roche (Německo), kterou pro stanovení TC využívá LL IKEM. Výsledky byly vysoce významně korelovány a nevykazovaly významné rozdíly (Obr. 18).



Obr. 18: Korelace testů stanovení koncentrace VLDL-C komerční soupravou společnosti BioVision (USA) a Lipidovou laboratoří IKEM (komerční souprava firmy Roche, Německo).

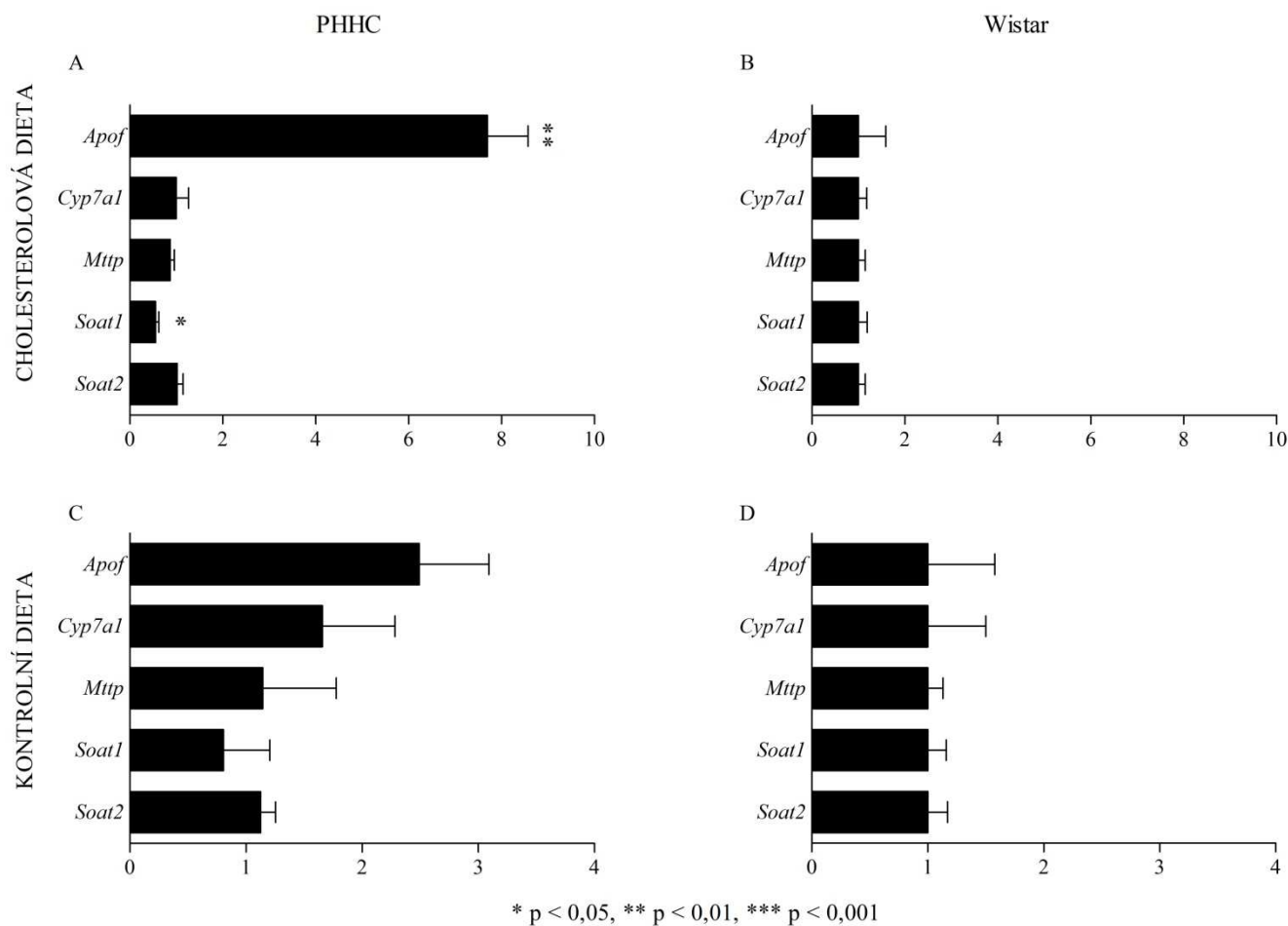
## ***5.2 Vliv diety a kmene na expresi vybraných genů a aktivitu proteinů podílejících se na syntéze VLDL***

### **5.2.1 Vliv diety a kmene na expresi vybraných genů**

Mezi oběma kmeny na kontrolní dietě nebyly v expresi vybraných genů zjištěny žádné statisticky významné rozdíly. Na cholesterolové dietě je u PHHC potkanů ve srovnání s potkany Wistar významně vyšší exprese genu *ApoE* a nižší exprese genu *Soat1* (Obr. 19).

Podávání cholesterolu vedlo u potkanů Wistar k 3násobnému zvýšení exprese *Cyp7a1*. Dvojnásobný vzestup exprese *Cyp7a1* u PHHC potkanů na cholesterolové dietě nedosáhl statistické významnosti. Exprese ostatních genů se na dietě statisticky významně nelišila (Obr. 20).

Vzhledem k tomu, že geny *Soat1* a *Soat2* kódují enzymy se stejnou katalytickou funkcí, byla porovnána jejich relativní exprese. Exprese *Soat2* v játrech je několikanásobně vyšší u obou kmenů (cca 4-5krát více u PHHC potkana, 3krát u potkana Wistar), (Obr. 21). Statisticky významný rozdíl je pouze u PHHC potkanů.



