

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



**Vliv solubilního endoglinu na metabolismus cholesterolu v játrech
u transgenních myši s vysokotukovou dietou**

Diplomová práce

Kristýna Hofmanová

Vedoucí diplomové práce: Prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Eva Doleželová, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že tuto práci jsem sepsala jako mé původní autorské dílo a vypracovala jsem jej samostatně. Veškerá literatura a další použité prameny, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání stejného nebo jiného titulu.

Datum:

Podpis:

Kristýna Hofmanová

Poděkování:

Chtěla bych především poděkovat mojí konzultantce PharmDr. Evě Doleželové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a odborné rady, dále také Mgr. Ivone Cristina Igreja Sà za zprostředkování a pomoc s praktickou částí diplomové práce.

Za vedení diplomové práce bych ráda poděkovala Prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D.

V poslední řadě bych chtěla poděkovat také rodičům za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Kristýna Hofmanová

Vliv solubilního endoglinu na metabolismus cholesterolu v játrech u transgenních myší s vysokotukovou dietou

Diplomová práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce:

Zvýšené plazmatické koncentrace solubilního endoglinu (sENG) jsou pozorovány u metabolických onemocnění typu diabetes mellitus typu 2 nebo hypercholesterolemie. Již bylo dokázáno, že sENG má vliv na cholesterolový metabolismus u zdravých myší krměných standardní laboratorní dietou, ovšem efekt sENG na metabolismus cholesterolu v kombinaci s vysokotukovou dietou (HFD) ještě není znám. Cílem této diplomové práce proto bylo objasnit vliv sENG na metabolismus cholesterolu v játrech u transgenních myší (*Sol-Eng*⁺), jejichž játra jsou poškozena onemocněním NASH („Non-alcoholic steatohepatitis“) indukované HFD dietou.

Metody:

Ve studii byli použiti tři měsíce staří samci myší (*Sol-Eng*⁺) s vysokou plazmatickou hladinou sENG na podkladě CBAxC57BL/6J a kontrolní „wild type“ myši (n = 8, v každé skupině). Zvířata byla rozdělena do tří skupin dle přijímané diety a hladiny sENG v plazmě: „wild-type“ krměni po dobu šesti měsíců standardní laboratorní dietou (WT_{chow}); „wild-type“ krměni vysokotukovou dietou (WT_{HFD}) a skupina s vysokou plazmatickou hladinou sENG, která byla po dobu šesti měsíců krměna HFD (sENG_{HFD}). Pro analýzu exprese jednotlivých genů na úrovni mRNA a proteinů zodpovědných za transport cholesterolu v játrech byly použity metody qRT-PCR a Western blot. Celkové hladiny cholesterolu v plazmě a játrech byly stanoveny biochemickou analýzou.

Výsledky:

Zvýšení koncentrace cholesterolu v plazmě a játrech a změny v expresi příslušných proteinů a genů na úrovni mRNA byly zapříčiněny pouze podávanou HFD. Vysoká plazmatická

hladina sENG v kombinaci s vysokotukovou dietou statisticky významně neovlivnia metabolismus cholesterolu v játrech ani expresi transportních mechanismů pro cholesterol v játrech.

Závěr:

Zvýšené hladiny sENG ve spojení s vysokotukovou dietou neměly vliv na metabolismus cholesterolu v játrech.

Abstract

Kristýna Hofmanová

Effect of soluble endoglin on cholesterol metabolism in the liver of high-fat diet-fed transgenic mice

Diploma thesis

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background:

Increased plasma concentrations of soluble endoglin (sENG) are observed in metabolic diseases like diabetes mellitus type 2 or hypercholesterolemia. It has already been shown that sEng influence the cholesterol metabolism in healthy mice fed standard laboratory diet. However, the effect of sENG on cholesterol metabolism in combination with high fat diet (HFD) is not known yet. The aim of this diploma thesis was to elucidate the influence of the sENG on the metabolism of cholesterol in the liver of transgenic mice (Sol-Eng⁺), with liver damaged by NASH (Non-alcoholic steatohepatitis) induced by HFD.

Methods:

Three months old male mice (Sol-Eng⁺) with high plasma levels of sENG on the basis of the CBAxC57BL/6J and control „wild-type“ mice with unspecified levels of soluble endoglin (n=8, in each group) we used in this study. The animals were divided into groups according to the level of soluble endoglin and the type of diet: „wild-type“ fed for six months with standard laboratory diet (WTchow); „wild-type“ with high fat diet (WT_{HFD}) and high-plasma sENG group fed HFD for six months (sENG_{HFD}). For the analysis of the expression of individual genes at the mRNA and protein level was used qRT-PCR and Western blot. Total cholesterol levels in plasma and livers were determined by biochemical analysis.

Results:

The increase of cholesterol levels in plasma and liver and changes in the expression of the respective proteins and genes at mRNA level were caused only by HFD. High plasma levels of sENG in combination with high-fat diet did not significantly affect hepatic cholesterol metabolism or the expression of the cholesterol hepatic transport mechanisms.

Conclusions:

Elevated sENG levels in combination with a high fat diet did not affect liver cholesterol metabolism.

Obsah

1.	Úvod	9
2.	Cholesterol	10
2.1.	Metabolismus cholesterolu	11
2.1.1.	Syntéza cholesterolu	12
2.1.2.	Transport cholesterolu v organismu	14
2.1.3.	Absorpce cholesterolu	16
2.1.4.	Eliminace cholesterolu	17
2.2.	Enterohepatální oběh	18
3.	Jaterní steatóza	19
3.1.	„Non – alcoholic fatty liver disease“ (NAFLD)	19
3.1.1.	Diagnostika NAFLD	21
3.1.2.	Etiopatogeneze NAFLD	21
3.2.	Nealkoholová steatohepatitida (NASH)	22
3.2.1.	Diagnostika NASH	24
3.2.2.	Léčba NASH	24
3.2.3.	NASH a cholesterol	25
4.	Endoglin	28
4.1.	Struktura endoglinu	28
4.2.	Funkce endoglinu	29
4.3.	Endoglin a NO	32
4.4.	Exprese endoglinu	32
4.5.	Formy endoglinu	33
5.	Solubilní endoglin	34
5.1.	Solubilní endoglin v játrech	35
5.1.1.	Solubilní endoglin a hypercholesterolémie	36

6.	Cíl diplomové práce	38
7.	Experimentální část	39
7.1.	Metodika	39
7.1.1.	Chemikálie	39
7.1.2.	Pokusná zvířata	39
7.1.3.	qRT-PCR	39
7.1.4.	Western blot	41
8.	Výsledky	43
8.1.	Biochemická analýza	43
8.1.2	qRT-PCR	44
8.1.3	Western blot	45
9.	Diskuse	47
10.	Závěr	50
11.	Použité zkratky	51
12.	Seznam použité literatury	54

1. Úvod

Řada vědců zaměřuje v posledních letech svoji pozornost na sledování významu tzv. solubilního endoglinu (sENG), a to nejen jako biomarkeru, jehož hladiny se zvyšují během patologických procesů, ale zkoumají také jeho potenciální vliv na progresi řady onemocnění, a to hlavně kardiovaskulárních, metabolických a nádorových (Vitverová et al., 2018).

sENG je extracelulární část tkáňového endoglinu (CD 105), odštěpená enzymem MMP - 14 („Matrix metalloproteinase 14“) a uvolněná do oběhu (Venkatesha et al., 2006). Endoglin je transmembránový glykoprotein, který působí jako koreceptor TGF- β („Transforming growth factor β “) a je syntetizován především na endotelových a hladkosvalových buňkách cév, ale také na mesangiálních buňkách, fibroblastech nebo jaterních hvězdicových buňkách (HSC), což naznačuje, že by mohl být spojen s profibrogenními vlastnostmi těchto jaterních buněk (Doleželová et al., 2019).

Zvýšené hladiny sENG v plazmě byly hojně detekovány u kardiovaskulárních a metabolických onemocnění, jako je hypercholesterolémie, familiární hypercholesterolémie, diabetes mellitus typu II (DM typu II), arteriální hypertenze, hereditární hemorhagické talangiectázie (HHT) nebo preeklampsie. Hladiny sENG korelují s vážností nemoci, ale jeho efekt na biochemii cholesterolu zatím nebyl zcela objasněn.

Hladiny sENG jsou zvýšeny u patologických stavů spojených se zvýšenou plazmatickou koncentrací cholesterolu, a to vyvolává otázku, zda mohou zvýšené hladiny sENG ovlivnit jaterní funkce (Doleželová et al., 2019). Spekuluje se o možném vlivu na rozvoj jaterní fibrózy, vzhledem k již objasněné významné roli TGF- β v tomto procesu (Rathouská et al., 2015).

sENG by v budoucnu mohl být významným markerem řady nemocí, a to nejen těch spojených s kardiovaskulárním systémem nebo metabolickým onemocněním, ale jeho zvýšené hladiny byly zjištěny také například v neovaskularizovaných tumorech prostaty a prsu (Li et al., 2001).

Tato diplomová práce je zaměřena na sledování vlivu sENG na metabolismus cholesterolu u transgenních myší s vysokou plazmatickou koncentrací sENG, jejichž játra jsou vlivem podávané vysokotukové diety poškozena onemocněním NASH („Non-alcoholic steatohepatitis“).

2. Cholesterol

Cholesterol se řadí mezi steroly, jedná se o nejvýznamnější zoosterol (Kasper et al., 2015; Schneiderka, 2004).

S ohledem na svoji lipofilní povahu je společně se svými estery řazen do skupiny „lipidů“ nebo „lipoidních látek“. Do této skupiny patří kromě cholesterolu také triacylglyceroly, fosfolipidy, sfingolipidy, glykosfingolipidy, neesterifikované mastné kyseliny a eikosanoidy (Schneiderka, 2004).

Cholesterol produkují téměř všechny buňky, je jedním ze základních strukturálních komponent buněčných membrán a lipoproteinů, je prekurzorem žlučových kyselin (ŽK), steroidních hormonů (glukokortikoidy, mineralokortikoidy, pohlavní hormony) a vitamínu D (Brodanová et al., 1997; Holeček et al., 2006; Benito-Vicente et al., 2018).

Do organismu se cholesterol dostává buď externě a vstřebává se z trávicího traktu nebo je syntetizován *de novo* z acetyl-CoA (Lumbada et al., 2009). Ve stravě se cholesterol vyskytuje pouze v potravinách živočišného původu, jako je např. vaječný žloutek, mléko, játra (Holeček et al., 2006). Denně je v organismu syntetizováno přibližně dvakrát více cholesterolu, než je ho přijímáno v dietě (250-750 mg/den) (Brodanová et al., 1997). Syntéza probíhá v játrech a střevní stěně, hlavní význam ale mají játra, kde se syntetizuje až 90 % endogenního cholesterolu (Kasper et al., 2015). Syntéza a budoucí zpracovávání cholesterolu a ŽK je řízeno pomocí klíčových kroků, které zahrnují HMG-CoA reductázu („3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzym A reductase“) pro syntézu cholesterolu a Cyp7a1 („Cholesterol 7 alpha-hydroxylase“) pro syntézu ŽK (Doleželová et al., 2019). Syntéza ŽK je důležitou cestou katabolismu cholesterolu (Chiang et al., 2018).

Přibližně 600-700 mg cholesterolu je denně inkorporováno do ŽK a asi 50 mg do steroidních hormonů (Brodanová et al., 1997). Žlučová exkrece a přeměna cholesterolu na ŽK, je hlavní cestou eliminace kumulovaného cholesterolu z organismu (Doleželová et al., 2019). V menší míře je pak cholesterol vylučován stolicí a kůží (Obr. 1) (Brodanová et al., 1997).

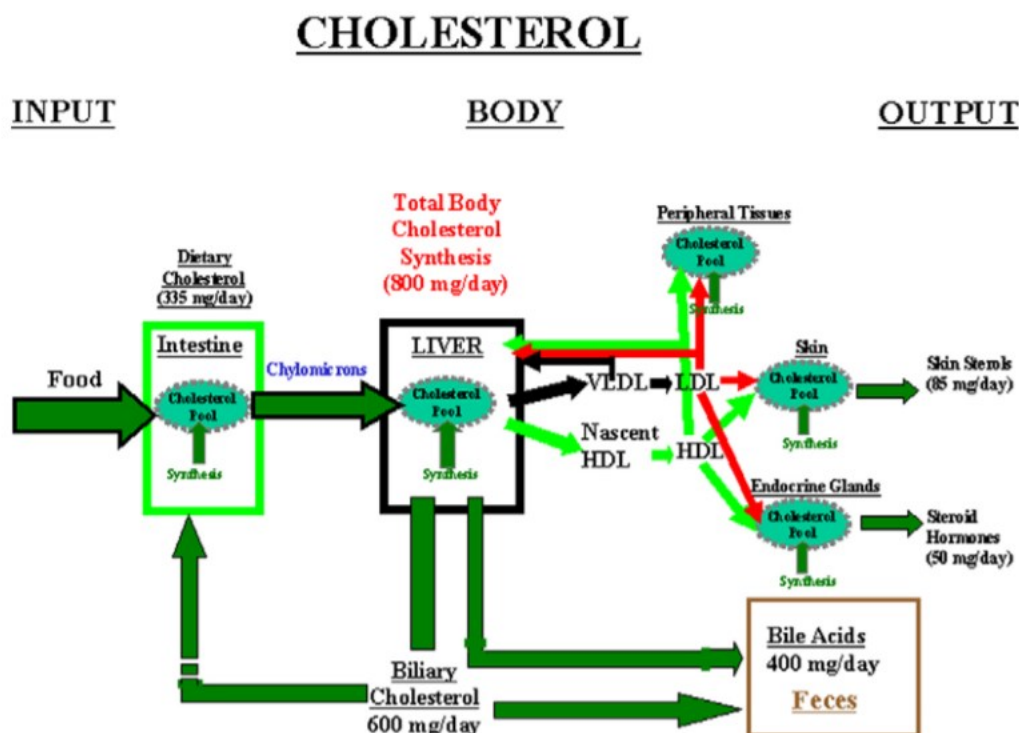
Cholesterol se v organismu může vyskytovat volně nebo ve formě esterů s mastnými kyselinami (MK). Volný cholesterol, tedy neesterifikovaný, je amfipatický - polární charakter má hydroxylová skupina. Esterifikovaný cholesterol je hydrofobní, z toho důvodu se nachází uvnitř lipoproteinových částic, na rozdíl od volného cholesterolu (Holeček et al., 2006). Celkový cholesterol v plazmě je ze 2/3 neesterifikovaný (Schneiderka, 2004).

Cholesterol ovlivňuje tekutost membrán. Zvýšení koncentrace cholesterolu v membráně zvyšuje tuhost membrány, což může narušovat funkci membránových proteinů v plazmě,

mitochondriích a endoplazmatickém retikulu (ER). Obsah cholesterolu v různých lipidových membránách je proto pevně stanoven. Například plazmatická membrána má relativně vysoký obsah cholesterolu, zatímco mitochondrie a ER mají obsah cholesterolu nízký (Ioannou et al., 2016).

Cholesterol také může regulovat funkci mnoha proteinů, a to buď přímo, nebo nepřímo skrze jeho působení na tekutost membrány. Mezi proteiny interagující s cholesterolem patří: ACAT („Acyl-CoAcholesterolacyltransferase“), která přijímá cholesterol jako substrát; proteiny, které potřebují prostředí bohaté na cholesterol, aby mohly správně interagovat s membránou; cytolysiny závislé na cholesterolu; proteiny se sterol vázajícími doménami SCAP („Cleavage-activating protein“); HMG-CoA reduktáza a mnoho dalších (Benito-Vicente et al., 2018).

Navzdory četným pozitivním efektům cholesterolu je jeho kumulace spojená s patogenezí mnoha nemocí, jako je např. ateroskleróza nebo ischemická choroba srdeční (Doleželová et al., 2019).



Obrázek č. 1 - Distribuce cholesterolu v organismu (Převzato z Potter et al., 2007)

2.1. Metabolismus cholesterolu

Metabolické cesty cholesterolu můžeme rozdělit na exogenní a endogenní. Exogenní metabolická cesta začíná perorálním příjmem tuku, poté nastává štěpení tuku v trávicím traktu

a jeho vstřebávání za účasti lipáz. Tyto lipázy mohou být žaludeční, pankreatické nebo střevní. Důležitou roli v tomto procesu má také žluč (Svačina et al., 2008). Hlavní funkci při metabolické přeměně lipidů má především lipoproteinová lipáza (LPL) a LCAT (Lecithin-cholesterolacyltransferáza). Snížení aktivity těchto enzymů nebo jejich nepoměr může vést ke kumulaci lipoproteinů (Brodanová et al., 1997).

Pro udržení hladiny cholesterolu je významný také enterohepatální oběh (Svačina et al., 2008). Neplatí zde ale přímá závislost mezi příjmem a resorpcí cholesterolu, i když míra resorbovaného cholesterolu na množství cholesterolu v potravě závisí (Koolman et al., 2012). TAG (triacylglycerol) a cholesterol přijaté v dietě vytvářejí po vstřebání chylomikrony. Chylomikrony obsahují z 90 % TAG, dále cholesterol, fosfolipidy a apolipoproteiny.