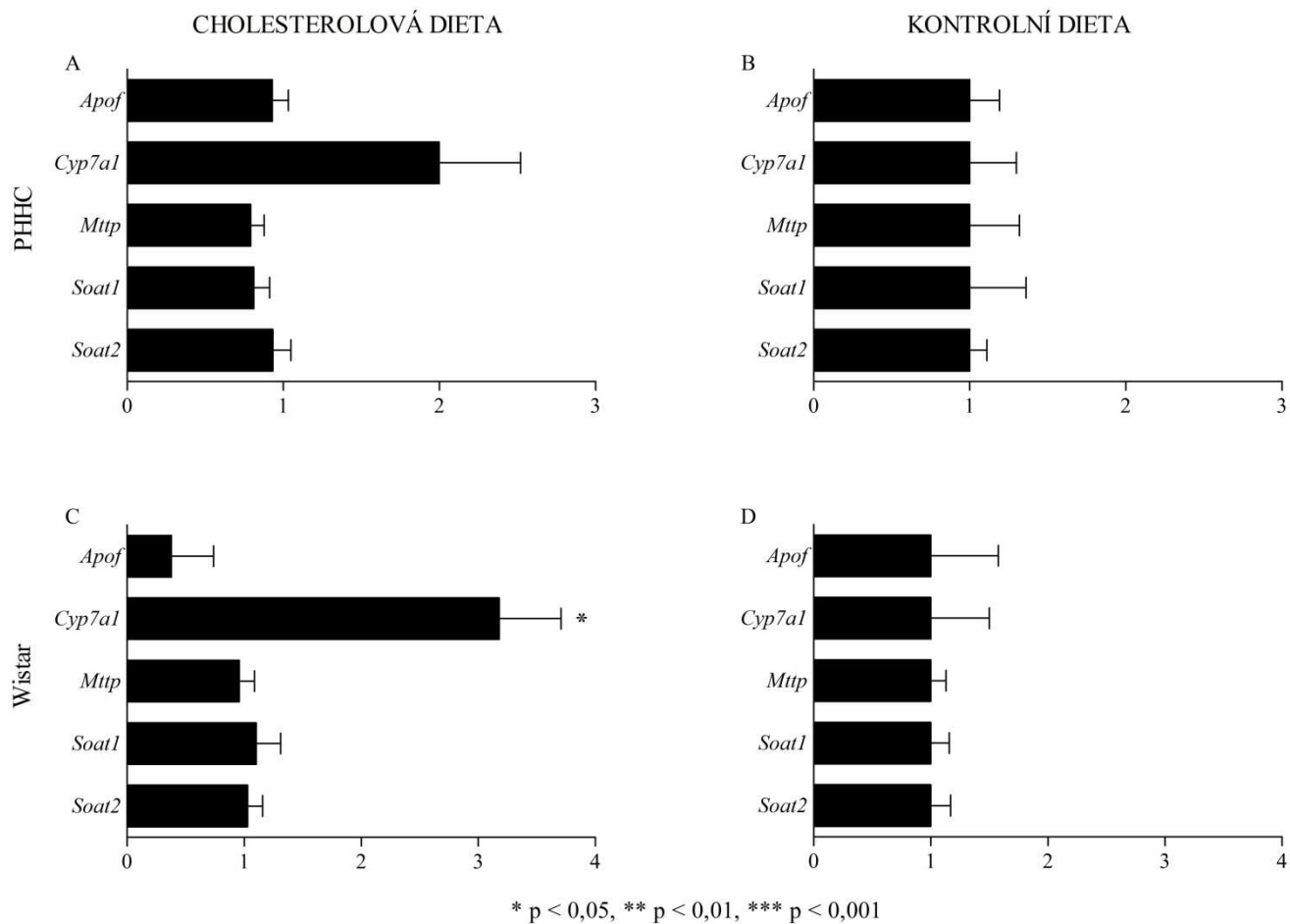
Obr. 19: Vliv kmene na expresi vybraných genů.

Expresie genů potkanů kmene PHHC vztažena k expresi genů potkanů kmene Wistar.

A, B – Obě linie na cholesterolové dietě (tzn. expresie genů u W\_chol rovna 1).

C, D – Obě linie na kontrolní dietě (tzn. expresie genů W\_ctrl rovna 1).

Rozdíly v expresi genů Apof, Cyp7a1, Mttp a Soat1 byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem s příslušným post-hoc testem.



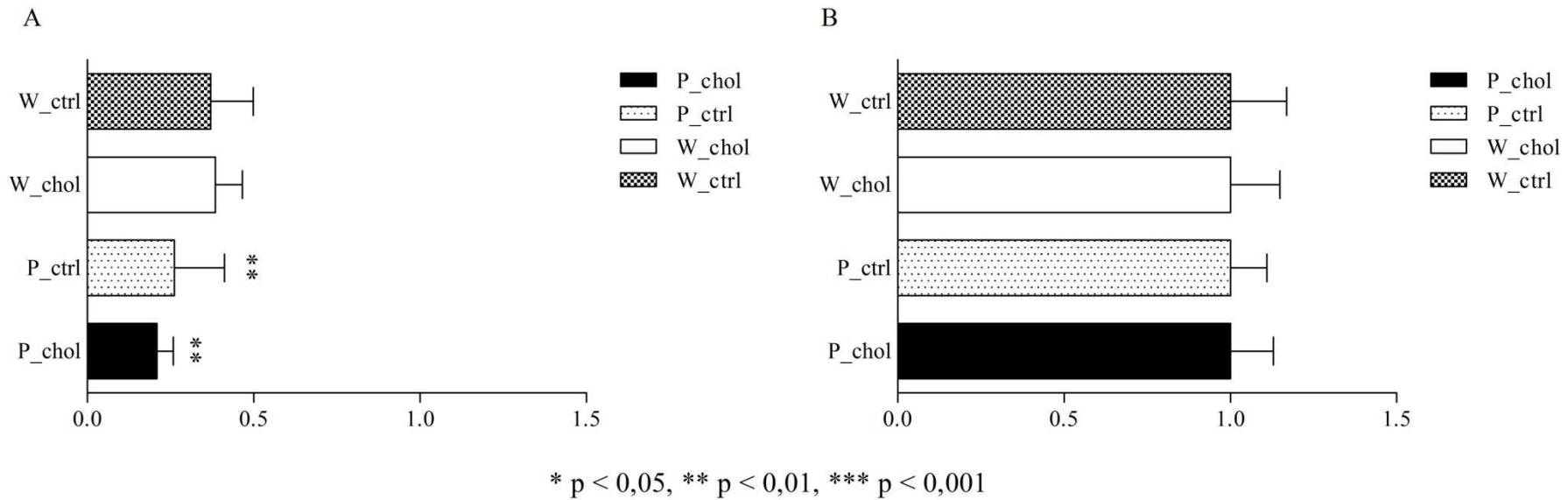
Obr. 20: Vliv diety na expresi vybraných genů.

Expresie genů potkanů na cholesterolové dietě vztažena k expresi genů potkanů na kontrolní dietě.

A, B – PHHC potkan (tzn. expresie genů u  $P_{ctrl}$  rovna 1).

C, D – Potkan Wistar (tzn. expresie genů  $W_{ctrl}$  rovna 1).

Rozdíly v expresi genů *Apof*, *Cyp7a1*, *Mttp* a *Soat1* byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem s příslušným post-hoc testem.

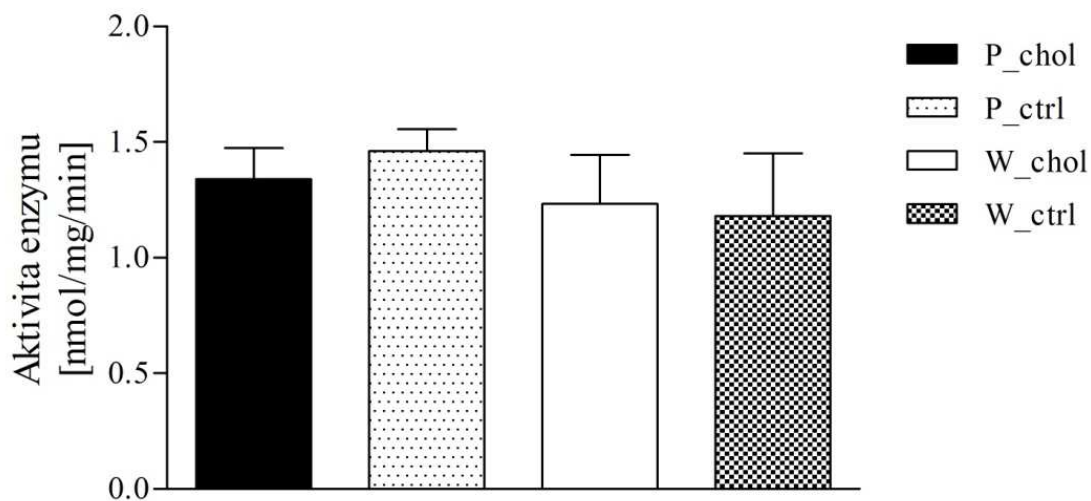


Obr. 21: Srovnání exprese genů *Soat1* a *Soat2* v játrech.

Expresa genu *Soat1* v grafu vztahena k expresi genu *Soat2* (tzn. expresi genu *Soat2* rovna 1). Rozdíly v expresi hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem s příslušným post-hoc testem.