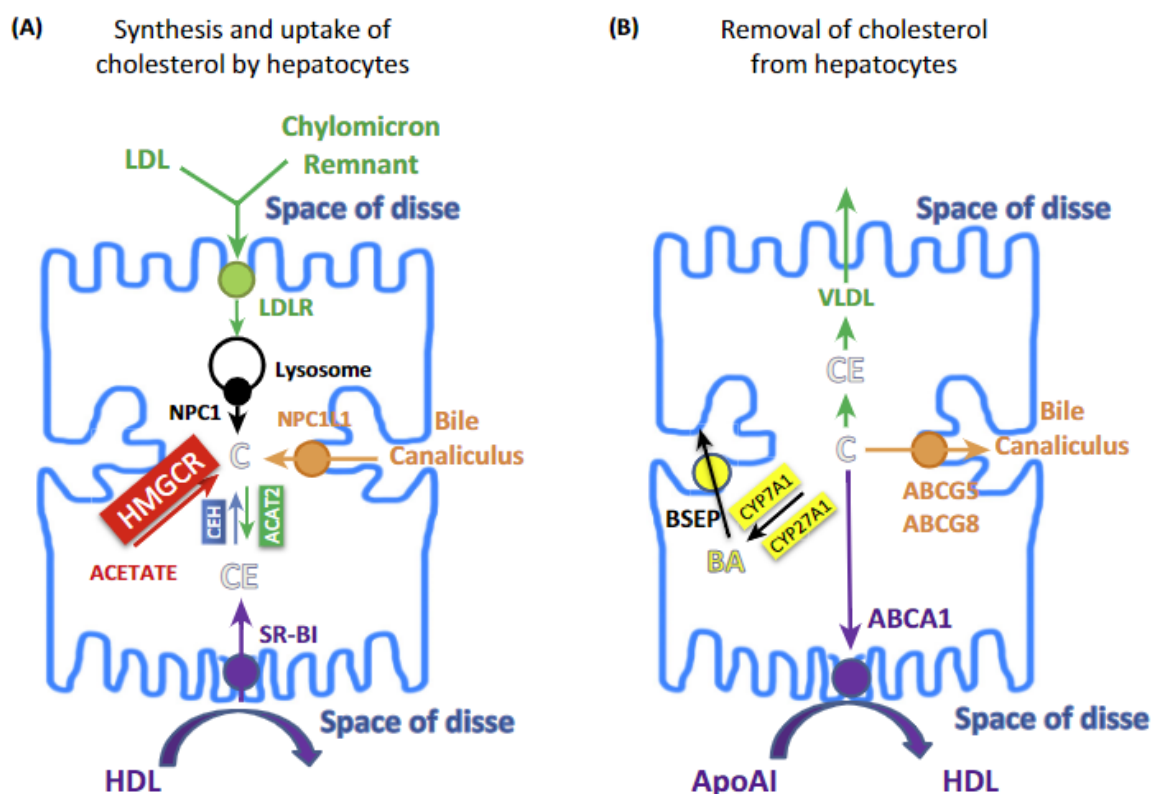
Endogenní metabolická cesta zahrnuje syntézu a odbourávání cholesterolu. Probíhá transport cholesterolu a TAG z jater na periferii a dále cholesterol jako HDL („High density lipoproteins“) cholesterol z tkání zpět do jater. Téměř $\frac{3}{4}$ cholesterolu z jater odchází ve formě LDL („Low density lipoproteins“) (Svačina et al., 2008).

2.1.1. Syntéza cholesterolu

Výchozí látkou pro syntézu cholesterolu je acetyl-CoA. Schopnost syntetizovat cholesterol mají téměř všechny tkáně, avšak většinu celkového tělesného cholesterolu produkují játra, ve kterých se syntetizuje až 90 % endogenního cholesterolu (Kasper et al., 2015; Benito-Vicente et al., 2018). Syntéza cholesterolu *de novo* je přísně regulovaný proces. Cholesterol vzniká postupně z lanosterolu po aerobním odbourání tří methylových skupin ve formě CO₂ a postupným přesunem dvojných vazeb ve steroidním skeletu (Lumbada et al., 2009). Limitujícím krokem při syntéze cholesterolu z acetyl-CoA je přeměna HMG-CoA na mevalonát za účasti HMG-CoA-reduktázy, jejíž aktivita je regulována hormony pomocí fosforylace/defosforylace v závislosti na cAMP (cyklický adenosinmonofosfát). Inzulin a hormony štítné žlázy její aktivitu zvyšují, glukagon a glukokortikoidy aktivitu snižují (Holeček et al., 2006). Tři molekuly acetyl-CoA dávají vzniknout jedné HMG-CoA, který přeměňuje HMG-CoA-reduktáza na mevalonát. Je to ireverzibilní reakce, která se dá inhibovat cholesterolem, proces probíhá v hladkém ER (Koolman et al., 2012; Kasper et al., 2015). Následuje přeměna mevalonátu na izopentenylidifosfát a spojení šesti C₅ molekul do jedné molekuly C₃₀ skvalenu. Nakonec dochází k cyklizaci skvalenu a odštěpením tří uhlíků vzniká cholesterol (Koolman et al., 2012). Ten je poté sekretován do cytoplazmy, kde může být distribuován nebo esterifikován pomocí ACAT a uložen ve formě esteru v lipidových

kapénkách (Benito-Vicente et al., 2018). Syntéza cholesterolu je složitý řetězec více než 20 chemických reakcí, který dokáží všechny buňky kromě bezjaderných erytrocytů (Lumbada et al., 2009).

Kromě syntézy *de novo* mohou buňky získávat cholesterol vychytáváním plazmatických lipoproteinů skrze LDL receptor. V plazmě jsou TAG ve VLDL („Very low density lipoproteins“) odstraněny pomocí LPL a produkují VLDL zbytky, které jsou známé pod názvem IDL („Intermediate density lipoproteins“). Další zpracování hepatickými lipázami společně s výměnou lipidů a apolipoproteinů s HDL vede k tvorbě LDL. LDL tvoří hlavně estery cholesterolu a ApoB-100. Dodávají cholesterol do periferních tkání, kde se váží na LDL receptor a jsou endocytovány v jamkách potažených klathrinem. Disociace LDL z LDL receptoru v endosomu je klíčový proces, který umožňuje recyklaci receptoru. LDL cholesterol je hydrolyzován v lysozomu, účinek lysozomální lipázy vede k uvolnění volného cholesterolu. Nakonec je volný cholesterol přenesen z lysozomů na ER působením NPC1/NPC2 („Niemann-Pick Type C“) (Obr. 2) (Benito-Vicente et al., 2018).



Obrázek č. 2 - Regulace cholesterolové homeostázy v hepatocytu (převzato z Ioannou et al., 2016)

Vzhledem k velkému toku cholesterolu v játrech a denním výkyvům v potravě je zavedeno vícero mechanismů k ochraně proti jeho nadměrné kumulaci v játrech. Mezi ně patří

esterifikace volného cholesterolu na inertnější, hydrofobní cholesterol pomocí ACAT2 pro skladování; vazba HMG-CoA reductázy (omezující enzym syntézy cholesterolu) na inzulinem indukovaný gen *INSIG-1 a INSIG-2*, které vedou k jeho všudypřítomnosti a degradaci; aktivace jaderných receptorů, jako je jaterní X receptor (LXR) a farnesoidní X receptor (FXR), které podporují metabolismus cholesterolu na žlučové kyseliny; retence SREBP2 (Ioannou et al., 2016).

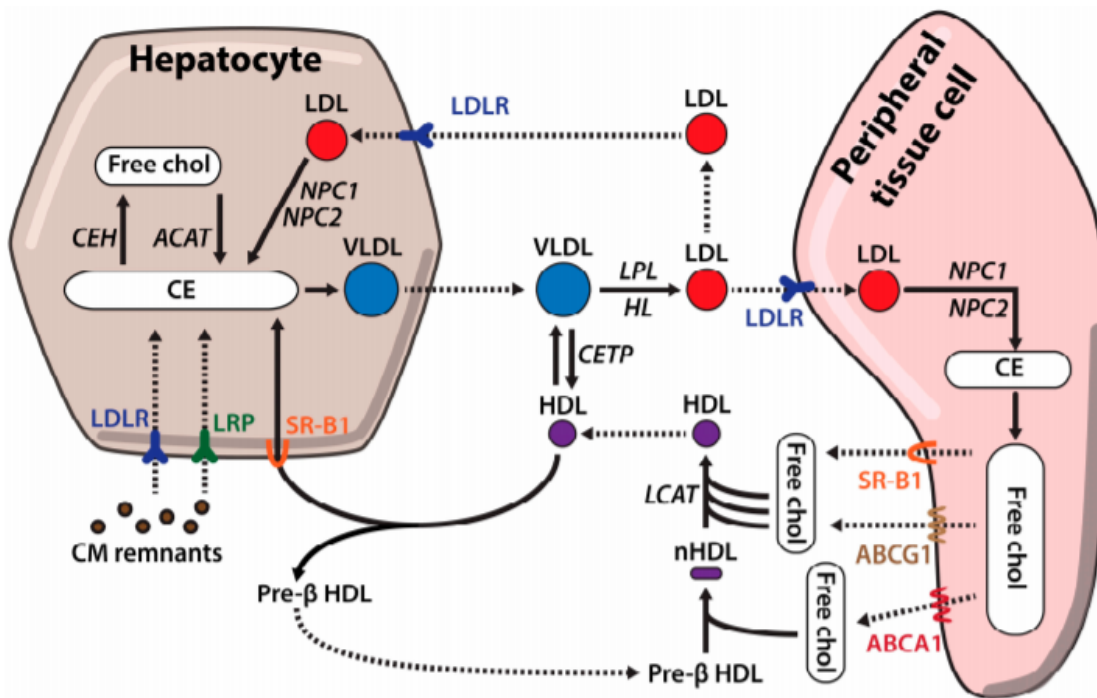
Hlavní regulátory hladiny cholesterolu v plazmě jsou SREBP („Sterol regulatory element-binding proteins“) a SCAP proteiny ER. V tomto případě hlavně SREBP2 (Holeček et al., 2006; Alphonse et al., 2016). Pro aktivaci systému se musí odštěpit část *SREBP*, která je přenesena do jádra buňky, kde reguluje expresi genů, která řídí tvorbu enzymů důležitých pro syntézu cholesterolu, počet receptorů na membránách a tvorbu specifického přenašeče ABCA1. Existuje více forem SREBP. SREBP-1 je exprimován v játrech a tukové tkáni a na jeho regulaci se podílí inzulin. Aktivita SREBP-2 je regulována hladinou cholesterolu v buňce. Aktivace SREBP-2 při poklesu cytosolové koncentrace cholesterolu vede ke zvýšenému počtu LDL receptorů a tvorbě enzymů pro syntézu cholesterolu. Zvýšená plazmatická koncentrace cholesterolu vede ke snížení LDL receptorů a inhibici syntézy cholesterolu (Holeček et al., 2006).

2.1.2. Transport cholesterolu v organismu

V plazmě je cholesterol transportován ve formě lipoproteinových částic (Lumbada et al., 2009). Důležitá jsou zde játra, protože jsou kromě střeva jediným orgánem schopným syntézy, sekrece a také odstraňování lipoproteinů (Brodanová et al., 1997; Benito-Vicente et al., 2018). Částice se skládají z hydrofóbního lipidového jádra (TAG, estery cholesterolu) a jsou obklopeny amfifilním obalem z fosfolipidů, volného cholesterolu a apoproteinů. Rozdělují se do tříd na základě hustoty. Čím vyšší je obsah lipidů, tím nižší je hustota částic (Lumbada et al., 2009). V procesu sestavování lipoproteinů je nezbytná aktivita MTTP („Microsomal triglyceride transfer protein,,), zároveň obsahují velké množství apolipoproteinů např. ApoA-I, ApoA-II, ApoA-V, ApoC-I, Apo-E atd., které jsou začleněny během biogeneze chylomikronů nebo z jiných cirkulujících lipoproteinů (Benito-Vicente et al., 2018). Nejnižší hustotu mají chylomikrony, syntetizované ve střevě. Transportují TAG do tkání a cholesterol do jater. VLDL se syntetizují ve střevě a játrech, resyntetizované TAG v játrech jsou do VLDL inkorporovány (Lumbada et al., 2009). Cholesterol je z jater vylučován začleněný ve VLDL, regulace jejich syntézy a sekrece je dobře koordinovaná, jsou rozhodující pro distribuci cholesterolu. Syntéza

VLDL probíhá ve dvou krocích, začíná translokací vznikajícího ApoB100 přes ER membránu hepatocytů a pomocí MTTP jsou zabudovány lipidy. Pokud není pro ApoB100 dostupné dostatečné množství lipidů, kvůli nízké koncentraci TAG nebo selhání procesu, je tento apolipoprotein degradován. Ve druhém kroku jsou VLDL částice transportovány ve vezikulách obsahujících COPII („Coat protein komplex II“) do Golgiho aparátu. V Golgiho aparátu opět probíhá zabudování lipidů a zároveň částice získají ApoA1 a ApoE. Zralé částice jsou vylučovány do krevního řečiště a transportují lipidy do periferních tkání. Zvýšená sekrece VLDL játry vede ke zvýšeným hladinám LDL v plazmě a kardiovaskulárnímu riziku, na druhou stranu narušená sekrece VLDL z jater vede k akumulaci lipidů v játrech, což může být počátečním krokem k jaternímu onemocnění (Benito-Vicente et al., 2018).

IDL vznikají z VLDL a jsou mezistupněm vzniku LDL, které jsou zodpovědné za transport cholesterolu do periferních tkání. V periferních tkáních je cholesterol vychytáván pomocí LDL receptorů (Sobolová, 2005; Benito-Vicente et al., 2018; Lumbada et al., 2009). Cholesterol se tak dostává do periferních tkání, kde se může ukládat do ateromových plátů. Lipoperoxidací nenasycených MK vznikají vysoce proaterogenní oxidované LDL s vysokou afinitou k makrofágům. Po záchytu oxidovaných LDL částic se mění na pěnové buňky s vysokým obsahem cholesterolu a mohou přispívat ke vzniku nestabilního ateromového plátu (Lumbada et al., 2009). Přebytečný cholesterol z tkání je odstraňován pomocí HDL (Benito-Vicente et al., 2018). Jediné lipoproteiny s vysokou hustotou mohou odstraňovat cholesterol ze subendotelových prostorů cév a označují se proto jako antiaterogenní. Vznikají v játrech a enterocytech (Lumbada et al., 2009). Volný cholesterol je přenesen do lipidově chudých pre- β HDL prostřednictvím ABCA1 („ATP-binding cassette subfamily A member 1“). Toto první plnění cholesterolem mění konformaci HDL a umožňuje interakci s ABCG1 („ATP-binding cassette subfamily G member 1“) a Sr-b1 („Scavenger receptor class B type 1“) transportéry, které spolu s LCAT produkují zralé HDL částice, které jsou transportovány zpět do jater a odstraněny (Obr. 3) (Benito-Vicente et al., 2018).



Obrázek č. 3 - Transport cholesterolu (Převzato z Benito-Vicente et al., 2018)

2.1.3. Absorpce cholesterolu

Cholesterol vstupující do lumen tenkého střeva, který je následně absorbován enterocyty, pochází ze tří hlavních zdrojů: dieta, žluč a odlupování střevního epitelu. Hlavními místy absorpce je duodenum a proximální jejunum. U zdravých lidí se absorbuje přibližně 50 % střevního cholesterolu (Alphonse et al., 2016). Člověk každý den zkonsumuje přibližně 300 mg cholesterolu a v lumen tenkého střeva dochází ke smíchání s přibližně 900 mg žlučového cholesterolu (Sobolová, 2005). Cholesterol konzumovaný v potravě může být ve formě volné i esterifikované, ale střevní sliznicí se reabsorbuje pouze volný cholesterol (Kasper et al., 2015).

V trávicím traktu jsou lipidy emulgovány účinkem ŽK a hydrolyzovány lipolytickými enzymy. Směs natrávených lipidů a ŽK vytváří v jejunu směsné micely o průměru 3-10 μm . Při styku s kartáčovým lemem enterocytů se micely rozpadají a dostávají se do bezprostřední blízkosti sliznice střeva (Lumbada et al., 2009). Absorpce přes membránu enterocytů je zprostředkována pomocí NPC1L1 („Niemann-Pick C1-like 1 protein“) receptorového mechanismu. NPC1L1 má v extracelulárním prostoru na N-koncové doméně vazebné místo pro cholesterol a pomocí C koncové domény je vázán na membránu (Benito-Vicente et al., 2018). Volný cholesterol je transportován do ER, odkud je buď transportován zpět do lumen střeva prostřednictvím ABCG5/8, které se nacházejí v proximální části tenkého střeva, nebo je v enterocytu reesterifikován za katalytického působení izoenzymu ACAT2 a hromadí se společně s resyntetizovanými TAG a fosfolipidy v cisternách ER. Reesterifikovaný cholesterol

může být uložen v lipidových kapénkách nebo sloučen spolu s TAG do apolipoproteinu B48 (ApoB48) za vzniku transportní lipoproteinových částic – chylomikronů, a také v menší míře VLDL (Lumbada et al., 2009; Benito-Vicente et al., 2018; Alphonse et al., 2016). Oba typy lipoproteinových částic jsou poté pomocí MTTP uvolňovány do lymfy a transportovány lymfatickým systémem (Lumbada et al., 2009). V krvi cirkulující chylomikrony mohou interagovat s lipoproteinovými lipázami (LPL) periferních tkání, především tukovou a svalovou tkání, kde jsou LDL („Low density lipoproteins“) hojně exprimovány. ApoC-II chylomikronů aktivuje LDL, což vede k hydrolýze TAG. Uvolněné volné MK efektivně absorbují adipocyty a svalové buňky přes transportéry mastných kyselin a CD36. Hydrolýza MK z chylomikronů vede ke vzniku menších částic obohacených o estery cholesterolu, které přenáší ApoA a ApoC na jiné lipoproteiny. Zbytky chylomikronů jsou odstraněny z plazmy játry (Benito-Vicente et al., 2018).

Absorpce cholesterolu také závisí na míře vyprazdňování žaludku a době průchodu tenkým střevem. Zvýšené vyprazdňování žaludku a krátká doba průchodu tenkým střevem zvyšují absorpci cholesterolu. Naopak potlačovat absorpci může snížená velikost a produkce zásob žlučových solí, snížená fosfolipidů a mucinu (zejména Mucin 1), zvýšený obsah cholesterolu ve žluči, hydrofilně-hydrofóbní index v zásobním množství ŽK a produkce biliárního cholesterolu. Lze očekávat, že takové potlačení absorpce povede ke zvýšení syntézy cholesterolu. Naopak při zvýšeném příjmu cholesterolu v potravě mechanismem „push-pull“ bude syntéza cholesterolu potlačována pomocí SREBP1 („Sterol regulatory element-binding protein 1“), také se bude zvyšovat jeho sekrece do žluči a syntéza žlučových kyselin z cholesterolu (Alphonse et al., 2016).

2.1.4. Eliminace cholesterolu

Pod pojmem endogenní metabolická cesta není zahrnuta jen syntéza, ale i odbourávání cholesterolu. Z oběhu do tkání se LDL částice dostávají pomocí receptorů pro ApoB-100, jen velmi malá část se odbourává jiným způsobem, a to tzv. scavengerovou cestou. Odbourávání cholesterolu touto cestou probíhá hlavně při nedostatku receptorů pro ApoB-100, např. při familiární hypercholesterolemii (Svačina et al., 2008).

Hlavní cesta pro eliminaci kumulovaného cholesterolu z organismu je přes biliární sekreci a přeměnu na ŽK. ŽK jsou zodpovědné za tvorbu žluči, důležité pro střevní a lipidovou homeostázu a také působí jako hormony při regulaci homeostázy glukózy a TAG. Syntéza ŽK z cholesterolu je katalyzována enzymem Cyp7a1 (Doleželová et al., 2019). Cholesterol může

být v játrech secernován do žluče nebo degradován na ŽK. V obou případech se významně podílí enterohepatální oběh, kde je cholesterol resorbován z tkání zpět, zejména do jater (Holeček et al., 2006). Za jeden den je odstraněn žlučí přibližně 1 g cholesterolu (Lumbada et al., 2009).

2.2. Enterohepatální oběh

Enterohepatální oběh je způsob recyklace cholesterolu (Holeček et al., 2006). Je to proces sekrece ŽK z jater do žluči, střeva a jejich následná reabsorpce (Lumbada et al., 2009). Enterohepatální cirkulace cholesterolu a ŽK je významná pro regulaci HMG-CoA-reduktázy a cholesterol-7 α -hydrolázy (Holeček et al., 2006). Cholesterol je transportován prostřednictvím CETP („Cholesterol ester transfer protein“) a HDL-lipoproteinů. HDL částice se tvoří v játrech, střevních buňkách a makrofázích. Zpětný transfer cholesterolu pochází především ze zanikajících buněk (Svačina et al., 2008). Enzym pro degradaci je cholesterol-7 α -hydroláza, jejíž aktivita je regulována v závislosti na poměru hladin cholesterolu a ŽK (Holeček et al., 2006).

Cholesterol syntetizovaný v játrech nebo ze stravy může být včleněn do VLDL nebo oxidován za vzniku ŽK, které se vylučují do žluči pomocí transportéru ABCB11 (Ahmad et al., 2019). Denně je vyloučeno přibližně 500-600 ml jaterní žluči (Floch et al., 2002). Žluč obsahuje konjugované ŽK a je uložena ve žlučníku. Po jídle dochází ke kontrakci žlučníku a uvolnění ŽK do dvanáctníku (Floch et al., 2002; Davis et al., 2002). Zde ŽK pomáhají v trávení lipidů a vitamínů rozpustných v tucích (Floch et al., 2002; Vaz et al., 2017) Hlavním místem absorpce je terminální ileum. V duodenu je absorpce pasivní, zatímco hlavní část absorpce probíhá přes kartáčový lem ilea na sodíku závislým sekundárně aktivním transportem. Intracelulární transport probíhá přes cytosolové a mikrozomální proteiny. Všechny absorbované ŽK, což je asi 95 %, přecházejí do portální cirkulace. Jaterní buňky přijmou ŽK, a ty jsou znovu připravené na vyloučení. Malé množství ŽK unikne absorpcí v ileu a projde do tlustého střeva, kde je vyloučeno stolicí. Ztráty stolicí nahrazuje syntéza *de novo*. Enterohepatální oběh probíhá 4 až 12krát denně a snaží se o minimalizaci ztrát ŽK (Floch et al., 2002; Vaz et al., 2017; Davis et al., 2002).

3. Jaterní steatóza

Jaterní steatóza, jinak také tuková játra či ztukovatění jater, je kumulace tuků v hepatocytech v podobě kapének, a to především TAG a cholesterolu. Steatóza je nejčastější jaterní chorobou a bývá průvodním jevem metabolického syndromu a nadměrného příjmu alkoholu (Drábek et al., 2012; Brodanová et al., 1997; Horák et al., 2014). V civilizovaných zemích je hlavní příčinou jaterní steatózy přejídání. Často se objevuje u diabetiků, zejména u DM typu II spojeného s obezitou a hyperlipoproteinémií (Brodanová et al., 1997).

Normální obsah tuků v játrech je nízký, pohybuje se okolo 4-8 % a jde především o esenciální strukturální lipidy. Při steatóze se obsah tuků zvyšuje na 10-15 % a může překročit i 50 % (Brodanová et al., 1997). Pokud je poškozeno do 33 % hepatocytů, jedná se o lehkou steatózu, při středně těžké je poškozeno 33-66 % hepatocytů a při těžké je poškozeno více než 66 % hepatocytů kumulovanými lipidy (Hůlek et al., 2015). Z morfologického hlediska rozeznáváme steatózu makrovezikulární a méně častou mikrovezikulární. U makrovezikulární je v hepatocytu přítomna jedna vezikula tuku, která vytlačuje jádro na periferii buňky. U mikrovezikulární je v hepatocytu typicky přítomno několik menších vezikul. Hlavními příčinami makrovezikulární steatózy je obezita, DM a etylické poškození jater. Mikrovezikulární steatóza bývá způsobena peroxisomovými chorobami, jako je Reyův syndrom. Toto rozdělení však není absolutní. Při výskytu obou typů u jednoho pacienta hovoříme o steatóze smíšené. Steatóza se může vyskytnout i při toxickém poškození jater, hladovění nebo hyperlipidémii (Horák et al., 2014).

Pro onemocnění spojené s kumulací tuků v játrech, bez prokázané nadměrné konzumace alkoholu, se užívá termín NAFLD („Non alcoholic fatty liver disease“). NAFLD je považována za jednu z příčin cirhózy jater (Drábek et al., 2012; Brodanová et al., 1997).

Prostá jaterní steatóza je zcela reverzibilní a je výsledkem změněného metabolismu lipidů. K rozvoji fibrotických a nekrotických změn je nutná spoluúčast dalších složek - zánětlivých toxických či virových (Brodanová et al., 1997). Prostou jaterní steatózu neléčíme. Postačí správně léčit jednotlivé složky metabolického syndromu (Hůlek et al., 2015).

3.1. „Non – alcoholic fatty liver disease“ (NAFLD)

NAFLD je chronické onemocnění jater, které se vyznačuje nadměrným ukládáním lipidů v hepatocytech (jaterní steatóza), ale bez přítomnosti významného množství alkoholu, virové hepatitidy nebo jiného onemocnění jater (Ioannou et al., 2016).

Pod pojmem NAFLD jsou zahrnuta různá stadia tohoto onemocnění - prostá jaterní steatóza, nealkoholová steatohepatitida a jaterní cirhóza, která se může vyvinout až v hepatocelulární karcinom (Drábek et al., 2012; Hůlek et al., 2015). Pojmem nealkoholová je myšleno, že pacient nepije alkohol vůbec nebo jen velmi málo (maximálně do 20 g čistého alkoholu za den). Je ovšem nutné si uvědomit, že řada nemocných skutečně množství vypitého alkoholu nepřizná. Také vlivem individuálních rozdílů každého jedince vůči toxickému vlivu alkoholu může být dávka 20 g/den pro řadu lidí již dávkou poškozující játra (Hůlek et al., 2015).

NAFLD postihuje 30 % dospělé populace a 70-80 % diabetiků a obézních pacientů (Příbramská et al., 2008; Lazo et al., 2011). Onemocnění postihuje častěji muže ve věku 40-60 let (Drábek et al., 2012). Incidence tohoto onemocnění celosvětově velmi rychle stoupá, a to kvůli rostoucímu výskytu obezity a s tím spojených komplikací jako je DM typu II a inzulinová rezistence (Ioannou et al., 2016; Lazo et al., 2011). Jelikož onemocnění souvisí s metabolickým syndromem, je doprovázeno i jeho dalšími projevy, jako je centrální typ obezity, porucha glukózové tolerance, dyslipidémie a arteriální hypertenze. Ne vždy však musí být tyto příznaky přítomny (Drábek et al., 2012).

Populační studie v USA prokázaly jen mírně zvýšenou mortalitu u pacientů s NAFLD oproti běžné populaci. Není ale stále zcela jasné, kteří z pacientů jsou ohroženi progresí prosté steatózy v NASH, eventuálně až v jaterní cirhózu. Jediným prokázaným rizikovým faktorem predikujícím riziko jaterní cirhózy je přítomnost zánětu v jaterní biopsii při stanovení diagnózy a věk pacienta (Drábek et al., 2012; Promrat et al., 2010; Chalasani et al., 2009). Nacházíme stále více důkazů spojujících změnu homeostázy cholesterolu a kumulaci volného hepatického cholesterolu s patogenezí NASH. V průzkumu zdravotního stavu a výživy populace předpovídala vyšší spotřeba cholesterolu v dietě i vyšší riziko cirhózy. Zvýšená hladina cholesterolu je tedy spojována s vyšším rizikem a závažností NAFLD. U pacientů trpících NAFLD došlo paralelně s kumulací hepatického cholesterolu k vývoji NASH a fibrózy. Experimentálně indukovaná kumulace hepatického cholesterolu podporovala steatohepatitidu a fibrózu, zatímco korekce přetížení jaterním cholesterolem vedla ke zmírnění závažnosti onemocnění jater (Musso et al., 2013).

Podrobnějším vyšetřením genů spojených s metabolismem MK u pacientů s NAFLD bylo zjištěno, že i přes zvýšené vychytávání volných MK a intracelulární kumulace volných MK a TAG byla zvýšena exprese proteinu-1c vázajícího se na *SREBP-1c* („Sterol regulatory element-binding protein 1“). *SREBP-1c* je klíčový pozitivní regulátor syntézy MK. Exprese AMP - aktivované proteinkinázy (AMPK), negativního regulátoru syntézy MK, je naopak snížena. To vede k aktivaci oxidace MK, produkci reaktivního kyslíku, syntéze fosfolipidů

a TAG. Tento jev může být způsoben zvýšeným obsahem viscerálního tuku a inzulinovou rezistencí, protože exprese *SREBP-1c* a AMPK je ovlivněna adipocytokiny, inzulinovou signalizací a koncentrací glukózy. Aktivita SREBP produkovaného v ER je také posttranskripčně regulována hladinami intracelulárního cholesterolu. Když je hladina cholesterolu v ER příliš nízká, jsou SREBP proteiny v Golgiho aparátu proteolyticky zpracovány do aktivních fragmentů, které mohou vstoupit do jádra a působit jako transkripční faktory. Když jsou intracelulární hladiny cholesterolu dostatečné, je SREBP udržovaný inzulinem indukovanými geny v ER a produkce aktivních SREBP fragmentů je inhibována (Nakamura et al., 2009, Kohjima et al., 2008).

3.1.1. Diagnostika NAFLD

Pro stanovení diagnózy NAFLD se ve většině případů provádí pouze ultrazvukové vyšetření.

Ovšem novým výzkumem bylo zjištěno, že mikroRNAs (miR-21), což jsou nekódující RNA představující důležité regulátory řady homeostatických procesů, metabolických drah, buněčného stresu, imunitní obrany a zánětu, regulují i metabolismus TAG a cholesterolu u *in vitro* i *in vivo* NAFLD modelu skrze inhibici exprese HMGCR („Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A reductase“). Data z této studie potvrzují, že je miR-21 u pacientů s NAFLD snižena, mohl by proto být v budoucnu užitečným biomarkerem pro diagnostiku a léčbu NAFLD (Sun et al., 2015).

3.1.2. Etiopatogeneze NAFLD

Klíčovou rolí v rozvoji onemocnění hraje inzulinová rezistence. Postupně dochází k hromadění TAG v játrech, k zánětlivým a nekrotickým změnám a v různé míře i k fibrogenézi jaterní tkáně (Drábek et al., 2012). U NAFLD byla zdokumentována rozsáhlá dysregulace homeostázy jaterního cholesterolu, vedoucí ke zvýšení hladiny jaterního cholesterolu.

K dysregulaci dochází pravděpodobně z různých příčin, jako např. zvýšená hydrolýza esterů cholesterolu na volný cholesterol za účasti nCEH („Neutral cholesterol ester hydrolase homolog“), zvýšená syntéza cholesterolu v játrech související se zvýšenou expresí a aktivitou (defosforylací) HMGCR, zvýšené hladiny aktivního SREBP2 v játrech, zvýšený příjem lipoproteinů bohatých na cholesterol a snížené vylučování žlučí (Ioannou et al., 2016)

Hlavními zdroji TAG jsou volné MK obsažené v tukové tkáni a MK syntetizované *de novo* lipogenezí. Důvody hromadění TAG v játrech je hlavně zvýšená nabídka volných MK z tukové tkáně, snížený odsun MK z jater a porušená beta-oxidace MK. Na regulaci těchto dějů se podílejí hormony tukové tkáně, zejména adiponectin, leptin a resistin. Zatím není zcela jasné, jaké faktory určují přítomnost a rozsah nekrotických a zánětlivých změn v játrech. Na patogenezi se s největší pravděpodobností podílí nadbytek volných kyslíkových radikálů a zvýšené množství železa v játrech. Fibrogenese je podmíněna aktivací jaterních hvězdicových buněk (HSC) v Disseho prostorech jater a jaterních progenitorových buněk. Fibróza se většinou objevuje v perisinusoidální zóně (Drábek et al., 2012, Zagorová et al., 2015).

3.2. Nealkoholová steatohepatitida (NASH)

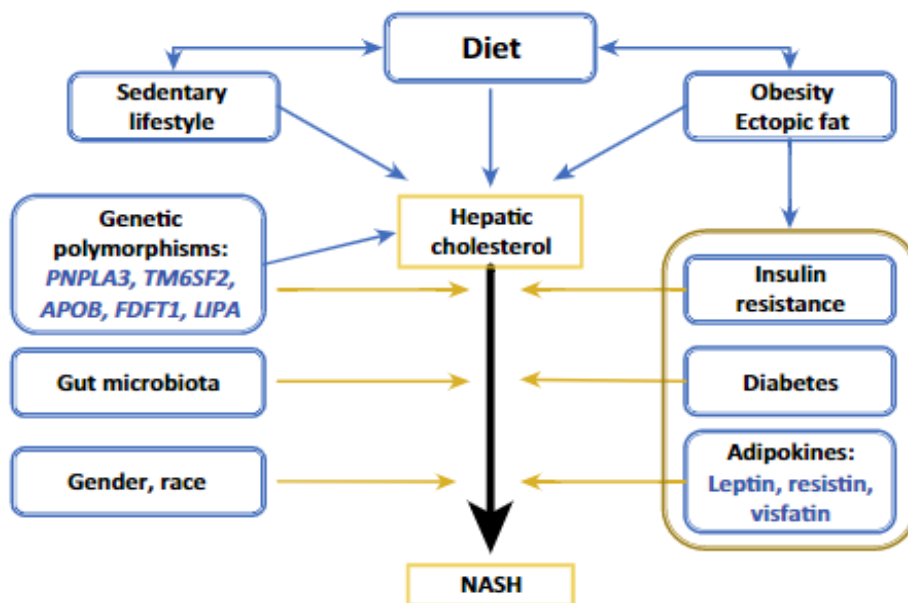
NASH je klinický syndrom, který je kombinací steatózy, zánětlivé infiltrace jater a nekrózy (Zavoral et al., 2007; Příbramská et al., 2008). Přibližně u 10-30 % pacientů se z NAFLD vyvíjí NASH (Ioannou et al., 2016). O NASH hovoříme v případě, že pacient konzumuje méně než 20 g alkoholu denně (Horák et al., 2014). Histologický nález je podobný nálezu u alkoholické hepatitidy objevuje se tedy steatóza, smíšená lobulární zánětlivá infiltrace, balonová degenerace hepatocytů a fibróza, Malloryho hyalin (Zavoral et al., 2007). NASH má také rysy inzulínové rezistence, pozorujeme tedy zvýšenou tvorbu VLDL a vysoký obrat TAG v játrech. Dále dochází k nedostatečné β -oxidaci volných MK v jaterních mitochondriích, což přispívá k lipoperoxidaci, mitochondriální dysfunkci a zvýšené tvorbě cytokinů. Je zvýšena produkce leptinu, TNF- α („Tumor necrosis factor α “) a resistinu, a naopak snížena tvorba adiponektinu (Příbramská et al., 2008). Je to způsobeno hlavně vlivem zvýšené kumulace tuků v játrech a předpokládá se také zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku, tedy vliv oxidačního stresu a peroxidace lipidů v játrech a s tím spojené poškození hepatocytů (Obr. 4) (Zavoral et al., 2007; Horák et al., 2014; Příbramská et al., 2008). Také je možná účast endotoxinu a cytokiny zprostředkovaných reakcí (Zavoral et al., 2007; Horák et al., 2014). Chronický zánětlivý proces navodí tvorbu cytokinů, chemokinů a dalších signálních molekul, což vede k aktivaci HSC bohatých na tuk a k jejich transformaci na myofibroblasty, které jsou zodpovědné za nadměrnou produkci extracelulární matrix, fibrogenezi a fibrózu. Rozdíly mezi skupinou pacientů postižených těžkou formou steatohepatitidy a skupinou s rozvíjející se fibrózou spočívá pravděpodobně v rozdílné nadměrné genové expresi. U steatohepatitidy jsou to prozánětlivé a proapoptózní geny, kdežto u fibrózy se uplatňují geny podporující tvorbu kolagenu. Někteří autoři považují mitochondriální lézi za primární příčinu porušené oxidace

MK a následné kumulace TAG v jaterním parenchymu, která vede ke vzniku centrální inzulínové rezistence (Příbramská et al., 2008; Brodanová, 2007; Trunečka, 2007). Steatohepatitida se vyznačuje tendencí k tvorbě vaziva a až ve 20 % případů se vyvíjí v jaterní cirhózu a hepatocelulární karcinom (Zavoral et al., 2007; Horák et al., 2014).

Příznaky NASH bývají spíše nespecifické, jako je únava, tlaky až bolest v pravém podžebří, hepatomegalie (Zavoral et al., 2007).

Faktor odpovědný za rozvoj zánětu a fibrózy zůstává nejasný. Většina odborníků předpokládá multifaktoriální model patogeneze NASH. Pravděpodobně se uplatňuje jaterní lipotoxicita, tedy expozice nebo akumulace určitého lipidového druhu v jaterních buňkách, což může přímo způsobit buněčnou toxicitu, působit prozánětlivě nebo profibroticky. Dle této hypotézy se tedy NASH vyvíjí při expozici jater lipotoxickými lipidy, zatímco steatóza se vyvíjí jako reakce na skladování nelipotoxických lipidů. Za potenciálně lipotoxické jsou považovány cholesterol, volné MK a jejich deriváty, diacylglycerol nebo ceramidy. Tyto molekuly mohou působit v jedné nebo více jaterních buňkách, např. v hepatocytech, Kupfferových buňkách, HSC a sinusových endotelových buňkách. Tyto lipidy také ovlivňují funkci subcelulárních organel, jako jsou mitochondrie nebo ER a mohou inhibovat inzulínovou signalizaci, apoptózu nebo narušit funkci membrány (Ioannou et al., 2016).

U NASH byla zjištěna zvýšená intrahepatální exprese ENG, převážně lokalizovaná na sinusových endotelových buňkách a HSC. Hladina intrahepatálního ENG významně koreluje s přítomností fibrózy. Vzhledem k tomu, že sinusové endotelové buňky a HSC jsou hlavním zdrojem proteinů ECM při jaterním poškození, je možné se domnívat, že zvýšená exprese ENG na těchto buňkách by mohla zvýšit buněčnou odezvu na TGF- β , což je nejvíce profibrogenní cytokin. Toto by mohlo vyvolat fibrogenezi s potenciálním rizikem progresu do cirhózy (Garcia-Monzón et al., 2000; Kenneth et al., 2012).