### 5.2.2 Stanovení aktivity ACAT

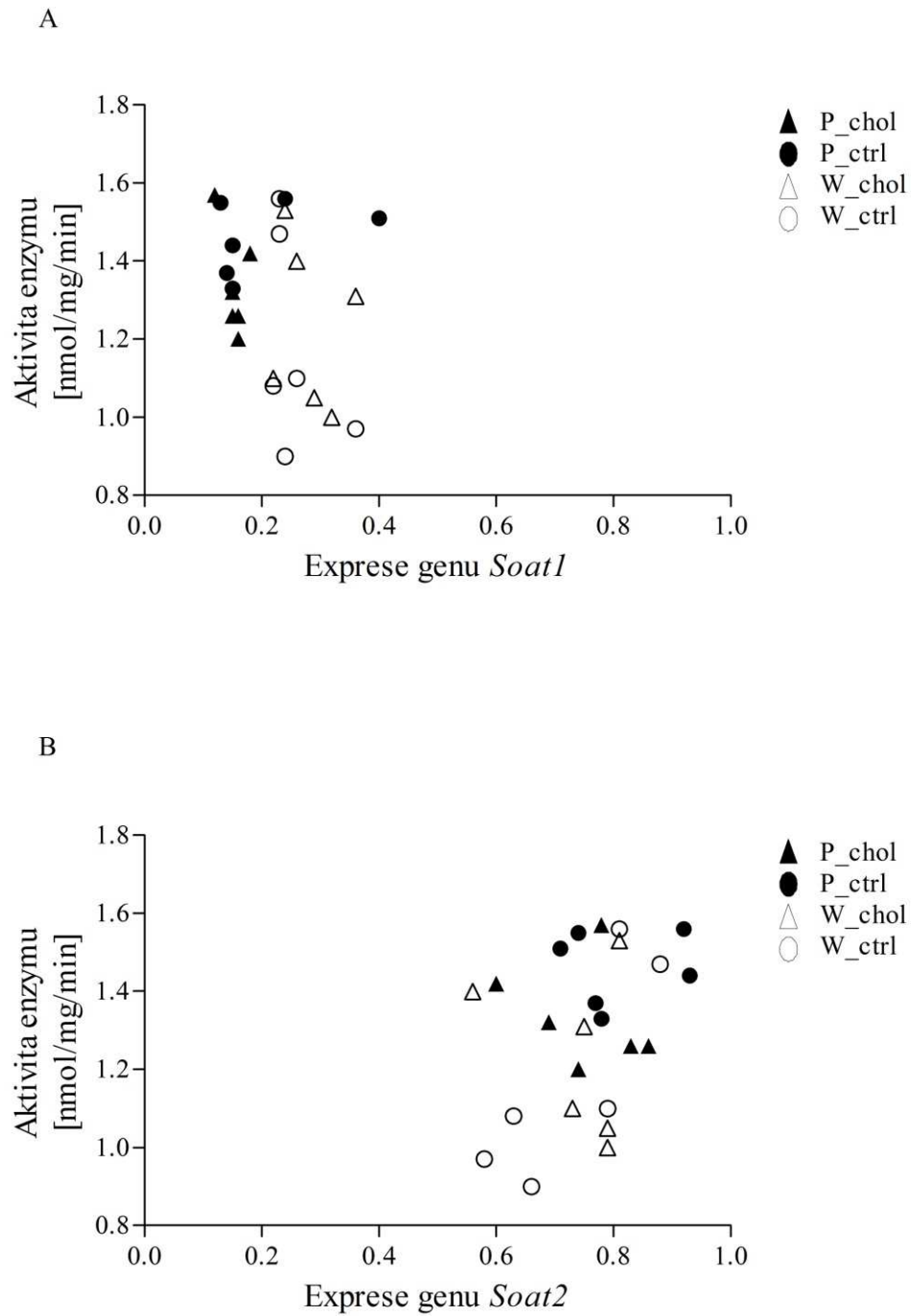
Mezi pokusnými skupinami nebyly zjištěny v aktivitě enzymu ACAT statisticky významné rozdíly (Obr. 22).



Obr. 22: Aktivita ACAT.

*Rozdíly v aktivitě enzymu ACAT hodnoceny ANOVA testem.*

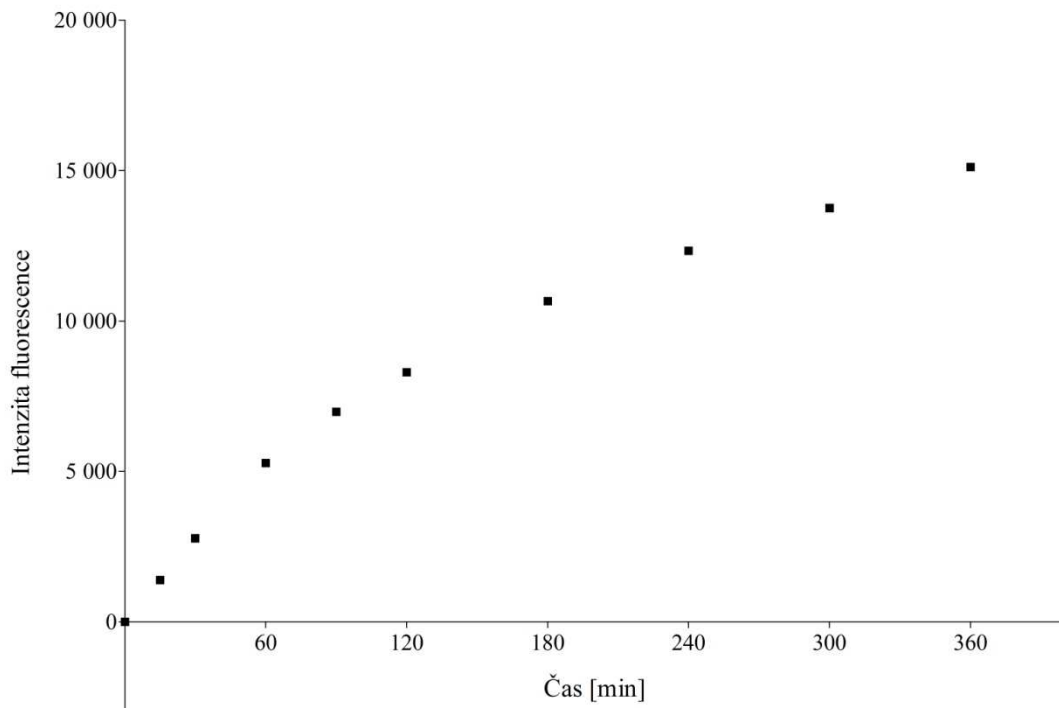
Mezi aktivitou enzymu a expresí obou genů (*Soat1* a *Soat2*), které ho kódují, nebyla nalezena žádná statisticky významná korelace (Obr. 23).



Obr. 23: Vynesení aktivity enzymu ACAT proti expresi genů *Soat1* (A) a *Soat2* (B).