Obrázek č. 4 - Rizikové faktory NASH (Převzato z Ioannou et al., 2016)

3.2.1. Diagnostika NASH

Pro diagnózu NASH se může použít jaterní biopsie. Patolog ve vzorku jaterní tkáně hodnotí stupeň steatózy, aktivitu zánětu a fibrózu, tedy S.A.F. skóre. Biopsii řada nemocných odmítá, proto jsou lékaři často nuceni provádět vyšetření sérových markerů jaterního zánětu a fibrózy metodou elastografie. Interpretace sérových markerů ale není jednoduchá, proto se dnes používá spíše metoda měření elasticity jaterní tkáně. Je neinvazivní a poměrně přesná, což prokázala i řada studií, které elastografii porovnávaly s biopsií. Snížená elasticita jater je odrazem tvorby vaziva v játrech, finálního produktu zánětu. Koreluje s velikostí portálního tlaku (Hůlek et al., 2015). V laboratorním nálezu je obvykle jen mírně zvýšena aktivita aminotransferáz, vyšší u ALT než AST, tedy přesně opačně než u alkoholové nemoci jater. Dále bývá zvýšena aktivita alkalické fosfatázy. Na ultrasonografii je viditelný difuzní obraz velkých „světých jater“. Bioptické ověření už tedy ve většině případů není nutné (Zavoral et al., 2007).

3.2.2. Léčba NASH

Léčba je většinou zaměřena pouze na úpravu životního stylu, u obézních pacientů především zaměřena na pozvolnou redukci hmotnosti a fyzickou aktivitu s dostatečným příjmem bílkovin (Zavoral et al., 2007; Hůlek et al., 2015). Je nutná úprava nutričních poruch, jako je bílkovinná karence, vysoký přísun cukrů a nedostatek cholinu u parenterální výživy (Zavoral et al., 2007). Mezi všeobecná doporučení patří užívání vitamínu E (ne však

u diabetiků), či užívání ursodeoxycholové kyseliny. Také byla prokázána účinnost léčby liraglutidem a remogliflozinem u diabetiků. Užíváním těchto látek však došlo vždy ke snížení hmotnosti nemocných, a proto je otázkou, zda zlepšení jaterních nálezů nebylo spíše způsobeno snížením hmotnosti než samotnými léčivy (Hůlek et al., 2015).

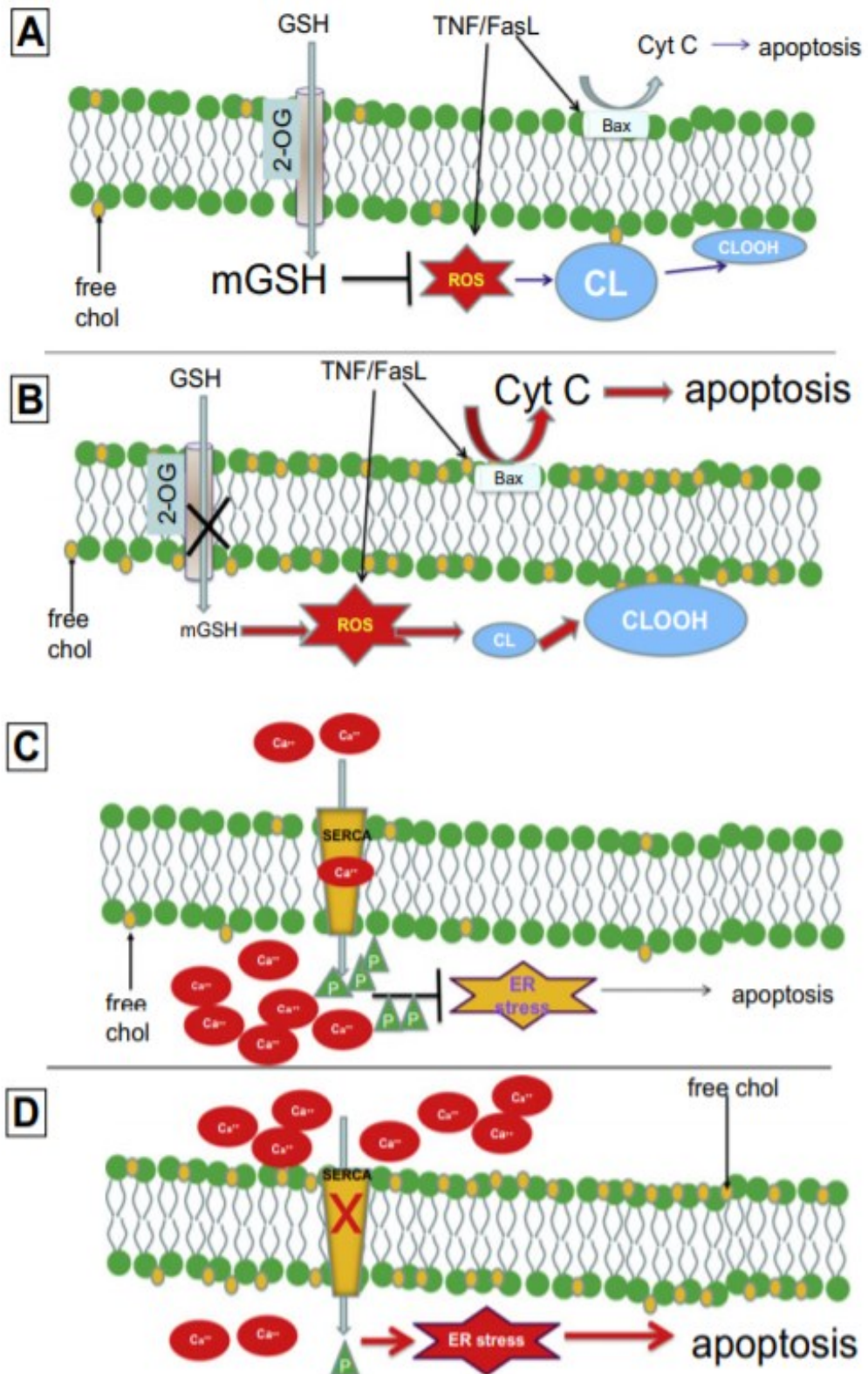
3.2.3. NASH a cholesterol

Podobně jako je tomu u aterosklerózy, kde infiltrující makrofágy a fibroblasty endotelu cév podporují tvorbu aterosklerotických plaků, v jaterních hepatocytech jsou klíčové mediátory poškození a vzniku NASH makrofágy, Kupfferovy buňky (KC) a HSC. Změněný metabolismus cholesterolu má na každou z těchto buněk několik toxických účinků a tím pomocí různých mechanismů podporuje vznik NASH (Musso et al., 2013). Díky velkému rigidnímu jádru ovlivňuje molekula cholesterolu organizaci a fyzikální vlastnosti membrány. Uspořádání lipidů v membránové dvojvrstvě je klíčové pro její propustnost a tekutost, je proto důležité udržovat fyziologický poměr mezi cholesterolem a fosfolipidy v buněčných membránách. Když poměr cholesterol - fosfolipid stoupá nad fyziologickou hladinu, domény tekutých krystalů mohou začít ztrácet tekutost, a to nepříznivě ovlivňuje integrální membránové proteiny s vícenásobným překlenutím domény (Musso et al., 2013). Různé buněčné organely mají odlišný a přísně regulovaný obsah cholesterolu a složení lipidů. Plazmatická membrána má vysokou koncentraci cholesterolu, ER a mitochondrie mají obsah cholesterolu o hodně nižší (3 – 5 % z celkového buněčného cholesterolu) a jsou vysoce citlivé na ztrátu tekutosti membrány vyvolané zvýšením obsahu cholesterolu. 2-Oxoglutarát je mitochondriální transmembránový proteinový přenašeč, který transportuje glutathion (GSH) syntetizovaný *de novo* v cytosolu do mitochondrie. Neporušené mitochondriální GSH (mGSH) zásoby jsou nezbytné pro kontrolu generování reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) stimulací receptorů buněčné smrti, jako je TNF- α a Fas ligand. 2-Oxoglutarátový nosič je zvláště citlivý na změny v obsahu cholesterolu mitochondriální membrány a na její tekutost, mitochondriální zatížení cholesterolem zhoršuje transport GSH, vyčerpává zásoby mGSH a podporuje tvorbu mitochondriálních ROS a peroxidaci lipidů. Funkčními důsledky jsou senzibilizace hepatocytů k TNF- α , permeabilizace mitochondriální membrány, uvolnění cytochromu c, nekróza hepatocytů a apoptóza, což podporuje jaterní zánět a NASH (Obr. 5) (Musso et al., 2013). Hepatický cholesterol je považován za hlavní lipotoxickou molekulu v rozvoji NASH (Ioannou et al., 2016). I minimální zvýšení obsahu membránového cholesterolu v ER může narušit aktivitu SERCA (sarkoendoplazmatické retikulum Ca^{2+} -ATPáza), kdy normálně vysoká

koncentrace intra-ER Ca^{2+} klesá, a to způsobuje poškození ER a může vyvolat ER stres. Tento ER stres se podílí na vývoji inzulinové rezistence, není však zatím potvrzené, zda je tento stres zapojen v patogenezi NASH (Ioannou et al., 2016).

Cholesterolem indukovaná aktivace makrofágů je významnou součástí zánětu, který charakterizuje aterosklerózu. Je předpoklad, že KC jsou aktivovány cholesterolem, a to může přispívat ke chronickému zánětu u NASH. Aktivace KC indukovaná cholesterolem by mohla prostřednictvím uvolnění zánětlivých cytokinů, vyvolat aktivaci HSC. Důkazy však naznačují, že jsou HSC kumulací cholesterolu přímo aktivovány, je to pravděpodobně způsobeno dráhou podobnou Toll-like receptoru (TLR-4). Delece ACAT1, který je exprimován zejména v HSC, vedla ke zvýšené kumulaci cholesterolu v HSC a zvýšené fibróze bez přímého ovlivnění hepatocytů nebo KC (Ioannou et al., 2016).

Byla prováděna studie, naznačující zvýšenou expresi HMG-CoA reductázy u jedinců s NAFLD ve srovnání s kontrolními subjekty. Dále byla zjištěna významná pozitivní korelace mezi jaterním HMGCR a obsahem volného cholesterolu. Došlo i ke zvýšené expresi jaderného SREBP-2, což může odpovídat za zvýšenou expresi HMGCR a miR-34a, který je nadměrně exprimován při NASH a je spojen se sníženou expresí Sirt-1 („Sirtuin 1“) a zvýšenou aktivitou HMGCR. Naznačuje to, že nadměrná exprese miR-34a může přispívat k celkové dysregulaci aktivity HMGCR u pacientů s NASH. Důsledky těchto změn exprese byly funkčně podporovány zvýšením poměru desmosterol/sitosterol v séru, což opět ukazuje na zvýšenou syntézu cholesterolu v játrech u NASH (Kerr et al., 2012).



Obrázek č. 5 - Mechanismus membránové toxicity cholesterolu v hepatocyty (Převzato z Musso et al., 2013)

4. Endoglin

Endoglin (ENG), také nazýván CD 105 nebo receptor typu III pro transformující růstový faktor β (TGF β receptor III), je homodimerický transmembránový glykoprotein, také známý jako hypoxii vyvolávající glykoprotein (Cheifetz et al., 1992; Albert et al., 2001; Meurer et al., 2014). ENG má regulační roli v několika TGF- β signalizačních kaskádách. Vysoce se projevuje při proliferaci vaskulárních endotelových buněk (EC) a byl identifikován jako doplňkový receptor pro TGF- β (López-Novoa et al., 2010; Albert et al., 2001).

Vyskytuje se především v endotelových buňkách kapilár, žil, tepen a v kontraktilních buňkách, jako jsou buňky hladkého svalstva cév (Jerkic et al., 2004). Jeho přítomnost byla také zjištěna v makrofázích, stromálních buňkách kostní dřeně, syncytiotrofoblastech placenty, jaterních hvězdicových buňkách nebo srdečních fibroblastech (Meurer et al., 2011; Oujo et al., 2013).

Prvotně byl ENG identifikován před 25 lety imunofluorescenčním barvením cévního endotelu monoklonální protilátkou (mAb 44G4), která byla vytvořena proti lidské buněčné linii pre-B leukemie (Meurer et al., 2014). Pomocí metody Southern blot byl lidský gen ENG lokalizován na dlouhém rameni lidského chromozomu 9 (9q34 \rightarrow qter), je dlouhý 40 kb a složený z 15 exonů (Meurer et al., 2014; Fernandez-Ruiz et al., 1993). Mutace genu ENG, které se dědí autozomálně dominantně, mohou vést k řadě onemocnění (např. hereditární hemorhagické telangiektázii, ateroskleróze, nádorům), což dokazuje jeho klinickou významnost (Meurer et al., 2011; Oujo et al., 2013). ENG homology byly identifikovány u myši a prasat. Aminokyselinové sekvence těchto homologů byly z více než 70 % identické s lidským ENG a více než 80 % homologní s β -glykanem (St-Jacques et al., 1994; Altschul et al., 1997).

4.1. Struktura endoglinu

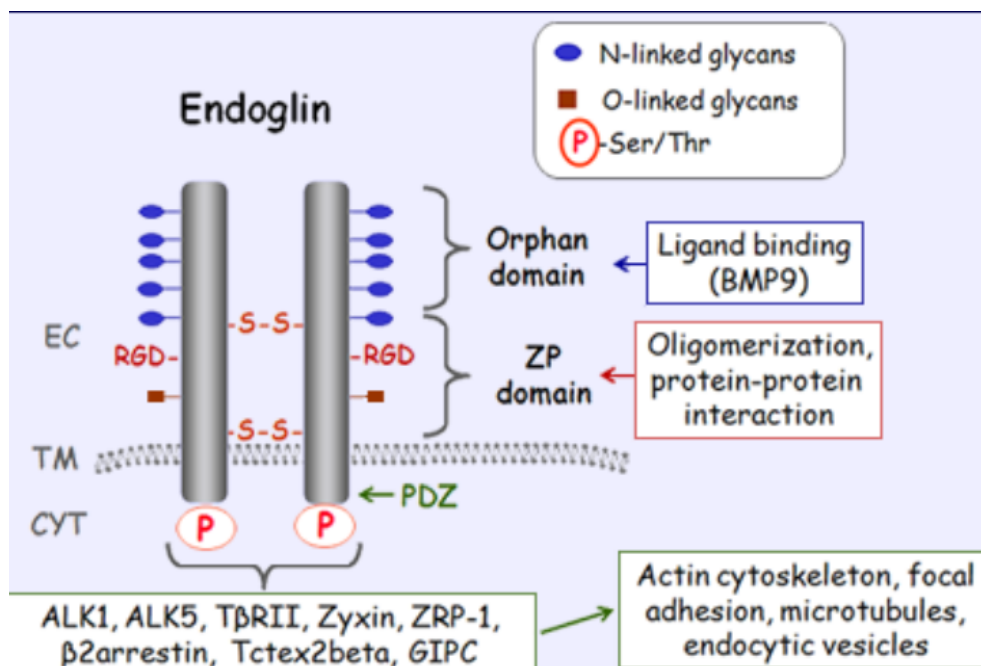
ENG je homodimer složený ze dvou podjednotek o hmotnosti 95 kDa, které jsou spojeny disulfidickými můstky (Gougos et al., 1988). Je to integrální membránový protein, který obsahuje 633 aminokyselinových zbytků (AMK) (Nassiri et al., 2011).

ENG obsahuje tři domény: velkou extracelulární, hydrofobní transmembránovou a krátkou intracelulární doménu. Intracelulární doména je složená ze 47 AMK zbytků a zahrnuje několik serinových a threoninových zbytků, přičemž některé z nich jsou místy, kde se odehrává fosforylace (García-Pozo et al., 2008; Young-Saeng et al., 2014; Lopez-Nova et al., 2012). Extracelulární oblast tvoří největší část ENG a zahrnuje dvě odlišné domény, a to juxtamembránovou doménu, která u lidí zahrnuje Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptid, známý jako

místo rozpoznávající mnoho adhezivních proteinů přítomných v extracelulární matici a účastní se interakcí založených na integrinu (Young-Saeng et al., 2014; Lastres et al., 1992). Primární struktura ENG naznačuje, že existuje pět N-glykosylačních míst v NH₂-koncové doméně a jedna O-glykanová doména (López-Novoa et al., 2010). Druhá sirotčí extracelulární doména („Orphan domain“) se podílí na vazbě BMP9 („Bone morphogenic proteins“), člena TGF- β podrodiny (Obr. 6) (Lopez-Nova et al., 2012).

ENG patří do rodiny extracelulárních proteinů *zona pellucida* (ZP) (López-Novoa et al., 2010; Cheifetz et al., 1992). ZP doménu tvoří přibližně 260 AMK s 8 zachovanými cysteinovými zbytky v blízkosti transmembránové oblasti (García-Pozo et al., 2008). Tato doména je lokalizována mezi Lys362-Asp561 (Meurer et al., 2014). Společné charakteristiky proteinů rodiny ZP jsou:

- schopnost vytvořit rozpustnou formu
- membránové proteiny s hydrofobní oblastí na C-koncové doméně
- silně glykosylované
- jsou vysoce vyjádřené v tkáních, ve kterých se vyskytují (Meurer et al., 2014).



Obrázek č. 6 - Struktura endoglinu (Převzato z Lopez-Nova et al., 2012)

4.2. Funkce endoglinu

ENG je jedním ze dvou typů TGF- β receptorů/koreceptorů typu III a je schopen interagovat s TGF- β receptory I a II, které vykazují serin-treonin kinázovou aktivitu. Sám ENG

vnitřní kinázovou aktivitu nemá (Lastres et al., 1994; Nachtigal et al., 2012; Lastres et al., 1994). Druhý z receptorů se nazývá betaglykan, který na rozdíl od ENG není vytvářen ve velkých cévách (López-Novoa et al., 2010; Lebrin et al., 2005) Oba receptory vykazují vysokou míru podobnosti, a to zejména v intracelulární doméně. Tato oblast má důležitou funkci i přesto, že postrádá enzymatickou aktivitu. Oba receptory mají doplňkové/modulační funkce (Meurer et al., 2014).

ENG má také schopnost ovlivňovat interakce mezi TGF- β RI a TGF- β RII, proto může jeho dysfunkce vést k různým chorobám, které vznikají na základě nekontrolované TGF- β signalizace (Pérez-gómez et al., 2010).