### 5.2.3 Stanovení aktivity MTP

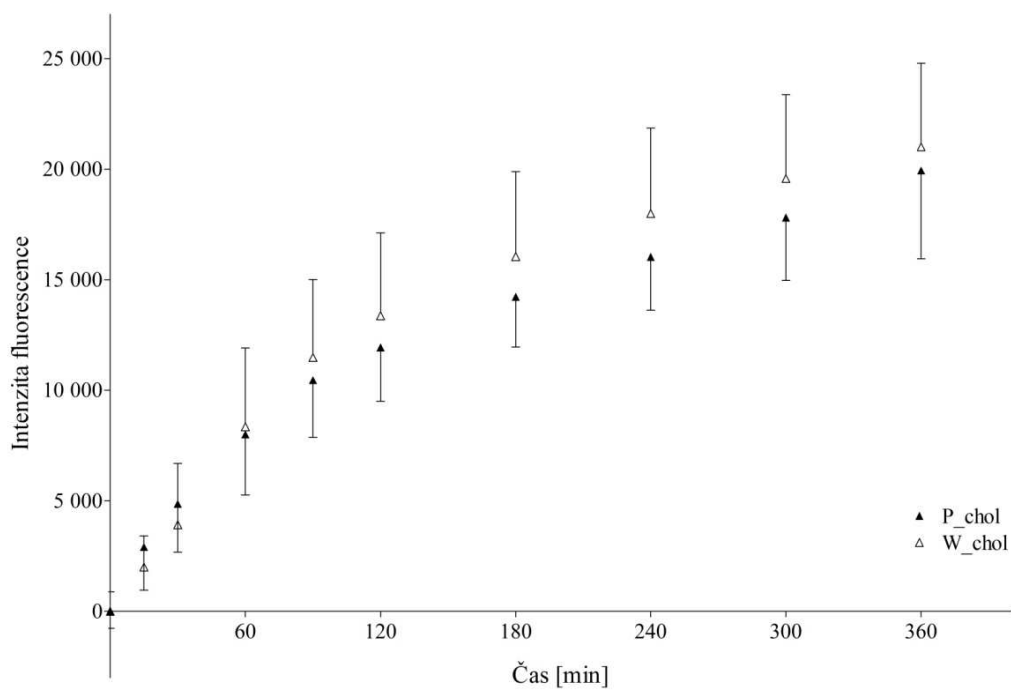
Při hodnocení průběhu změn intenzity fluorescence bylo pomocí dvoufaktorového ANOVA testu s opakovanými měřeními zjištěno, že aktivita MTP se liší mezi oběma kmeny – je nižší u PHHC potkanů – a není významně ovlivněna dietou (Obr. 25). V kontrolním pokusu byly sledovány změny fluorescence v přítomnosti částečně purifikovaného lidského MTP (Obr. 24).



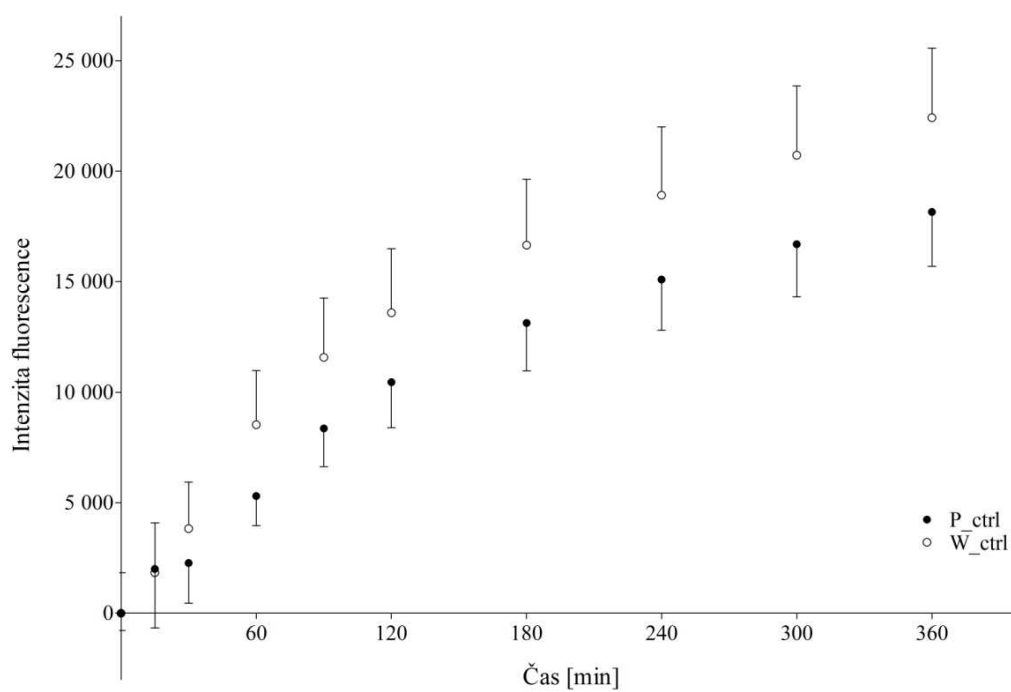
Obr. 24: Průběh aktivity částečně purifikovaného lidského MTP.

*Aktivita MTP vyjádřená intenzitou fluorescence.*

A



B

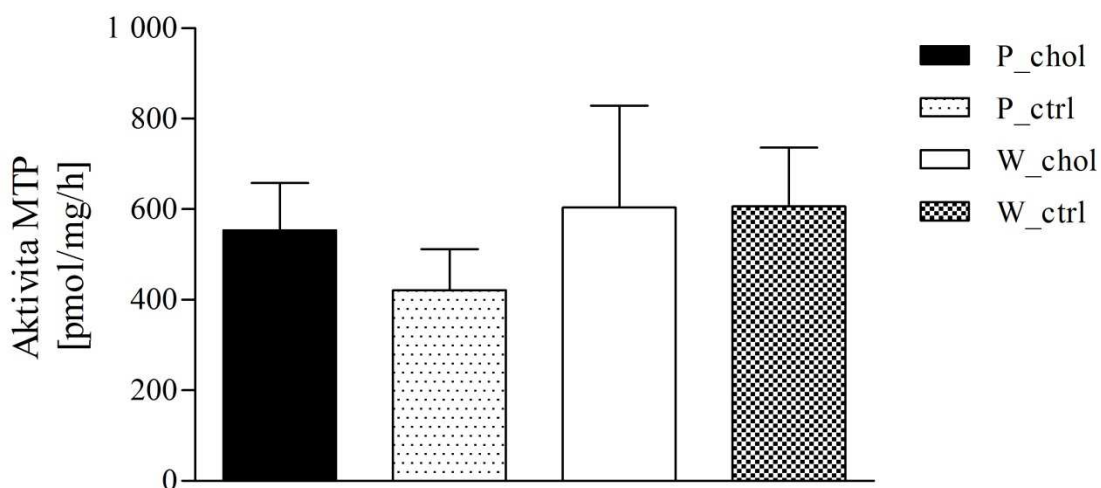


Obr. 25: Průběh aktivity MTP v čase na cholesterolové (A) a kontrolní (B) dietě.

A, B – Aktivita MTP vyjádřená intenzitou fluorescence.

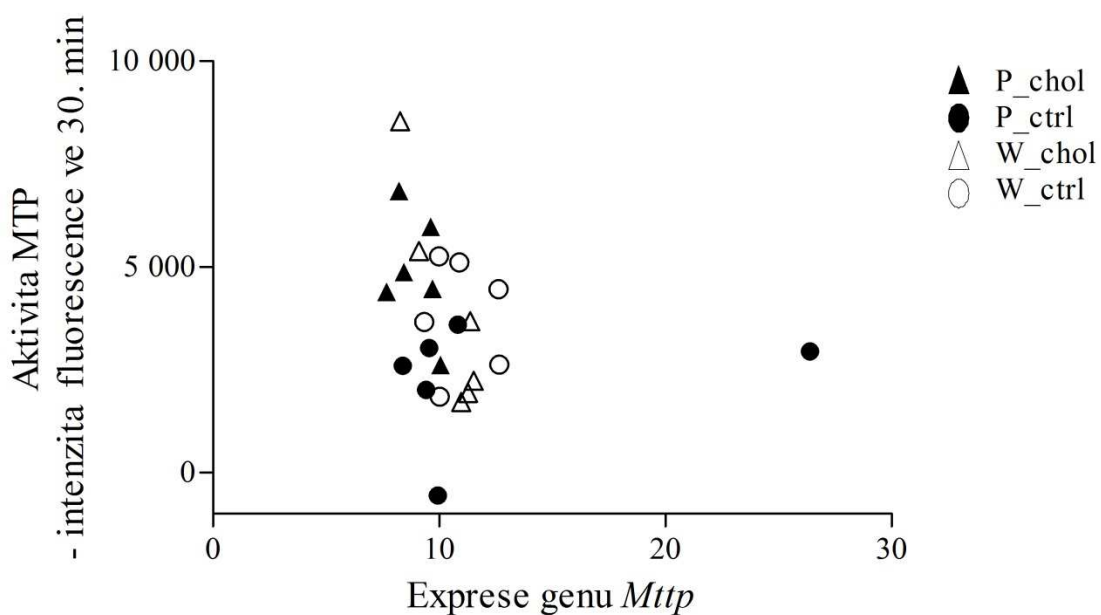
Statistickou analýzou aktivity proteinu vypočtené z počáteční rychlosti přenosu nebyly mezi skupinami zjištěny signifikantní rozdíly (Obr. 26).

Mezi aktivitou MTP a expresí genu *Mttp* nebyla nalezena žádná významná korelace (Obr. 27).



Obr. 26: Aktivita MTP.

Rozdíly v aktivitě MTP hodnoceny ANOVA testem.



Obr. 27: Vynesení aktivity MTP v 30. min proti expresi genu *Mttp*.

## 6. DISKUSE

### 6.1 Vliv podání dietního cholesterolu na koncentraci volného cholesterolu a cholesterylesterů

#### 6.1.1 Vliv podání dietního cholesterolu na koncentraci FC a CE v játrech

Na cholesterolové dietě stoupla koncentrace CE v játrech u obou kmenů – jejich podíl se zvýšil z 8 % na 25 % celkového cholesterolu v játrech u PHHC potkana a z 8 % na 27 % u potkana Wistar. Vzhledem k tomu, že podstatná část cholesterolu (~ 75 %) v játrech není esterifikována a koncentrace FC se po podání dietního cholesterolu významně nezměnila, koncentrace celkového cholesterolu v játrech nebyla ani u jednoho kmene dietou významně ovlivněna. Tato skutečnost je v souladu se současnými poznatky o přísné regulaci obsahu volného cholesterolu v buněčných membránách, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti svou přítomností ovlivňuje. Zvýšený obsah FC ve formě tzv. aktivního cholesterolu v plazmatické membráně slouží jako signál pro inhibici vlastní syntézy (Steck and Lange, 2010).

#### 6.1.2 Vliv podání dietního cholesterolu na koncentraci FC a CE ve VLDL

Podávání dietního cholesterolu je u obou kmenů spojeno s výrazným vzestupem poměru VLDL-CE/VLDL-FC (vzestup z 0,6 na 3 u PHHC potkana a z 0,6 na 2 u potkana Wistar). Vlivem 1% cholesterolové diety výrazně více stoupá koncentrace CE u PHHC potkanů (11,7krát) než u potkanů Wistar (5,2krát). Spolu se změnou koncentrace CE se zásadně mění i celková koncentrace cholesterolu ve VLDL.

VLDL obou linií na kontrolní dietě a potkanů Wistar na cholesterolové dietě mají poměr VLDL-C/VLDL-TG nižší než VLDL zdravého člověka (~ 0,45). Přitom u VLDL PHHC potkana na cholesterolové dietě tento poměr dosahuje hodnoty větší než jedna, a je tak blízký poměru VLDL-C/VLDL-TG lidských remnantních lipoproteinů.

U potkanů jsou CE inkorporovány do VLDL již v játrech. Na rozdíl od člověka totiž potkani nemají CETP (Hogarth *et al.*, 2003), který může tyto částice obohacovat o CE v cirkulaci výměnou za TG mezi lipoproteiny.

Zatímco inkorporace FC do VLDL je v současné době relativně dobře popsána – povrchová vrstva (fosfolipidy a FC) částic VLDL se vytváří z částí membrány endoplazmatického retikula hepatocytů, o inkorporaci CE je známo velice málo

(Olofsson *et al.*, 2009). Není jasné, zda mohou podobně jako TG představovat substrát pro MTP nebo zda se do částic dostávají při jejich fúzi s tukovými kapénkami obsahujícímu vedle TG i CE. Naše výsledky naznačují, že ke zvýšené inkorporaci CE do VLDL dochází, stoupne-li jejich obsah v játrech. Není však vůbec jasné, proč PHHC potkan inkorporuje do VLDL výrazně více CE než kontrolní potkan Wistar při tomtéž obsahu CE v játrech.

## 6.2 *Vliv diety a kmene na expresi vybraných genů a aktivitu proteinů podílejících se na syntéze VLDL*

### 6.2.1 *Vliv podání dietního cholesterolu na expresi vybraných genů*

Při studiu genové exprese jsme se soustředili na expresi genů – *Soat1* a *Soat2* – kódujících proteiny, které v játrech katalyzují vznik CE. Mezi oběma kmeny nebyly pozorovány zásadní rozdíly v jejich expresi. Pouze na cholesterolové dietě byla u PHHC potkanů nižší exprese *Soat1* než u potkanů Wistar. Naše výsledky ukázaly, že podobně jako u myši (Cases *et al.*, 1998) je v játrech potkana více exprimován gen pro ACAT2 (*Soat2*). CE, které jsou syntetizovány právě ACAT2, mohou být na rozdíl od CE syntetizovaných ACAT1 nejen uskladněny v tukových kapénkách, ale navíc přímo zabudovávány do vznikajících VLDL (Rudel *et al.*, 2001).

Dále byla studována exprese genu *Mtp*, jehož produkt transportuje TG uvnitř hepatocytu do vznikajících VLDL (Jamil *et al.*, 1995). Ani v tomto případě nebyly v expresi mezi liniemi naměřeny významné rozdíly. Exprese *Mtp* nebyla ovlivněna ani podáním 1% cholesterolové diety.

Zároveň byla studována exprese *Cyp7a1* – genu kódujícího cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylasu, která katalyzuje klíčový regulační krok přeměny cholesterolu na žlučové kyseliny (Schwarz *et al.*, 1996). Tato přeměna je zřejmě základním mechanismem, kterak z těla odstranit nadbytečný cholesterol. Někteří autoři tvrdí, že hypercholesterolemie se často vyvíjí tehdy, není-li organismus schopen zvýšit produkci žlučových kyselin. Hubáček *a kol.* (Hubáček *et al.*, 2008) měřili expresi *Cyp7a1* u potkanů PHHC a Wistar na 2% cholesterolové dietě a konstatovali, že na rozdíl od potkanů kmene Wistar, u kterých byla exprese genu zvýšena proti kontrolní dietě přibližně 20krát, nejsou PHHC potkani schopni zvýšit expresi tohoto genu.