TGF- β je multifunkční cytokin, který se podílí na regulaci proliferace, diferenciaci a migrace EC. U savců nacházíme tři izoformy TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3. ENG ve spojení s TGF- β receptory I a II (TGF- β RI a TGF- β RII) může vázat TGF- β 1 a TGF- β 3 s vysokou afinitou, není ale schopen vázat β 2 isoformu (Lastres et al., 1994; Bordeau et al., 2001). Může vázat i některé další členy z TGF- β podrodiny zahrnující activin-A, BMP-2, BMP-7 a BMP-9. ENG schopen navázat jedině BMP-9 bez přítomnosti signálních receptorů (typu I a II) (Lopez-Nova et al., 2012). BMP-9 je exprimován nejčastěji v HSC, účinkuje na inhibici migrace a proliferace EC *in vitro*, a také inhibici neoangiogeneze *in vitro* (López-Novoa et al., 2010; Bi et al., 2014). Předpokládá se, že je schopný regulovat, a také indukovat fibrogenzi (Bi et al., 2014).

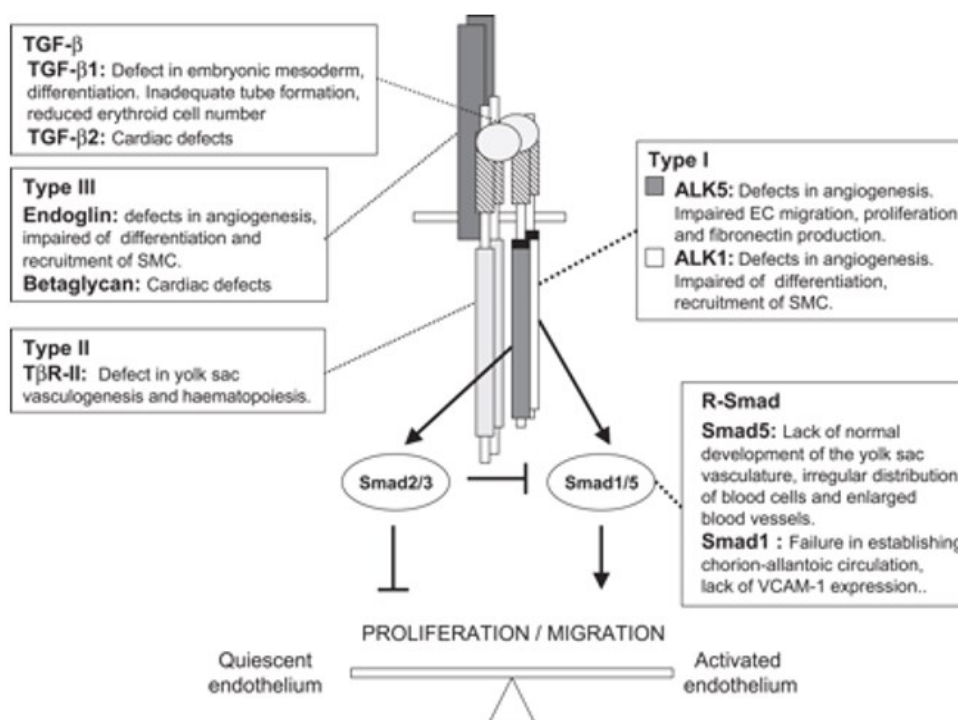
TGF- β signalizace je iniciována vazbou ligandu na receptorový komplex obsahující receptory buněčného povrchu – TGF- β RI, TGF- β RII (Meurer et al., 2019; Nassiri et al., 2011). TGF- β RI (ALK1, ALK5) a TGF- β RII jsou serin/threonin kinázy s podobnou strukturou, obsahující na cystein bohatou extracelulární doménu, krátkou hydrofobní transmembránovou doménu a cytoplazmatickou oblast zahrnující kinázovou doménu (Meurer et al., 2019). Po navázání TGF- β na TGF- β RII se spustí fosforylace specifických serinových a threoninových zbytků a dochází k aktivaci TGF- β RI, to vede k endocytóze receptorového komplexu a fosforylaci substrátových proteinů TGF- β RI. Fosforylovaný TGF- β RI aktivuje Smad proteiny („Small mothers against decapentaplegic“), což jsou strukturálně podobné proteiny, které jsou hlavními intracelulárními posly signálu pro TGF- β (Meurer et al., 2019, Derynck et al., 1998). Aktivace Smad proteinů vede k jejich translokaci z cytoplazmy do jádra, kde mohou společně s dalšími transkripčními faktory aktivovat nebo potlačovat transkripci a tím regulovat expresi cílového genu (Attisano et al., 2001). Receptory typu I aktivují signální dráhy skrz Smad1, Smad5 a Smad8 (ALK1) nebo Smad2 a Smad3 (ALK5) (Lopez-Nova et al., 2012). Aktivovaný ALK 5 („Activin receptor-like kinase 5“) fosforyluje Smad 2/3 a tvoří komplex se Smad 4,

kteřý se hromadí v jádru a reguluje buněčnou expresi, aktivovaný ALK 1 tvoří komplex s TGF- β RII a ALK 5, tento komplex váže BMP-9 a šíří signál pomocí Smad 1/5/8 (Ray et al., 2010; Santibanez et al. 2007). Signalizace je ve většině buněk zprostředkována TGF- β RII a ALK 5. Nedávno bylo prokázáno, že v EC může TGF- β aktivovat dvě odlišné dráhy TGF- β RI, tj. ALK 5/Smad 2/3 nebo ALK 1/Smad 1/5. Aktivace ALK 1 stimuluje proliferaci a migraci buněk, zatímco aktivace ALK 5 tyto děje inhibuje (Lebrin et al., 2004). Rovnováha mezi signálními dráhami ALK1 a ALK5 v EC a buňkách hladkého svalstva cév hraje zásadní roli při remodelaci cév a angiogenezi. ENG inhibuje buněčné odpovědi TGF- β /ALK5/Smad3 a zvyšuje odpovědi ALK5/Smad2, kromě toho také podporuje TGF- β 1/ALK1 a BMP-9/ALK1 signalizaci v endotelových buňkách a zvyšuje signál BMP-7 prostřednictvím dráhy Smad1/Smad5 v myoblastech. ENG se tedy jeví jako jeden ze zásadních modulátorů rovnováhy mezi ALK1 a ALK5 signalizací (Obr. 7) (Gore et al., 2014; Lopez-Nova et al., 2012). Mechanismus, kterým ENG potencuje TGF- β /ALK1 signalizaci, spočívá v přímém spojení ALK1 s cytoplazmatickou a extracelulární ENG doménou, přičemž extracelulární doména zprostředkovává zlepšení ALK1 signalizace. ENG a ALK1 jsou zapojené do stejné signální dráhy, která je klíčová pro odpověď EC na členy TGF- β podrodiny, proto mutace ENG nebo ALK1 genů vedou k HHT (hereditární hemorhagická telangiektázie). ALK5 a receptor typu II také interagují s extracelulární a cytoplazmatickou doménou, ovšem pouze když je kinázová doména neaktivní (López-Novoa et al., 2010; Koleva et al., 2006).

ENG má nezastupitelnou roli v angiogenezi. Tento fakt byl dokázán u myši s delecí genu pro ENG, které umírají během časného intrauterinního vývoje na mnohočetné srdeční a cévní defekty spojené s abnormálním vývojem buněk hladké svaloviny (Smolej et al., 2006). Myši, které vůbec neexprimovaly ENG, umíraly mezi 10,5 – 11,5 dnem embryonálního vývoje (Li et al., 1999). Embrya nesoucí knock-outovaný gen pro homozygotní ENG vytvořený delecí 609 bp (zahrnující exon 1), vykazují podobný fenotyp jako myši, kterým chybí TGF- β 1 a TGF- β RII. To dokazuje, že ENG hraje zásadní roli v TGF- β signalizaci v časném rozvoji cév (Bourdeau et al., 1999).

ENG může hrát také klíčovou roli při fibróze jater. U chronických nemocí jater je již dobře zdokumentována role TGF- β , který přispívá ke všem stádiím onemocnění, od počátečního poškození a zánětu až do pozdějších procesů fibrózy/cirhózy a hepatocelulárního karcinomu. ENG interaguje s fosforylovaným TGF- β RII, dochází k přechodné nadměrné expresi ENG v HSC, což je nejvíce profibrogenní typ buněk v játrech, a to vede k silnému zvýšení TGF- β 1 řízené Smad 1/5 fosforylace a expresi aktinu hladké svaloviny, zatímco Smad 2 fosforylace je nezměněna. To dokazuje, že ENG podporuje TGF- β 1/ALK1-Smad1/5

signalizaci v endotelových buňkách, tedy zvyšuje aktivaci Smad 1/5 zprostředkovanou TGF- β 1, a to vede k fibróze jater (Finsson et al., 2012; Santibanez et al. 2007; Maring et al., 2012).



Obrázek č. 7 - Receptory se serin/threonin kinázovou aktivitou (Převzato z Lebrin et al., 2005)

4.3. Endoglin a NO

eNOS („Endothelial nitric oxide synthase“) je enzym, který je zodpovědný za expresi NO endotelovými buňkami. ENG působí na expresi a aktivitu eNOS v endotelových buňkách skrze Smad 2/3, což jsou transkripční faktory bez účasti TGF- β (Vitverová et al., 2018; Lopez-Nova et al., 2012; Jerkic et al., 2004). Exprese a aktivita eNOS je důležitá pro protekci endotelu a podílí se na angiogenezi a regulaci cévního tonu (Nachtigal et al., 2012; Lopez-Nova et al., 2012). Snížená exprese eNOS vede k endotelové dysfunkci (Nachtigal et al., 2012). ENG zvyšuje expresi eNOS, což může vést ke stimulaci neoangiogeneze (Santibanez et al., 2007).

4.4. Exprese endoglinu

ENG je primárně exprimován v EC, nicméně jeho přítomnost byla prokázána také v makrofázích, buňkách kostní dřeně, hladké svaloviny cévní stěny, HSC, hematopoetických buňkách a v syncytiotrofoblastech placenty (Meurer et al., 2011; Oujó et al., 2013).

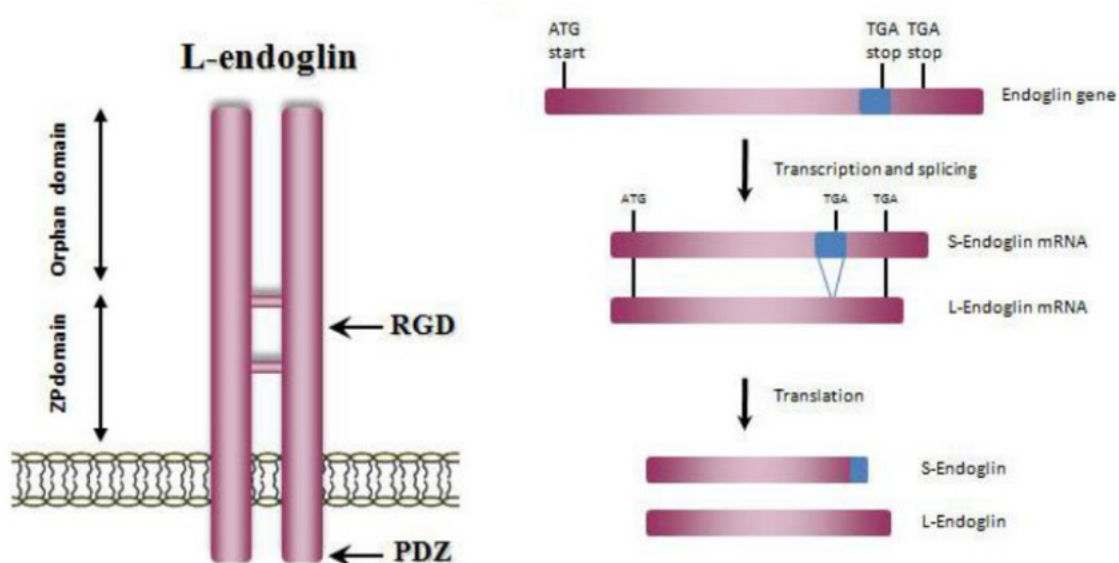
Buněčná a tkáňová distribuce ENG naznačuje, že hraje klíčovou roli ve vývoji cév, angiogenezi a v buněčné a orgánové homeostáze. V klidových EC jsou exprimovány jen nízké

hladiny ENG, ale je vysoce exprimován ve vaskulárních EC v místech aktivní angiogeneze, během embryogeneze, při zánětu, hojení ran a vaskularizaci nádorů (López-Novoa et al., 2010).

Expresí ENG v krevních cévách je zvýšena během hypoxie nebo při následujícím cévním poškození. Při hypoxickém stavu je transkripce ENG indukována multiproteinovým komplexem Smad3/Smad4, stimulačním proteinem 1 (Sp1) a hypoxii-indukujícím faktorem-1 (HIF-1). Smad – závislá TGF- β signalizace také zvyšuje expresi ENG, naopak TNF- β („Tumor necrosis factor“) inhibuje expresi ENG endotelovými buňkami (Young-Saeng et al., 2014; Tian et al., 2010).

4.5. Formy endoglinu

Existují dvě izoformy endoglinu. L-endoglin (L-ENG, long), S-endoglin (S-ENG, short) a solubilní forma endoglinu (sENG). L-ENG a S-ENG se od sebe liší délkou cytoplazmatických zbytků. Převážně exprimovanou isoformou je L-ENG, který se vyskytuje ve většině tkání a má délku cytoplazmatické domény 47 AMK, zatímco S-ENG doména má délku 14 AMK a můžeme ji nalézt převážně v játrech a plicích (Obr. 8) (Cheifetz et al., 1992; Pérez-gómez et al., 2010; Lopez-Nova et al., 2012).



Obrázek č. 8 - Isoformy endoglinu (Převzato z Pérez-gómez et al., 2010)

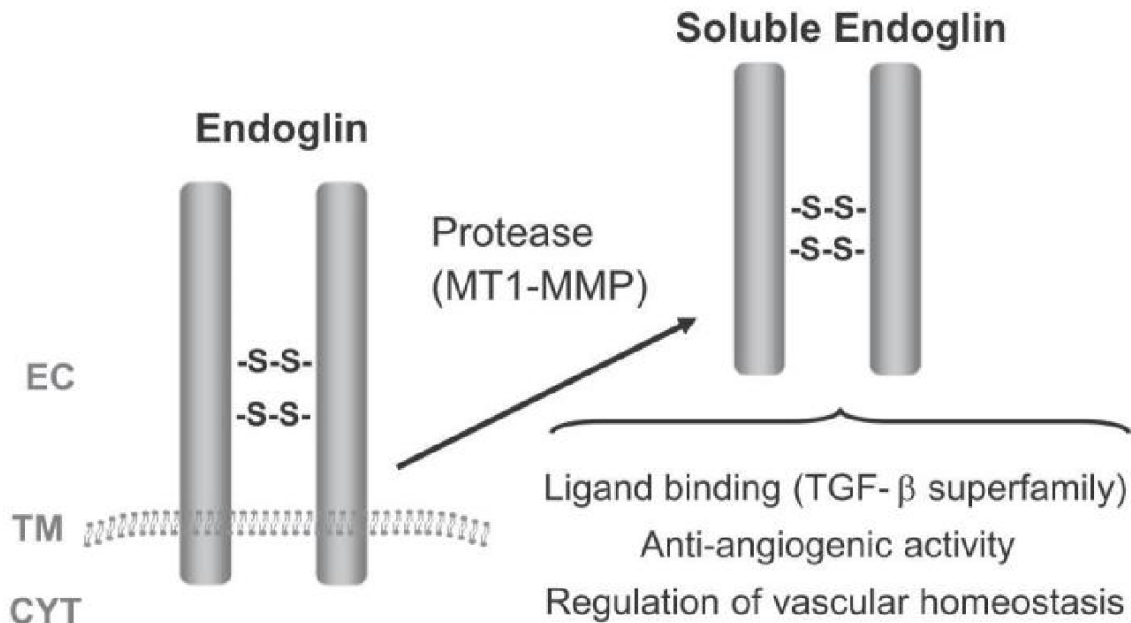
5. Solubilní endoglin

Solubilní forma endoglinu (sENG) vzniká proteolytickým odštěpením extracelulární části membránově vázaného ENG, a to např. během poškození endotelu, zánětu nebo stárnutí endotelu (Vitverová et al., 2018). Jde o štěpný produkt NH₂-konce L-endoglinu. K odštěpení extracelulární části dochází v pozici 586 pomocí MMP-14 („Matrix metalloproteinase 14“), která je nejhojněji exprimovanou metaloproteinázou v endotelových buňkách (López-Novoa et al., 2010; Rathouská et al., 2015). Role MMP-14 ve štěpení ENG byla zjištěna po podání oxysterolů, které aktivovalo LXR transkripční faktor a expresi MMP-14 v jaterních buňkách a placentě (Obr. 9) (Rathouská et al., 2015).

Předmětem současných studií je fakt, že poloha štěpení membránového ENG může mít zásadní vliv na vznik mnoha patologií. Za normálních okolností se molekula sENG o hmotnosti 80 kDa odštěpí z povrchu HUVECs („Human umbilical vein endothelial cells“) v pozici 586, což znamená, že je uvolněna celá extracelulární doména. Ve studii Gregory et al. 2014 se podařilo získat ze séra žen trpících preeklampsii sENG o hmotnosti 65 kDa, což naznačuje, že při preeklampsii a možná i jiných chorobách sENG není štěpen v pozici 586. Toto zjištění je předmětem aktuálních studií (Rathouská et al., 2015).

Zvýšená hladina sENG v plazmě byla detekována u pacientů trpících různými kardiovaskulárními nebo metabolickými chorobami, jako je ateroskleróza, hypercholesterolémie, arteriální hypertenze, DM typu II, jaterní onemocnění a preeklampsie. Hladina sENG souvisí s vážností nemoci. Jelikož jsou všechny tyto patologické stavy spojené s endotelovou dysfunkcí, vysoká hladina sENG může být považována za biomarker endotelové dysfunkce a kardiovaskulárních patologií (Vitverová et al., 2018). Je ale důležité zmínit, že sENG není jen biomarker, zvyšující se během těchto patologických procesů, ale může se také podílet na jejich patogenezi, což bylo dokázáno potlačením endotelové/vaskulární dysfunkce u myši s vysokými plazmatickými koncentracemi sENG (Doleželová et al., 2019).

sENG je na rozdíl od tkáňového ENG antiangiogenní faktor. Přispívá k patogenezi preeklampsie spojené s hypertenzí, proteinurií, předčasným porodem, hemolýzou, jaterními abnormalitami a trombocytopenií (Meurer et al., 2014). Možný mechanismus antiangiogenního efektu sENG je založen na inhibičním efektu TGF- β 1 zprostředkovaný aktivací eNOS v EC (Blazquez-Medela et al., 2010). Endotelová dysfunkce je považována za první a klíčový krok v rozvoji aterosklerózy a je často spojována s poškozením na endotelu závislé vasodilatace zprostředkované NO (Vitverová et al., 2018; Luft et al., 2006).