V našem experimentu, ve kterém zvířata dostávala pouze 1% cholesterolovou dietu, došlo u potkanů Wistar pouze k 3násobnému vzestupu exprese a u PHHC potkanů k 2násobnému vzestupu, který ale nedosáhl statistické významnosti. Rozdíly v expresi *Cyp7a1* mezi kmeny nebyly pozorovány na cholesterolové ani kontrolní dietě. Tyto výsledky potvrzují dřívější nálezy našeho pracoviště, kdy podávání 1% cholesterolové diety rovněž nevedlo k statisticky významnému vzestupu exprese tohoto genu u obou kmenů potkana (Vlachová *et al.*, 2013). Rozpor mezi našimi a Hubáčkovými nálezy lze vysvětlit tím, že příjem cholesterolu spojený s podáváním

1% cholesterolové diety není dostatečný pro indukci exprese *Cyp7a1*. Protože víme, že na 1% cholesterolové dietě je účinně inhibována exprese genů odpovědných za biosyntézu cholesterolu (Vlachová *et al.*, 2013), je možné, že na zvýšený příjem cholesterolu odpovídají hepatocyty nejprve snížením endogenní syntézy cholesterolu a teprve v druhé řadě zvýšením produkce žlučových kyselin, neboť ty mohou paradoxně přispívat k účinnější absorpci cholesterolu ze střeva, nebo mohou být potenciálně toxické (Woolbright and Jaeschke, 2012).

Studována byla rovněž exprese genu pro apo F, neboť v předchozí práci našeho pracoviště (Vlachová *et al.*, 2013) byla zjištěna zvýšená exprese tohoto genu u PHHC potkanů na obou typech pokusné diety. Při další analýze genu byla sekvenací objevena 17nukleotidová inzerce, která vede ke vzniku předčasného STOP kodónu (Heczková, 2010). To pravděpodobně způsobuje tvorbu nefunkčního proteinu, což by mohl být důvod pro zvýšenou expresi příslušného genu (Vlachová *et al.*, 2013). Kvantifikace exprese genu byla v našich experimentech úspěšně zreprodukována.

Úloha tohoto proteinu je u potkana ovšem zcela nejasná. Gen byl identifikován u celé řady druhů a je exprimován především v játrech (Izem and Morton, 2009; Lagor *et al.*, 2012). Jeho funkce byla jednoznačně charakterizována u člověka – apo F je fyziologickým inhibitorem CETP (Wang *et al.*, 1999) v cirkulaci a ovlivňuje tak rychlost výměny napolárních lipidů (TG a CE) mezi jednotlivými lipoproteiny v cirkulaci. Potkan ale CETP nemá (Hogarth *et al.*, 2003). Apo F by tedy mohl mít i intracelulární funkci a mohl by fungovat jako inhibitor transferu CE do nově syntetizovaných VLDL, podobně jako inhibuje jejich výměnu mezi lipoproteiny v cirkulaci u člověka. Ztráta této funkce u PHHC potkana by potom vedla k zvýšené inkorporaci CE do VLDL. Úloze tohoto proteinu v metabolismu lipoproteinů by měla být v budoucnu věnována pozornost.

### **6.2.2 Vliv dietního cholesterolu na aktivitu ACAT a MTP**

Stanovení genové exprese neposkytuje úplnou informaci o možných kotranslačních, případně posttranslačních úpravách nově vznikajícího proteinu, které by mohly ovlivňovat jeho aktivitu. Proto byla stanovena aktivita proteinů, které by mohly přispívat k obohacení VLDL cholesterylestery – ACAT a MTP.

V aktivitě ACAT nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi oběma kmeny a aktivita enzymu nebyla ovlivněna ani příjmem dietního cholesterolu. To se zdá být poněkud

překvapující, neboť zvýšená aktivita enzymu bývá spojována i se zvýšenou produkcí VLDL.

Náš nález ovšem nemůže vysvětlit, proč u PHHC potkana dochází při srovnatelné koncentraci CE v játrech k jejich zvýšené inkorporaci do VLDL.

Ani aktivita MTP se mezi jednotlivými skupinami významně nelišila, i když analýzy průběhu změn fluorescence naznačily, že aktivita tohoto proteinu je poněkud nižší u PHHC potkanů. Ani tento nález ovšem nemůže vysvětlit zvýšenou inkorporaci CE do VLDL u PHHC potkana.

Při analýze vztahu aktivity proteinu a exprese genu nebyla nalezena žádná významnost ani u ACAT, ani u MTP nejspíš proto, že se jednalo o velice homogenní soubory.

Ani ACAT, ani MTP nehrají úlohu ve zvýšené inkorporaci CE do VLDL u PHHC potkana. Vysvětlení je proto nutné hledat jinde – je otázkou, zda by v tomto procesu mohl hrát roli apo F.

PHHC potkani jsou vhodným modelem pro studium hypercholesterolémie, jelikož na cholesterolové dietě bez přidaných žlučových kyselin či jiných látek toxických pro játra vytvoří hypercholesterolémii kvantitativně srovnatelnou s hypercholesterolémií u pacientů s familiární dysbetalipoproteinémií. Po podání dietního cholesterolu přenáší PHHC potkani cholesterol částicemi VLDL, IDL a LDL, a přitom nedochází k vzestupu koncentrace cholesterolu v HDL, čímž se tento model podobá hypercholesterolémii u člověka (Vlachová *et al.*, 2013). V současné době by tento model mohl najít nové uplatnění – v souvislosti s nárůstem počtu pacientů s diabetem 2. typu je stále více pozornosti věnováno patogenezi jaterní nealkoholické steatózy, která je u těchto pacientů velice častá (Mavrogiannaki and Migdalis, 2013). Steatózu lze u potkana relativně snadno indukovat podáváním cholesterolové diety (nikoli pouze zvýšeným příjmem tuku). Častěji se však navozuje podáním diety s nefyziologickým množstvím kyseliny cholové (Kitamori *et al.*, 2012). Protože u PHHC potkana lze indukovat steatózu cholesterolovou dietou bez přídavku žlučových kyselin (Poedne, 1986; Vlachová *et al.*, 2013), představuje PHHC perspektivní model pro studium této poruchy, a je tudíž důležité podrobně porozumět všem aspektům metabolismu lipidů v játrech tohoto potkana.

## 7. ZÁVĚR

- V souladu s očekáváním jsem zjistila, že koncentrace FC v játrech se mezi oběma kmeny neliší na kontrolní ani na cholesterolové dietě. Koncentrace CE v játrech po podání dietního cholesterolu významně stoupla u obou linií, ale mezi kmeny na stejné dietě nebyly zjištěny významné rozdíly.
- Podáním dietního cholesterolu vzrostla koncentrace FC i CE ve VLDL u obou kmenů. V obou případech byl vzestup cholesterolu mnohonásobně vyšší u PHHC potkana. Prokázala jsem, že k hypercholesterolémii PHHC potkanů zásadně přispívá zvýšený obsah VLDL-CE.
- Potvrdila jsem, že exprese genů *ApoE*, *Mtp*, *Soat1* a *Soat2* se nemění po podání dietního cholesterolu. Dále jsem ověřila, že příjem cholesterolu zvyšuje expresi genu *Cyp7a1* u potkanů Wistar, zatímco u PHHC potkanů vzestup nedosáhl statistické významnosti. Potvrdila jsem, že PHHC potkani mají proti potkanům Wistar zvýšenou expresi *ApoE* na cholesterolové dietě. Navíc jsem zjistila, že oba kmeny v játrech exprimují více *Soat2* nežli *Soat1*.
- Zavedla jsem metody pro stanovení aktivit proteinů ACAT a MTP. V aktivitě ACAT jsem mezi pokusnými skupinami nezjistila žádné rozdíly. Vzhledem k tomu, že potkani v játrech exprimují více *Soat2*, za aktivitu ACAT v játrech pravděpodobně odpovídá jeho isoforma ACAT2. V aktivitě MTP hodnocené jako přírůstek fluorescence v čase byly naměřeny rozdíly mezi oběma kmeny zvířat (vyšší u kontrolních potkanů). Při analýze rozdílů v aktivitě MTP však nebyl nalezen žádný statisticky významný vliv diety či kmene na aktivitu tohoto proteinu.