Obrázek č. 9 - Vznik solubilního endoglinu proteolytickým procesem z membránově vázaného endoglinu (převzato z López-Novoa et, 2010)

5.1. Solubilní endoglin v játrech

Zvýšené hladiny sENG jsou pozorovány u pacientů trpících kardiovaskulárním nebo metabolickým onemocněním, zahrnující hypercholesterolémii, aterosklerózu, DM typu II a nemoci, které postihují jaterní funkce a metabolismus. Lze tedy předpokládat, že vysoké hladiny sENG by mohly mít vliv na homeostázu cholesterolu v játrech (Doleželová et al., 2019).

Hladiny sENG jsou zvýšeny u patologických procesů spojených se zvýšenou koncentrací cholesterolu v plazmě a metabolickým poškozením jater (Doleželová et al., 2019).

Plazmatické hladiny cholesterolu se během hypercholesterolémie zvyšují. Při použití specifických transgenních myší bylo dokázáno, že zvýšená hladina sENG v plazmě aktivuje jaterní mechanismy zaměřené na redukci plazmatické koncentrace cholesterolu a jeho redistribuci z plazmy do hepatocytů a následně do žluči. sENG má indukční efekt na oba hlavní transportéry v basolaterální membráně, a tím stimuluje příjem cholesterolu hepatocyty. Sr-b1 zprostředkovává absorpci HDL z plazmy do hepatocytů a LDL-receptor (LDLR) je zodpovědný za absorpci LDL cholesterolu. sENG snižuje hladinu cholesterolu v plazmě především poklesem hladiny LDL cholesterolu. Myši, u kterých není přítomen jeden z těchto transportérů, vykazují zvýšené koncentrace cholesterolu v plazmě a rozvíjí se u nich ateroskleróza. Výsledkem vysokých hladin sENG je tedy snížená plazmatická koncentrace

hlavně LDL cholesterolu a zvýšený obsah cholesterolu v játrech. HDL cholesterol není modifikován nejspíš z důvodu vlivu sENG na Srebp-2 („Sterol regulatory element-binding protein-2 „), což je hlavní transkripční modulátor LDLR. Zvýšená jaterní absorpce je tedy pravděpodobně zprostředkována Srebp-2 a Ldlr. Kromě zvýšeného vychytávání cholesterolu játry, vykazovaly transgenní myši také zvýšenou biliární sekreci cholesterolu zprostředkovanou zvýšenou expresí kanalikulárních transportérů Abcg5/Abcg8. Byla také zvýšena aktivita Cyp7a1 („Cholesterol 7 alpha-hydroxylase“), což je enzym katalyzující první krok přeměny cholesterolu na ŽK. Další enzymy (Cyp27A1, Cyp8B1) následující v kaskádě syntézy ŽK ale modulovány nebyly (Doleželová et al., 2019; Yokode et al., 1990; Wiersma et al., 2010).

Dále byla pozorována zvýšená aktivita Asbt („Apical sodium-dependent bile acid transporter“) a Ost β („Heteromeric organic solute transporter“), hlavních transportérů pro zpětné vychytávání ŽK ze střeva na apikální a basolaterální membráně enterocytů, umožňující enterohepatální oběh ŽK. Studie naznačuje možné ovlivnění PXR („Pregnane X receptor“) receptoru, který je hlavním xenobiotickým senzorem a reguluje expresi mnoha genů zapojených do eliminace xenobiotik. Např. enzymové induktory vyvolávající interakce léčivo/jídlo-léčivo jsou běžně agonisté tohoto receptoru (Doleželová et al., 2019; Alsamman et al., 2018; Banerjee et al., 2015).

sENG by také mohl mít potenciál zvyšovat vylučování řady léčiv prostřednictvím Mdr1 („Multi-drug resistance protein“) transportéru. To znamená, že by mohl významně modifikovat lipidový metabolismus a farmakokinetiku léčiv (Doleželová et al., 2019).

5.1.1. Solubilní endoglin a hypercholesterolémie

Hypercholesterolémie je onemocnění vyznačující se zvýšenou hladinou LDL v plazmě, které doprovází zvýšené uvolňování sENG, ale potenciální efekt na cholesterolový obrat zatím nebyl příliš prostudován (Obr. 11) (Doleželová et al., 2019).

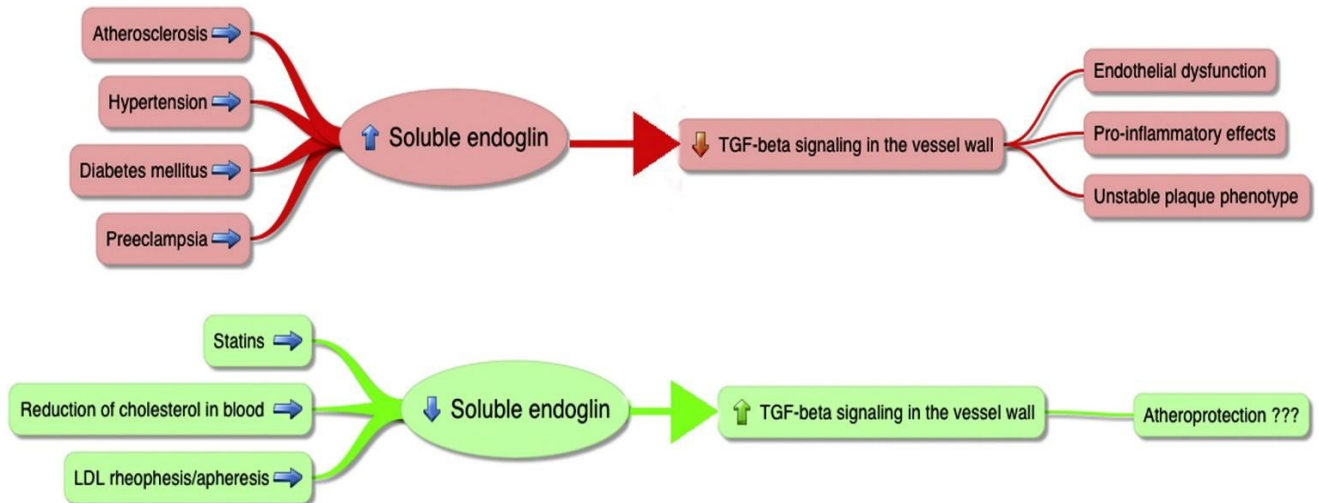
Hypercholesterolémie je jedním z nejvíce studovaných rizikových faktorů spojených s endotelovou dysfunkcí a aterosklerózou. První zmínka o vztahu hypercholesterolémie a sENG je z práce Blann et al. 1996, která demonstruje zvýšené sérové hladiny sENG u pacientů s aterosklerózou. Nacházejí asociaci s celkovou hladinou cholesterolu, ale ostatní markery endotelového poškození a dysfunkce zvýšené nejsou, např. E-selektin (Rathouská et al., 2015; Blann et al., 1996).

Další studie prokázala, že hladina sENG se zvyšuje při zvýšené hladině celkového cholesterolu u pacientů s familiární hypercholesterolémií (Bláha et al., 2008).

U endotelové dysfunkce a aterosklerózy hrají významnou roli také další rizikové faktory jako je hypertenze nebo DM typu II. Pacienti s DM typu II a hypertenzí spolu se zdravými jedinci byli podrobeni studii a zjistilo se, že hladina sENG významně koreluje s endotelovou dysfunkcí, glykemií, glykovaným hemoglobinem, systolickým krevním tlakem a hypertrofií levé komory. Hladina sENG byla také významně zvýšena u pacientů s DM typu II, u kterých se projevila retinopatie nebo hypertenze (Blazquez-Medela et al., 2010).

Vysoké plazmatické hladiny sENG snižují plazmatickou koncentraci cholesterolu, v důsledku komplexních změn v expresi odpovědných jaterních transportérů, jako je aktivace Sr-b1 jaterních proteinů a Ldlr, které jsou zodpovědné za vychytávání cholesterolu v hepatocytech, a také zvýšené množství Abcg8, který je důležitý pro eflux cholesterolu do žluči (Doleželová et al., 2019; Stráský et al., 2011).

Je důležité zmínit, že sENG má potenciálně opačný efekt na cévní endotel v porovnání s membránovým ENG, což znamená inhibice eNOS závislé vasodilatace a vyšší expresi cévních adhezivních molekul. Samotný sENG nevyvolává žádné známky endotelové dysfunkce, ale v kombinaci s hypercholesterolémií může endotelovou dysfunkci zhoršovat (Vitverová et al., 2018).



Obrázek č. 10 - Role nízkých a vysokých hladin ENG (Převzato z Nachtigal et al., 2012)

6. Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo objasnit vliv sENG na metabolismus cholesterolu v játrech u transgenních myší s vysokými plazmatickými hladinami sENG a současně podávanou vysokotukovou dietou. Pro objasnění mechanismu bylo prováděno hodnocení pomocí metod qRT-PCR a Western blot.

7. Experimentální část

7.1. Metodika

7.1.1. Chemikálie

Používané chemikálie pochází od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) a Bio-Rad Laboratories (Herkules, CA, USA). Voda byla čištěna pomocí MilliQ systému (Schwalbach, Germany).

7.1.2. Pokusná zvířata

Transgenní samci myši nadměrně exprimující lidský sENG (*Sol-Eng+*) na podkladě CBAxC57BL/6J a jako kontrolní skupina CBAxC57BL/6J „wild-type“ myši samci (n = 8, v každé skupině). Všechna zvířata použitá v experimentu pocházela z Vivária Lékařské fakulty v Hradci Králové. Zvířata byla rozdělena do tří skupin: „wild-type“ krmeni po dobu šesti měsíců standartní laboratorní dietou (WT_{chow}); „wild-type“ krmeni vysokotukovou dietou, glukózou a fruktózou (WT_{HFD}) a skupina s vysokou plazmatickou hladinou sENG (sENG_{HFD}), která byla po dobu šesti měsíců krmena HFD, glukózou a fruktózou. Zvířata byla po celou dobu experimentu chována při 12hodinovém světelném cyklu a konstantní teplotě 22 ± 1 °C se stálým přístupem k vodě.

Na konci experimentu byly všechny myši usmrceny vykrvácením z *vena cava*. Játra byla vyjmuta a ihned zmrazena v tekutém dusíku. Až do doby analýzy byly vzorky uchovávány při teplotě -80 °C.

Všechny experimenty byly uskutečněny v souladu s vyhláškou č. 419/2012 Sb.O ochraně pokusných zvířat a schváleny etickou komisí pro ochranu zvířat na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové (reg. číslo: MSMT-12981/2019-3).

7.1.3. qRT-PCR

Pro analýzu genové exprese na úrovni mRNA byla použita metoda qRT-PCR („Quantitative Reverse Transcription PCR“) pomocí QuantStudio6 Flex Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, Thermo Fisher -scientific, Waltham, MA, USA). Jako referenční gen byl použit *Gapdh* („Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase“). Použité primery jsou uvedeny v Tab. 1.

RNA byla izolována ze vzorku myších jater (50 mg jaterní tkáň), homogenizována v TRI reagentu (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), poté provedena fázová separace

a centrifugace za nízké teploty za účelem získání RNA. Použitím NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (BioTech a.s. ČR) byla měřena absorbance při 260 nm a stanovena čistota a kvalita RNA poměrem absorbance při 260 nm (specifické pro NK) a 280 nm (specifické pro proteiny). RNA byla pomocí reverzní transkripce, za použití primeru, přepsána do cDNA za pomoci High Capacity cDNA Reverse Transcription KITu (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA). Každý ze vzorků byl v triplikátu amplifikován pomocí TaqMan® Gene Expression Master Mixu a Taq-Man® Gene Expression Assay mixu pro každý z genů, viz Tab. 1. Teplotně časový profil byl 95 °C po dobu 20 s; 40 cyklů: 50 °C po dobu 2 min, 95 °C po dobu 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min. Poměr relativní exprese byl vypočítán porovnáním kontrolních a sENG vzorků pro každý gen a referenčním genem Gapdh dle následujícího vztahu:

$$R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_{t_{\text{target}}}} \text{ (kontrola-vzorek)}}{E_{\text{housekeeping}}^{\Delta C_{t_{\text{housekeeping}}}} \text{ (kontrola-vzorek)}}$$

kde E_{target} a $E_{\text{housekeeping}}$ jsou hodnoty efektivity určené pro jednotlivé geny na základě kalibrační křivky, $\Delta C_{t_{\text{target}}}$ a $\Delta C_{t_{\text{housekeeping}}}$ jsou rozdíly prahových hodnot (C_t) mezi vzorky všech skupin myší, pro každý jednotlivý gen a pro gen referenční.

Tab. 1 Pre-designed TaqMan® Gene Expression Assay kits (Life Technologies) použité pro kvantitativní real-time RT-PCR

Symbol genu	Transportér	Označení Life Technologies
<i>Scrab1</i>	Sr-b1	Mm00450234_m1
<i>Ldlr</i>		Mm01177349_m1
<i>Abca1</i>		Mm00442646_m1
<i>Hmgcr</i>		Mm01282499_m1
<i>Abcg5</i>		Mm00446241_m1
<i>Abcg8</i>		Mm00445980_m1
<i>Gapdh</i>		Mm99999915_g1

7.1.4. Western blot

Vzorek myších jater byl zvážen, přidán do 2 ml mikrozkušavek se skleněnými kuličkami a homogenizován v Tris-sacharózovém pufru (10 mmol/l Tris-HCl, 250 mmol/l sacharózy, pH 7,6) s obsahem inhibitorů proteáz (aprotinin, leupeptin, pepstatin, benzamid a fenylmethylsulfonylfluorid). Homogenizace byla provedena pomocí Magna Lyseru (Roche Diagnostics GmbH, Německo) – 2 cykly 6000 otáček po dobu 30 s. Po ultracentrifugaci byla ze supernatantu získána peleta obohacené membránové frakce (104 000 g při 4 °C po dobu 60 min.), peleta byla následně resuspendována v Tris-HCl pufru (50 mmol/l Tris-HCl, inhibitory proteáz, pH 7,5). Stanovení koncentrace proteinů probíhalo bicinchoniovou metodou – BCA (BCA Protein Assay Kit, Rockford, IL, U.S.A.), založenou na měření absorbance. Poté byly vzorky uchovávány při – 80 °C až do analýzy.

Pro provedení analýzy byly vzorky rozmrazeny. Za pokojové teploty po dobu 30 min. byly vzorky inkubovány se vzorkovým pufrům (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Separace proteinů probíhala pomocí SDS-PAGE („Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis“) a gelu o koncentraci 6,25 % a 10 % (6,25 % pro proteiny o velikosti 150-200 kDa a 10 % pro proteiny o velikosti 40 kDa). Proteiny byly poté přeneseny na PVDF (polyvinylidenfluoridovou) membránu (Millipore, NY, USA). Následně byla membrána ponořena do 5 % roztoku nízkotučného mléka s TRIS pufrům (0,05 % Tween 20) a inkubována 1 h s příslušnými primárními a sekundárními protilátkami uvedenými v Tab. 2. Následně byla membrána promyta roztokem TBS-T. Detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního činidla (ECL kit, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, VB). Chemiluminiscenční obraz byl pořízen za pomoci softwaru Evolution-capture (Fusion Solo 6S Edge, Vilber Lourmat SAS, Francie). Imunoreaktivní skupiny byly kvatifikovány pomocí softwaru ImageLab verze 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Tab. 2 Primární a sekundární protilátky použité pro Western blot

Protein	Původ	Zředění	Zředění sekundární protilátky
Eng	Santa Cruz (sc19793)	1:500	1:3000
Sr-b1	Novus (NB400-104)	1:2000	1:4000
Ldlr	Thermo Fisher (PA5-20752)	1:1000	1:2000
Abca1	Thermo Fisher (PA1-16789)	1:500	1:2000
Hmgcr	Thermo Fisher (PA5-37367)	1:1000	1:2000
Abcg5	Thermo Fisher (PA5-69249)	1:1000	1:2000
Abcg8	Thermo Fisher (PA1-16798)	1:500	1:2000
Gapdh	Cell Signaling (#2118)	1:8000	1:10000

7.2. Statistická analýza dat

Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru), pro 8 zvířat ve všech skupinách. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí Non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis testu), pomocí GraphPad Prism 5.0 softwaru (San Diego, Kalifornie). Za statisticky významnou je považována hodnota $p < 0,05$.

8. Výsledky

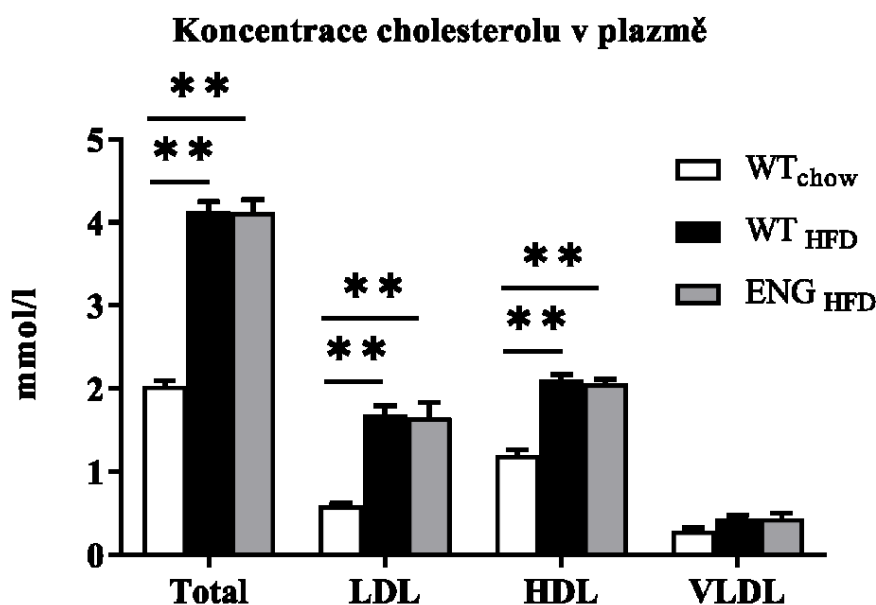
8.1. Biochemická analýza

Myši byly rozděleny do skupin dle přijímané diety a hladiny sENG v plazmě na tři skupiny WT_{chow}, WT_{HFD}, sENG_{HFD}. U všech myší v experimentu byly stanoveny koncentrace cholesterolu v plazmě (celkového, LDL, HDL, VLDL) viz Obr. 11 a koncentrace cholesterolu v játrech, jak znázorňuje Obr. 12.