Vzhledem k tomu, že jsem mezi kmeny nenalezla rozdíly v expresi genů – *Soat1*, *Soat2*, *Mtp*, ani v aktivitě jejich produktů, zdá se nepravděpodobné, že by se ACAT či MTP podílely na patogenezi hypercholesterolémie u PHHC potkana.

## 8. LITERATURA

- Adiels, M., Olofsson, S. O., Taskinen, M. R. and Boren, J. (2008) Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1225-1236.
- Attie, A. D., Pittman, R. C., Watanabe, Y. and Steinberg, D. (1981) Low density lipoprotein receptor deficiency in cultured hepatocytes of the WHHL rabbit. Further evidence of two pathways for catabolism of exogenous proteins. *The Journal of biological chemistry* **256**, 9789-9792.
- Au, W. S., Kung, H. F. and Lin, M. C. (2003) Regulation of microsomal triglyceride transfer protein gene by insulin in HepG2 cells: roles of MAPKerk and MAPKp38. *Diabetes* **52**, 1073-1080.
- Bařinka, C. (1995) Lipoproteinová a jaterní lipáza v modelu experimentální hyperlipoproteinémie. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta: Praha.
- Berman, M., Hall, M., 3rd, Levy, R. I., Eisenberg, S., Bilheimer, D. W., Phair, R. D. and Goebel, R. H. (1978) Metabolism of apoB and apoC lipoproteins in man: kinetic studies in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *Journal of lipid research* **19**, 38-56.
- Boren, J., Taskinen, M. R., Olofsson, S. O. and Levin, M. (2013) Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J Intern Med* **274**, 25-40.
- Brown, A. M. and Gibbons, G. F. (2001) Insulin inhibits the maturation phase of VLDL assembly via a phosphoinositide 3-kinase-mediated event. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1656-1661.
- Cases, S., Novak, S., Zheng, Y. W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., Welch, C. B., Lusis, A. J., Spencer, T. A., Krause, B. R., Erickson, S. K. and Farese, R. V., Jr. (1998) ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its

cloning, expression, and characterization. *The Journal of biological chemistry* **273**, 26755-26764.

Cífková, R., Škodová, Z., Bruthans, J., Holub, J., Adámková, V., Jozífová, M., Galovcová, M., Wohlfahrt, P., Krajčoviechová, A., Petržílková, Z. and Lánská, V. (2010) Longitudinal trends in cardiovascular mortality and blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2007/2008. *J Hypertens* **28**, 2196-2203.

Cole, T. G., Kuisk, I., Patsch, W. and Schonfeld, G. (1984) Effects of high cholesterol diets on rat plasma lipoproteins and lipoprotein-cell interactions. *J Lipid Res* **25**, 593-603.

Češka, R., Bobková, D., Hubáček, J., Králíková, E., Malík, J. and Svobodová, H. (2005) *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. TRITON: Praha.

DeLamatre, J. G. and Roheim, P. S. (1981) Effect of cholesterol feeding on apo B and apo E concentrations and distributions in euthyroid and hypothyroid rats. *J Lipid Res* **22**, 297-306.

Dixon, J. L., Furukawa, S. and Ginsberg, H. N. (1991) Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* **266**, 5080-5086.

Elovson, J., Chatterton, J. E., Bell, G. T., Schumaker, V. N., Reuben, M. A., Puppione, D. L., Reeve, J. R., Jr. and Young, N. L. (1988) Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. *Journal of lipid research* **29**, 1461-1473.

Fungwe, T. V., Cagen, L., Wilcox, H. G. and Heimberg, M. (1992) Regulation of hepatic secretion of very low density lipoprotein by dietary cholesterol. *J Lipid Res* **33**, 179-191.

- Gibbons, G. F. (1990) Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J* **268**, 1-13.
- Gibbons, G. F., Brown, A. M., Wiggins, D. and Pease, R. (2002) The roles of insulin and fatty acids in the regulation of hepatic very-low-density lipoprotein assembly. *J R Soc Med* **95 Suppl 42**, 23-32.
- Glickman, R. M., Rogers, M. and Glickman, J. N. (1986) Apolipoprotein B synthesis by human liver and intestine in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5296-5300.
- Gotto, A. M., Jr., Pownall, H. (2003) *Manual of Lipid Disorders. Reducing the Risk for Coronary Heart Disease*. Lippincot Williams & Wilkins: Philadelphia.
- Guyard-Dangremont, V., Desrumaux, C., Gambert, P., Lallemand, C. and Lagrost, L. (1998) Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **120**, 517-525.
- Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**, 1345-1353.
- Heczková, M. (2010) Regulace metabolismu cholesterolu v játrech Pražského hereditárně hypercholesterolemického (PHHC) potkana. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta: České Budějovice.
- Hogarth, C. A., Roy, A. and Ebert, D. L. (2003) Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **135**, 219-229.
- Hubáček, J. A., Bobková, D., Bohuslavová, R. and Poledne, R. (2008) Differences in expression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase between PHHC and Wistar rats. *Folia Biol (Praha)* **54**, 18-23.

- Chapman, M. J. (1986) Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods in enzymology* **128**, 70-143.
- Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E. and Herz, J. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of clinical investigation* **92**, 883-893.
- Izem, L. and Morton, R. E. (2009) Molecular cloning of hamster lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) and regulation of its expression by hyperlipidemia. *J Lipid Res* **50**, 676-684.
- Jamil, H., Dickson, J. K., Jr., Chu, C. H., Lago, M. W., Rinehart, J. K., Biller, S. A., Gregg, R. E. and Wetterau, J. R. (1995) Microsomal triglyceride transfer protein. Specificity of lipid binding and transport. *The Journal of biological chemistry* **270**, 6549-6554.
- Jamil, H., Chu, C. H., Dickson, J. K., Jr., Chen, Y., Yan, M., Biller, S. A., Gregg, R. E., Wetterau, J. R. and Gordon, D. A. (1998) Evidence that microsomal triglyceride transfer protein is limiting in the production of apolipoprotein B-containing lipoproteins in hepatic cells. *J Lipid Res* **39**, 1448-1454.
- Kane, J. P., Hardman, D. A. and Paulus, H. E. (1980) Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2465-2469.
- Keyes, W. G. and Heimberg, M. (1979) Influence of thyroid status on lipid metabolism in the perfused rat liver. *The Journal of clinical investigation* **64**, 182-190.
- Khan, B., Wilcox, H. G. and Heimberg, M. (1989) Cholesterol is required for secretion of very-low-density lipoprotein by rat liver. *Biochem J* **258**, 807-816.
- Kita, T., Brown, M. S., Watanabe, Y. and Goldstein, J. L. (1981) Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an

animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2268-2272.