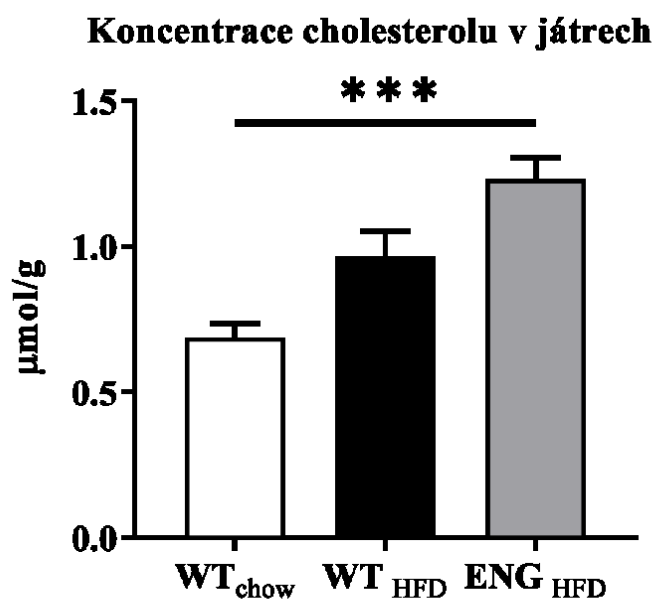
Koncentrace celkového cholesterolu se ve skupině WT_{HFD} významně zvýšila na 197 % oproti WT_{chow}. Ve skupině sENG_{HFD} také došlo k významnému zvýšení koncentrace, a to na 193 % v porovnání s WT_{chow}. Koncentrace LDL byla u WT_{HFD} zvýšena na 274 % a u sENG_{HFD} se zvýšila na 269 % v porovnání s WT_{chow}. HDL koncentrace v plazmě byla ve skupině WT_{HFD} zvýšena na 172 % a u sENG_{HFD} se zvýšila na 167 % oproti WT_{chow}. Koncentrace VLDL se ani u jedné ze skupin statisticky významně nezměnila.

Koncentrace cholesterolu v játrech byla u sENG_{HFD} signifikantně zvýšena na 180 % v porovnání s WT_{chow}. U skupiny myší WT_{HFD} nedošlo ke statisticky významné změně koncentrace cholesterolu v játrech.

Doluhodobé podávání vysokotukové stravy tedy vede ke zvýšení koncentrace cholesterolu v plazmě i játrech, nicméně sENG na tuto změnu neměl žádný vliv.



Obrázek č. 11 – Koncentrace celkového cholesterolu, LDL, HDL a VLDL v plazmě. Vyjádřeno jako průměry ± SEM (n=8 v každé skupině); **p < 0,01.



Obrázek č. 12 – Koncentrace cholesterolu v játrech. Vyjádřeno jako průměry \pm SEM ($n=8$ v každé skupině); signifikantní rozdíl oproti WT_{chow} *** $p < 0,001$.

8.1.2 qRT-PCR

Výsledky qRT-PCR analýzy exprese genů na úrovni mRNA jsou zobrazeny na Obr. 13.

Ke statisticky významnému snížení exprese mRNA došlo u *Ldl* genu ve skupině sENG_{HFD} i WT_{HFD}, a to na 52 % u WT_{HFD} a na 51 % u sENG_{HFD} v porovnání s WT_{chow}.

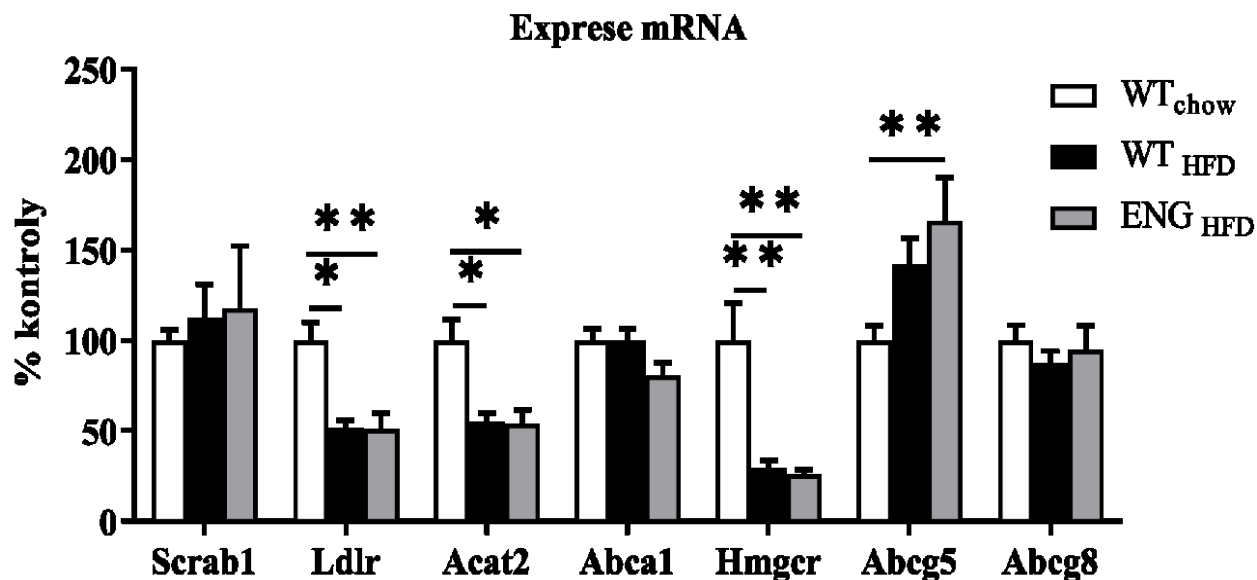
Exprese *Acat2* na úrovni mRNA byla také významně snížena u obou skupin krmených vysokotukovou dietou, a to na 55 % u WT_{HFD} skupiny a na 54 % u skupiny sENG_{HFD} oproti WT_{chow}.

Hmgcr exprese se statisticky významně snížila ve skupině sENG_{HFD} na 26 % a u WT_{HFD} byla snížena na 29 % v porovnání s WT_{chow}.

Exprese *Abcg5* genu na úrovni mRNA se zvýšila na 166 % u skupiny sENG_{HFD} myši oproti WT_{chow}.

V žádné ze skupin zvířat nedošlo k signifikantním změnám exprese mRNA u genů *Scrab1*, *Abcat2*, *Abcg8*.

Z výsledků tedy vyplývá, že sice došlo k signifikantním změnám exprese mRNA příslušných genů, ovšem primárně vlivem podávané vysokotukové diety. Zvýšené plazmatické koncentrace sENG neměly na expresi genů žádný vliv.



Obrázek č. 13 – Grafické znázornění výsledků qRT-PCR analýzy. Vyjádřeno jako průměry \pm SEM ($n=8$ v každé skupině); signifikantní rozdíl oproti WT_{chow} * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Kontrola = 100 %.

8.1.3 Western blot

Expres transportérů na úrovni proteinu byla hodnocena metodou Western blot (Obr. 14).

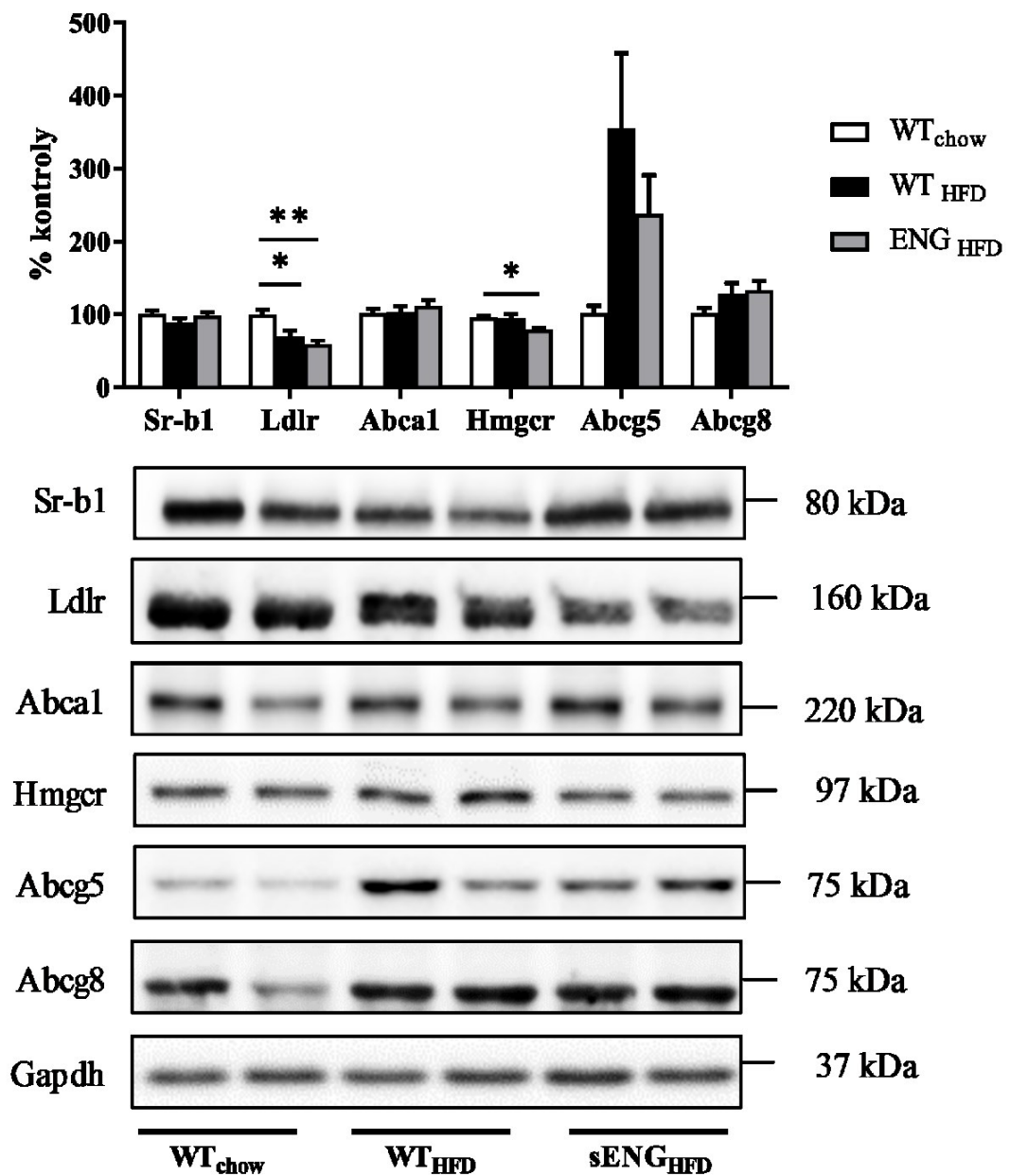
Signifikantně byla snížena expres Ldlr, u skupiny sENG_{HFD} na 59 % a u WT_{HFD} na 70 % v porovnání s WT_{chow}.

Expres Hmgcr proteinu byla statisticky významně snížena na 82 % u sENG_{HFD} myši v porovnání s WT_{chow}.

Expres proteinů Sr-b, Abca1, Abcg5, Abcg8 nebyla změněna u žádné z experimentálních skupin myši.

Z výsledků Western blot analýzy lze říci, že ani na expresi proteinů neměl sENG vliv.

Expres proteinu



Obrázek č. 14 – Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy. Vyjádřeno jako průměry ± SEM (n=8 v každé skupině); signifikantní rozdíl oproti WT_{chow} *p < 0,05; **p < 0,01. Kontrola = 100 %.

9. Diskuse

ENG je transmembránový glykoprotein, koreceptor TGF- β podrodiny, který je exprimován primárně v endotelových buňkách, nicméně jeho přítomnost byla prokázána také v makrofázích, stromálních buňkách kostní dřeně, hladké svaloviny cévní stěny, HSC, hematopoetických buňkách a v syncytiotrofoblastech placenty (Meurer et al., 2011; Oujo et al., 2013). Jeho buněčná a tkáňová distribuce naznačuje, že hraje klíčovou roli ve vývoji cév, angiogenezi, v buněčné a orgánové homeostáze (López-Novoa et al., 2010).

Solubilní forma ENG vzniká po proteolytickém odštěpení z membránově vázaného ENG pomocí MMP-14, a to během endotelového poškození, zánětu nebo stárnutí endotelu. Zvýšené hladiny sENG jsou pozorovány u kardiovaskulárních a metabolických onemocnění, zahrnujících hypercholesterolémii, DM typu 2, preeklampsii, arteriální hypertenzi nebo také jaterní nemoci. Vzhledem k tomu předpokládáme určitý vliv sENG na metabolismus cholesterolu v játrech (Doleželová et al., 2019; Vitverová et al., 2018). Zmíněná metabolická onemocnění a nevhodná dieta pak mohou vyústit v onemocnění NASH.

NASH je klinický syndrom, který je kombinací steatózy, zánětlivé infiltrace jater a nekrózy, vyvíjí se na podkladě NAFLD (Zavoral et al., 2007; Příbramská et al., 2008). NASH se vyznačuje tendencí k tvorbě vaziva a může se rozvinout až v jaterní cirhózu nebo hepatocelulární karcinom (Zavoral et al., 2007; Horák et al., 2014).

Studie Doleželová et al. 2019 provedená na zdravých transgenních myších krmených standartní laboratorní dietou již potvrdila vliv sENG na metabolismus cholesterolu v játrech. Prokázala sníženou koncentraci cholesterolu v plazmě a zvýšenou koncentraci cholesterolu v játrech vlivem sENG. Mechanismem těchto změn byla zvýšená exprese Ldlr a Sr-b1 a to na genové i proteinové úrovni, zvýšená exprese těchto proteinů aktivovala jaterní mechanismy zaměřené na snížení plazmatické koncentrace cholesterolu a jeho redistribuci z plazmy do hepatocytů (Doleželová et al., 2019).

Potenciální efekt sENG na cholesterolový metabolismus v kombinaci s vysokotukovou dietou ještě nebyl studován. Cílem této diplomové práce bylo proto zjistit, jestli vůbec a jakým mechanismem ovlivňuje sENG metabolismus cholesterolu v játrech, která jsou vlivem vysokotukové diety poškozena onemocněním NASH.

V experimentu byli použiti tři měsíce staří myši samci, kteří byli rozděleni do skupin dle přijímané diety a hladiny sENG v plazmě do tří skupin - WT_{chow}, WT_{HFD}, sENG_{HFD}.

Z výsledků vyplývá, že došlo k signifikantnímu zvýšení hladiny cholesterolu v plazmě (celkového, HDL, LDL) u obou skupin myši krmených vysokotukovou dietou, hladiny VLDL

nebyly signifikantně ovlivněny. Zvýšená hladina chlesterolu byla pozorována i v játrech, a to u myší se zvýšenými plazmatickými hladinami sENG. Pro objasnění mechanismu těchto změn byla provedena analýza genové a proteinové exprese příslušných transportních systémů pro cholesterol.

Analýza genové exprese na úrovni mRNA prokázala snížení exprese u *Ldlr*, *Acat2*, *Hmgcr* ve skupině WT_{HFD} a sENG_{HFD} myší oproti WT_{chow}. Naopak signifikantní zvýšení genové exprese *Abcg5* bylo pozorováno u myší s vysokou plazmatickou koncentrací sENG. U genů *Scrab1*, *Abca1* a *Abcg8* nebyly pozorovány statisticky významné změny genové exprese na úrovni mRNA. Z výsledků analýzy vyplývá, že vysoké plazmatické hladiny sENG významněji neovlivnily expresi mRNA u daných genů.

Na úrovni proteinů došlo ke statisticky významným změnám exprese pouze u *Ldlr* a *Hmgcr* proteinů.

Expese *Ldlr* proteinu byla významně snížena u obou skupin krmených vysokotukovou dietou v porovnání s WT_{chow} skupinou myší. *Ldlr* je receptor buněčného povrchu zodpovědný za absorpci a lysozomální degradaci plazmatických LDL, hraje zásadní roli při udržování buněčné homeostázy (Goldstein et al., 1979; Gao et al., 2019). Předchozí studie na zdravých myších krmených standartní laboratorní dietou prokázala zvýšení exprese *Ldlr* proteinu vlivem vysokých plazmatických hladin sENG (Doleželová et al., 2019). Vysokotuková dieta vedla ke snížení exprese tohoto proteinu, což mohlo zvýšit koncentraci LDL cholesterolu v plazmě (Goldstein et al., 1979). Snížená expese *Ldlr* proteinu byla pravděpodobně způsobena již zvýšenou koncentrací cholesterolu v játrech vlivem vysokotukové diety.

Expese *Hmgcr* proteinu byla statisticky významně snížena pouze u sENG_{HFD} myší oproti WT_{chow}. Je to klíčový enzym syntézy cholesterolu, umožňuje přeměnu *Hmg-CoA* na mevalonovou kyselinu, což je jeden z hlavních kroků syntézy cholesterolu *de novo*. Snížená expese tohoto proteinu mohla být zapříčiněna negativním zpětnovazebným mechanismem zprostředovaným již zvýšenou koncentrací cholesterolu v játrech vlivem vysokotukové diety (DeBose-Boyd et al., 2008).

Expese *Abcg5* proteinu měla tendenci ke zvýšení u obou skupin krmených vysokotukovou dietou, nicméně z důvodu významného rozptylu hodnot nebyla změna signifikantní. *Abcg5* je protein reprezentující heterodimerní transportní komplex *Abcg5/Abcg8*, který hraje zásadní roli při transportu cholesterolu, omezuje intestinální absorpci a usnadňuje biliární exkreci cholesterolu. Jeho zvýšená expese vede k selektivnímu zvýšení sekrece cholesterolu do žluči (Liqing et al., 2002). Tendenci ke zvýšení exprese lze vysvětlit snahou o eflux cholesterolu z jater do žluči.

Exprese Abcg8 proteinu nebyla statisticky významně ovlivněna u žádné z experimentálních skupin myší. Abcg8, jak už bylo zmíněno výše, reprezentuje heterodimer Abcg5/Abcg8, který se nachází v enterocytech a hepatocytech, tento transportér omezuje kumulaci cholesterolu zvýšením vylučování cholesterolu do žluči (Musso et al., 2013).

Exprese Sr-b1 také nebyla signifikantně ovlivněna ani u jedné ze skupin. Sr-b1 je membránový receptor lokalizovaný v hepatocytech a makrofázích, jeho primární funkce je vychytávání HDL do buněk a tkání a také usnadnění odtoku cholesterolu z periferních tkání zpět do jater a následně do žluči (Shen et al., 2018; Musso et al., 2013). Předchozí studie Doleželová et al. 2019 na zdravých myších krmených standardní laboratorní dietou prokázala vliv sENG na tento receptor. V této studii ale tento receptor vysokými plazmatickými hladinami sENG, v kombinaci s vysokotukovou dietou, ovlivněn nebyl.

Exprese proteinu Abca1 také nebyla ani u jedné z pozorovaných skupin zvířat signifikantně ovlivněna. Abca1 podporuje eflux cholesterolu z makrofágů a jiných periferních tkání do lipidově chudých apolipoproteinů (apoA1, apoE) (Joyce et al., 2003).

Zvýšená koncentrace cholesterolu v plazmě by mohla být způsobena zvýšeným vychytáváním cholesterolu ze střeva a indukci enterohepatální cirkulace (Musso et al., 2013; Quintio et al., 1971). Pro potvrzení této hypotézy je nutné provést další analýzy.

Z výsledků biochemické analýzy vyplývá, že došlo ke zvýšení koncentrace cholesterolu v plazmě u obou skupin krmených vysokotukovou dietou, v játrech se signifikantně zvýšila koncentrace cholesterolu pouze u sENG_{HFD} myší, ovšem žádná z těchto změn nebyla způsobena vlivem sENG. Stejně tak sENG neovlivnil ani expresi výše uvedených genů a proteinů. K signifikantním změnám došlo pouze při porovnání zvířat krmených standardní laboratorní dietou se skupinami zvířat krmených vysokotukovou dietou, nikoli při porovnání WT_{HFD} a sENG_{HFD}. Lze tedy říci, že uvedené změny byly zapříčiněny pouze přijímanou vysokotukovou stravou, nikoliv vlivem sENG.

V této studii nebyl prokázán vliv sENG na metabolismus cholesterolu v játrech u transgenních myší, jejichž játra jsou již vlivem přijímané vysokotukové diety poškozena NASH. Pro detailní potvrzení vlivu sENG v kombinaci s vysokotukovou dietou na cholesterolový metabolismus je potřeba ještě provést další studie.

10. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv vysokých hladin sENG na metabolismus cholesterolu v játrech u transgenních myší, jejichž játra byla vlivem vysokotukové stravy poškozena onemocněním NASH.

V experimentu byly porovnávány tři skupiny myší, které byly rozděleny do skupin dle přijímané stravy a hladiny sENG v plazmě - WT_{chow}, WT_{HFD}, sENG_{HFD}.

Pomocí biochemické analýzy byly stanoveny koncentrace cholesterolu v játrech a plazmě. Pro objasnění mechanismu vlivu sENG byla analyzována exprese mRNA a proteinů, důležitých pro chlesterolový metabolismus.

Biochemická analýza prokázala u skupin myší krmených vysokotukovou dietou zvýšenou koncentraci cholesterolu v plazmě (celkového, LDL, HDL). Koncentrace cholesterolu v játrech byla signifikantně zvýšena pouze u sENG_{HFD} myší.

Zvýšená plazmatická hladina cholesterolu by mohla být způsobena zvýšeným vychytáváním cholesterolu ze střeva a indukcí enterohepatální cirkulace, nicméně pro potvrzení této hypotézy je nutné provést další analýzy.

Následně byla provedena analýza exprese proteinů, která prokázala signifikantní snížení exprese Ldlr u WT_{HFD} i sENG_{HFD} skupiny myší. Exprese Hmgcr proteinu byla významně snížena u sENG_{HFD} skupiny zvířat. Porovnáním skupin WT_{HFD} a sENG_{HFD} nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v expresi Hmgcr.

Žádnou z výše uvedených změn hladin cholesterolu a proteinové exprese sENG neovlivnil.

Z výsledků studie vyplývá, že vysoké hladiny sENG v kombinaci s vysokotukovou dietou nemají vliv na metabolismus cholesterolu, na rozdíl od myší krmených standardní laboratorní dietou, kde byl vliv sENG prokázán (Doleželová et al., 2019). Lze tedy říci, že změny pozorované v této studii byly indukované pouze vysokotukovou dietou a nebyly ovlivněny sENG.

11. Použité zkratky

Abca1	„ATP-binding cassette subfamily A member 1“
Abcg1	„ATP-binding cassette subfamily G member 1“
Acat	Acyl-koenzym A cholesterol acyltransferázy
AMK	Aminokyseliny
AMPK	AMP-aktivované proteinkinázy
BMP	„Bone morphogenetic proteins“
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CD105	Endoglin, TGF- β receptor III
CE	Ester cholesterolu
COPII	Coat protein komplex II“
Cyp7a1	„Cholesterol 7 alpha-hydroxylase“
DM typu 2	Diabets mellitus typu II
EC	Endotelové buňky
ECM	Extracelulární matrix
ENG	Endoglin
ENG _{HFD}	Myši s vysokou plazmatickou hladinou solubilního endoglinu krmené vysokotukovou dietou
eNOS	Endotelová NO-syntáza
ER	Endoplazmatické retikulum
FXR	Farnesoidní X receptor
GSH	Glutathion
HDL	„High density lipoproteins“
HFD	Vysokotuková dieta
HHT	Dědičná hemorhagická telangiektázie
Hmg-CoA	β -hydroxy β -methylglutaryl koenzym A
Hmgcr	„3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase“
HSC	Jaterní hvězdicové buňky
HUVEC	„Human umbilical vein endothelial cells“
IDL	Intermediate density lipoproteins“
KC	Kupfferovy buňky
LCAT	Lecitincholesterolacyltransferáza
LDL	„Low density lipoproteins“

Ldlr	LDL-receptor
L-ENG	„Long endoglin“
LPL	Lipoproteinová lipáza
LXR	„Liver X receptor“
mGSH	Mitochondiální glutathion
miR-21	Mikro RNA
MK	Mastné kyseliny
MMP-14	„Matrix metalloproteinase-14“
MTTP	„Microsomal triglyceride transfer protein“
NAFLD	„Non-alcoholic fatty liver disease“
NASH	Nealkoholová steatohepatitída
nCEH	„Neutral cholesterol ester hydrolase homolog“
NO	Oxid dusnatý
NPC1L1	„Niemann-Pick C1 like 1“
Ost β	„Heteromeric organic solute transporter“
PXP	„Pregnane X receptor“
ROS	„Reactive oxygen species“
SCAP	„Cleavage-activating protein“
sENG	Solubilní endoglin
S-ENG	„Short endoglin“
SERCA	Sarkoendoplazmatické retikulum Ca ₂ -ATPáza
Sirt-1	„Sirtuin 1“
Smad	„Small mothers against decapentaplegic“
Sp1	„Transcription factor Sp1“
TAG	Triacylglycerol
TGF- β	„Transforming growth factor beta“
TGF- β RI	TGF- β receptor I
TGF- β RII	TGF- β receptor II
TNF- α	„Tumor necrosis factor α “
VLDL	„Very low density lipoproteins“
WT _{HFD}	„wild-type“ myši krmené vysokotukovou dietou
WT _{chow}	„wild-type“ myši krmené standartní laboratorní dietou
ZP	<i>Zona pellucida</i>
ŽK	Žlučové kyseliny

Poznámka:

Zkratky uvedených transportních proteinů a biotransformačních enzymů jsou u lidí psány velkými písmeny, ale u myši malými.

12. Seznam použité literatury

Ahmad F, Sun Q, Patel D, Stommel JM. Cholesterol Metabolism: A Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Cancers*. 2019; 11(2), 146.

Albert MA, Danielson E, Ridker PM, Rifai N. Effect of statin therapy on C – reactive protein levels: The pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*. 2001; 286, 64 -70.

Alphonse PAS, Jones PJH. Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators. *Lipids*. 2016; 51(5), 519-536.

Alsamman M, Sterzer V, Meurer SK, Sahin H, Schaeper U et al. Endoglin in human liver disease and murine models of liver fibrosis-A protective factor against liver fibrosis. *Liver International*. 2018; 38, 858–867.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA et al. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res*. 1997; 25, 3389-3402.

Attisano L, Tuen Lee-Hoeflich S. The Smads. *Genome Biol* 2. 2001; 2(8), 3010.1.

Banerjee M, Robbins D et al. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases. *Drug Discov. Today* 20. 2015; 618–628.

Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, Galicia-Garcia U, Ostolaza H, Martin C. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(11), E3426.

Bi J, Ge S. Potential Roles of BMP9 in Liver Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15(11), 20656-20667.

Bláha M, Cermanová M, Bláha V. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2008; 197(1), 264-270.

Blann AD, Wang JM, Wilson PB, Kumar S. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1996; 120 (1-2), 221-226.

Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA et al. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med*. 2010; 8(1), 86.

Bordeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Journal of Clinical Investigation*. 1999; 104(10), 1343-1351.

Bordeau A, Faughnan ME, McDonald ML, Paterson AD et al. Potential Role of Modifier Genes Influencing Transforming Growth Factor- β 1 Levels in the Development of Vascular Defects in Endoglin Heterozygous Mice with HHT. *The Am. J. of Pathology*. 2001; 158(6), 2011-2020.

Brodanová M. Nealkoholová steatohepatitida. *Interní Med*. 2007; 6, 277–283.

Brodanová M. *Hepatologie v praxi: onemocnění jater a žlučových cest*. Praha: Galén, 1997.

Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase. BAREly missing a SHP. *J Lipid Res*. 2002; 43, 533-543.

DeBose-Boyd RA. Feedback Regulation of Cholesterol Synthesis: Sterol-Accelerated Ubiquitination and Degradation of HMG CoA Reductase. *Cell Res*. 2008; 18(6), 609–621.

Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*. 1998; 95 (6), 737–40.

Doleželová E, Igreja Sa IC, Prašnická A. et al. High soluble endoglin levels regulate cholesterol homeostasis and bile acids turnover in the liver of transgenic mice. *Life Sci*. 2019; 232, 116643.

Doleželová E, Prašnická A, Sá ICI, Hroch M, Hyšpler R et al. High Soluble Endoglin Levels Affect Bile Acids And Cholesterol Metabolism In Mice Liver. *Atherosclerosis*. 2019, 287, e118.

Drábek J, Pročke M, Šťovíček J. Vybrané kapitoly z hepatologie. Praha: Karolinum, 2012. 32-34.

Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M et al. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34→qter. Cytogenetic and Genome Research. 1993; 64(3-4), 204-207.

Finnson KW, Philip A. Endoglin in liver fibrosis. Journal of Cell Communication and Signaling. 2012, 6(1), 1-4.

Floch MH. Bile salts, intestinal mikroflóra and enterohepatic circulation. Digest Liver Dis. 2002; 34(2), 54-7.

Gao F, Ihn HE, Medina MW, Krauss RM. A common polymorphism in the LDL receptor gene has multiple effects on LDL receptor function. Human Molecular Genetics. 2013; 22 (7), 1424–1431.

Garcia-Monzón C, Martin-Perez E, Lo lacono O, Fernandez-Bermejo M et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. Journal of Hepatology. 2000; 33, 716-724.

García-Pozo L, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, García-Monzón C. Endoglin: structure, biological functions and role in fibrogenesis. Rev Esp Enferm Dig. 2008; 100(6), 355-360.

Goldstein JL, Brown MS. The ldl receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia. Ann. Rev. Genet. 1979; 13, 259-89.

Gore B, Izikki M, Mercier O. Key Role of the Endothelial TGF- β /ALK1/Endoglin Signaling Pathway in Humans and Rodents Pulmonary Hypertension. PLoS ONE. 2014, 9(6), e100310.

Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. J Immunol. 1988; 141(6), 1925-1933.

Holeček M. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. Praha: Grada, 2006; 286-288.

Horák J, Ehrmann J. Hepatologie do kapsy. Praha: Mladá fronta. 2014; 100-102.

Hůlek P, Dresslerová I. Nealkoholové ztučnění jater v klinické praxi (NAFL). Interní Med. 2015; 17(5), 224–226.

Chalasani NP, Sanyal AJ, Kowdley KY, Robuck PR et al. NASH CRN Research Group. Pioglitazone versus vitamin E versus placebo for the treatment of non-diabetic patients with NASH: PIVENS trial design. Contemp Clin Trials. 2009; 30, 88–96.

Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J a Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptro system in human endothelial cells. J Biol Chem. 1992; 267(27), 19027-19030.

Chiang JYL, Ferrell JM. Bile acid metabolism in liver pathobiology. Gene Expr. 2018; 18(2), 71–87.

Ioannou GN. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2016, 27(2), 84-95.

Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, CarrÚn R, Sanz-Rodríguez F, et al. Endoglin regulates nitric oxide-depend vasodilatation. The FASEB Journal. 2004; 18(3), 609-611.

Joyce CH, Freeman L, Brewer HB, Santamarina-Fojo S. Study of ABCA1 Function in Transgenic Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23, 965-971.

Kasper H. Výživa v medicíně a dietetika. Praha: Grada, 2015; 24-28.

Kenneth WF, Anie P. Endoglin in liver fibrosis. J. Cell Commun. Signal. 2012; 6, 1–4.

Kerr TA, Davison NO. Cholesterol and nonalcoholic fatty liver disease: Renewed focus on an old villain. Hepatology. 2012, 56(5), 1995-1998.

Kohjima M, Higuchi N, Katoh M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*. 2008; 21, 507-511.

Koleva RI, Conley BA, Riley KS, Romero D et al. Endoglin structure and function: determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor- β receptors. *J Biol Chem*. 2006; 281, 25110–25123.

Koolman J, Röhm KH. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada. 2012. 156-162.

Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, Bernabeu C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J*. 1994; 301(3), 765-768.

Lastres P, Bellon T et al. Regulated expression on human macrophages of endorfin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J. Immunol* 1992; 22, 393-397.

Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, Kamel IR, Brancati FL, Guallar E, Clark JM. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ*. 2011; 343, d6891.

Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RLC, Valdimarsdottir G, Thorikay M et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *The EMBO Journal*. 2004; 23, 4018-4028.

Lebrin F, Martine Deckers, Philippe Bertolino, Peter ten Dijke. TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovascular Research*. 2005; 65(3), 599–608.

Li C, Guo B, Bernabeu C, Kumar S. Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc Res Tech*. 2001; 52(4), 437–449.

Li DY. Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin. *Science*. 1999; 284(5419), 1534-1537.

Liqing Y, Li-Hawkins J, Hammer RE et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest.* 2002; 110(5), 671-680.

López-Nova JM, Bernabeu C. ENG (Endoglin). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* In press. 2012; 1768-3262.

López-Nova JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2010; 299(4), 959-974.

Luft FC. Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a preeclampsia molecule. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(11), 3052–3054.

Lumbada H, Vecka M, Cholesterol: A Friend or Foe? *Chem. Listy,* 2009, 103(1), 40–51.

Maring JA., Trojanowska M, Ten Dijke P. Chapter Eight - Role of Endoglin in Fibrosis and Scleroderma. *Academic Press.* 2012; 297, 295-308.

Meurer SK, Wimmer AE, Leur EV, Weiskirchen R. Endoglin Trafficking/Exosomal Targeting in Liver Cells Depends on N-Glycosylation. *Cells.* 2019, 8(9), E997.

Meurer SK, Alsamman M, Scholten D, Weiskirchen R. Endoglin in liver fibrogenesis: Bridging basic science and clinical practice. *World J Biol Chem.* 2014; 5(2), 180-203.

Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E et al. Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cellular Signalling.* 2011; 23(4), 683-699.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Progress in Lipid Research.* 2013, 52(1), 175-191.

Nachtigal P, Zemankova L, Rathouska J, Straský Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012; 224 (1), 4-11.

Nakamura M, Fujino T, Yada R, Yada Matsutake K, Yoshimoto T, Harada N, Higuchi N et al. Impact of cholesterol metabolism and the LXR α -SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol MED*. 2009; 23(5), 603-608.

Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A et al. Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. *Anticancer Research*. 2011; 31(6), 2283–2290.

Oujo B, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C, Lopez-Novoa J. Membrane and Soluble Forms of Endoglin in Preeclampsia. *Current Molecular Medicine*. 2013; 13(8), 1345-1357.

Pérez-gómez E, Del castillo G, Santibáñez JF, Lêpez-Novoa JM, Bernabéu C, Quintanilla M. The Role of the TGF- β Coreceptor Endoglin in Cancer. *The Scientific World Journal*. 2010; 10, 2367-2384.

Potter B. Liver-Cholesterol and Bile Formation. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007; 1-10.

Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010; 51, 121–129.

Příbramská V, Trumpešová H, Nealkoholická steatohepatitida-součást metabolického syndromu. *Med. Pro Praxi*. 2008; 5(5), 193–195.

Quintio E, Grundy SM, Ahrens EH. Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *Journal of lipid research*. 1971; 12, 233-247.

Rathouská J, Ježková K, Němečková I, Nachtigal P. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*. 2015; 243(2), 383-388.

Ray BN, Lee NY, How T, Blobe GC. ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration. *Carcinogenesis*. 2010; 31(3), 435-441.

Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, et al. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol.* 2007; 210, 456-468.

Shen W, Azhar S, Kraemer FB. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu. Rev. Physiol.* 2018; 80, 95–116.

Schneiderka P. Kapitoly z klinické biochemie. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 365.

Smolej L, Andrys C, Belada D, Maisnar V, Žák P, Široky O, Malý J, Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu u nemocných s lymfoidními malignitami. *Trans. Hemat. dnes.* 2006; 12(1), 37–39.

Sobolová L. Ezetimib-první zástupce selektivních inhibitorů cholesterolové absorpce. *Klinická farmakologie a farmacie.* 2005; 19: 22–26.

St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology.* 1994; 134(6), 2645–2657.

Stráský Z, Vecerova L, Rathouská J, Slanařová M, Brčáková E et al. Cholesterol Effects on Endoglin and Its Downstream Pathways in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *Circulation Journal.* 2011; 75(7), 1747-1755.

Sun Ch, Feizhou H, Xunyang L, Xuefei X et al. MiR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *International Journal of Molecular Medicine.* 2015; 35(3), 847-853.

Svačina Š. *Klinická dietologie.* Praha: Grada, 2008; 170-179.

Tian F, Zhou AX, Smits AM, Larsson E et al. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 392, 283-288.

Trunečka P. Nealkoholická steatohepatitida a možnosti její léčby. *Remedia*. 2007; 17, 367 - 371.

Vaz F, Ferdinandusse S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017, 56, 10-24.

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006; 12(6), 642-649.

Vitverová B, Blažíčková K, Najmanova I. Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta. *Atherosclerosis*. 2018; 271, 15–25.

Wiersma H, Nijstad N, Gautier T et al. Scavenger receptor BI facilitates hepatic very low density lipoprotein production in mice, *J Lipid Res*. 2010; 51, 544–553.

Yokode M, Hammer RE, Ishibashi S et al. Diet-induced hypercholesterolemia in mice: prevention by overexpression of LDL receptors, *Science*. 1990; 250, 1273–1275.

Young-Saeng Jang, In-Hong Choi. Contrasting Roles of Different Endoglin Forms in Atherosclerosis. *Immune Netw*. 2014; 14(5), 237-240.

Zagorová M, Kadova Z, Prasnicka A et al. Boldine attenuates cholestasis associated with nonalcoholic fatty liver disease in hereditary hypertriglyceridemic rats fed by high-sucrose diet, *Physiol. Res*. 64, 2015; 467–476.

Zavoral M, Venerová J. *Gastroenterologie a hepatologie*. Praha: Triton, 2007; 91-92.