Kitamori, K., Naito, H., Tamada, H., Kobayashi, M., Miyazawa, D., Yasui, Y., Sonoda, K., Tsuchikura, S., Yasui, N., Ikeda, K., Moriya, T., Yamori, Y. and Nakajima, T. (2012) Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. *Environ Health Prev Med* **17**, 173-182.

Knowles, J. W. and Maeda, N. (2000) Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**, 2336-2345.

Kovář, J. (1991) Regulace aktivity lecithin:cholesterolacyltransferázy (LCAT) při metabolických poruchách spojených s rozvojem hyperlipoproteinémie. Praha.

Kovář, J., Tonar, Z., Heczková, M. and Poledne, R. (2009) Prague hereditary hypercholesterolemic (PHHC) rat - a model of polygenic hypercholesterolemia. *Physiol Res* **58 Suppl 2**, S95-99.

Lagor, W. R., Fields, D. W., Khetarpal, S. A., Kumaravel, A., Lin, W., Weintraub, N., Wu, K., Hamm-Alvarez, S. F., Drazul-Schrader, D., de la Llera-Moya, M., Rothblat, G. H. and Rader, D. J. (2012) The effects of apolipoprotein F deficiency on high density lipoprotein cholesterol metabolism in mice. *PLoS One* **7**, e31616.

Mahley, R. W. and Holcombe, K. S. (1977) Alterations of the plasma lipoproteins and apoproteins following cholesterol feeding in the rat. *J Lipid Res* **18**, 314-324.

Macholán, L. (1979) *Přehled enzymové kinetiky*. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Přírodovědecká fakulta: Brno.

Malmstrom, R., Packard, C. J., Caslake, M., Bedford, D., Stewart, P., Yki-Jarvinen, H., Shepherd, J. and Taskinen, M. R. (1998) Effects of insulin and acipimox on

- VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. *Diabetes* **47**, 779-787.
- Mashimo, T., Ogawa, H., Cui, Z. H., Harada, Y., Kawakami, K., Masuda, J., Yamori, Y. and Nabika, T. (2007) Comprehensive QTL analysis of serum cholesterol levels before and after a high-cholesterol diet in SHRSP. *Physiol Genomics* **30**, 95-101.
- Mavrogiannaki, A. N. and Migdalis, I. N. (2013) Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease: newer data. *Int J Endocrinol* **2013**, 450639.
- Morton, R. E. and Zilversmit, D. B. (1981) A plasma inhibitor of triglyceride and cholesteryl ester transfer activities. *The Journal of biological chemistry* **256**, 11992-11995.
- Oelkers, P., Behari, A., Cromley, D., Billheimer, J. T. and Sturley, S. L. (1998) Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-related enzymes. *The Journal of biological chemistry* **273**, 26765-26771.
- Olivecrona, G. and Olivecrona, T. (1995) Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **6**, 291-305.
- Olofsson, S. O., Bostrom, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J. and Boren, J. (2009) Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 448-458.
- Ouguerram, K., Magot, T. and Lutton, C. (1996) Metabolism of plasma lipoproteins in the genetically hypercholesterolemic rat (RICO). *Metabolism* **45**, 4-11.
- Parini, P., Davis, M., Lada, A. T., Erickson, S. K., Wright, T. L., Gustafsson, U., Sahlin, S., Einarsson, C., Eriksson, M., Angelin, B., Tomoda, H., Omura, S., Willingham, M. C. and Rudel, L. L. (2004) ACAT2 is localized to hepatocytes

and is the major cholesterol-esterifying enzyme in human liver. *Circulation* **110**, 2017-2023.

Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.

Poledne, R. (1986) Effect of diet on cholesterol metabolism in the Prague hereditary hypercholesterolemic rat. In: *Nutritional effects on cholesterol metabolism*. pp. 91-97. Ed. A. C. Beynen. Transmondial: Voorthuizen.

Poledne, R. and Vrána, A. (1989) Hyperlipoproteinemia and Experimental Atherosclerosis. In: *Methods in Animal Physiology*. Eds. Z. Deyl, J. Zicha. CRC Press.

Pullinger, C. R., North, J. D., Teng, B. B., Rifichi, V. A., Ronhild de Brito, A. E. and Scott, J. (1989) The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells: regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *Journal of lipid research* **30**, 1065-1077.

Rudel, L. L., Lee, R. G. and Cockman, T. L. (2001) Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **12**, 121-127.

Shiomi, M. and Ito, T. (2009) The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: a tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis* **207**, 1-7.

Schwarz, M., Lund, E. G., Setchell, K. D., Kayden, H. J., Zerwekh, J. E., Bjorkhem, I., Herz, J. and Russell, D. W. (1996) Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *J Biol Chem* **271**, 18024-18031.

- Smithies, O. and Maeda, N. (1995) Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5266-5272.
- Steck, T. L. and Lange, Y. (2010) Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends Cell Biol* **20**, 680-687.
- Tall, A. R. (1993) Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* **34**, 1255-1274.
- Tanzawa, K., Shimada, Y., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M. and Watanabe, H. (1980) WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS Lett* **118**, 81-84.
- Temel, R. E., Gebre, A. K., Parks, J. S. and Rudel, L. L. (2003) Compared with Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *J Biol Chem* **278**, 47594-47601.
- Temel, R. E., Hou, L., Rudel, L. L. and Shelness, G. S. (2007) ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res* **48**, 1618-1627.
- van den Maagdenberg, A. M., Hofker, M. H., Krimpenfort, P. J., de Bruijn, I., van Vlijmen, B., van der Boom, H., Havekes, L. M. and Frants, R. R. (1993) Transgenic mice carrying the apolipoprotein E3-Leiden gene exhibit hyperlipoproteinemia. *The Journal of biological chemistry* **268**, 10540-10545.
- van Vlijmen, B. J., van den Maagdenberg, A. M., Gijbels, M. J., van der Boom, H., HogenEsch, H., Frants, R. R., Hofker, M. H. and Havekes, L. M. (1994) Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* **93**, 1403-1410.
- Vlachová, M., Heczková, M., Rybáková, K., Stránecký, V., Ivánek, R., Vrba, T., Schmiedtová, M., Poledne, R., Jirsa, M. and Kovář, J. (2013) The mechanism of

hypercholesterolemia and analysis of hepatic transcriptome in PHHC rat. A model of hypercholesterolemia induced by dietary cholesterol (manuskript).

- Wang, X., Driscoll, D. M. and Morton, R. E. (1999) Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F. *The Journal of biological chemistry* **274**, 1814-1820.
- Watanabe, Y. (1980) Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* **36**, 261-268.
- Wetterau, J. R. and Zilversmit, D. B. (1984) A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes. *J Biol Chem* **259**, 10863-10866.
- Wiggins, D. and Gibbons, G. F. (1992) The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *The Biochemical journal* **284** ( Pt 2), 457-462.
- Woolbright, B. L. and Jaeschke, H. (2012) Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World journal of gastroenterology : WJG* **18**, 4985-4993.
- Wu, A. L. and Windmueller, H. G. (1981) Variant forms of plasma apolipoprotein B. Hepatic and intestinal biosynthesis and heterogeneous metabolism in the rat. *The Journal of biological chemistry* **256**, 3615-3618.
- Zamel, R., Khan, R., Pollex, R. L. and Hegele, R. A. (2008) Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet J Rare Dis* **3**, 19.