

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



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

Diplomová práce

Barbora Jiroušková

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 jí 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:

Barbora Jiroušková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu diplomové práce prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za zaštitění mé práce, mojí školitelce PharmDr. Evě Doleželové, Ph.D. za vstřícnost, ochotu a odborné vedení mé diplomové práce a dále také Mgr. Ivone Cristina Igreja Sà za realizaci a dohled nad praktickou částí mé diplomové práce, a za seznámení s molekulárně-biologickými metodami.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, za dlouholetou podporu při studiu.

Abstrakt

Barbora Jiroušková

Vliv solubilního endoglinu na metabolismus žlučových kyselin v játrech u transgenických myší s vysokotukovou dietou

Diplomová práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce:

Při metabolických onemocněních jako je hypercholesterolémie nebo inzulinová rezistence byly prokázány zvýšené plazmatické koncentrace solubilního endoglinu (sEng). Podkladem pro vznik NASH („Non-alcoholic steatohepatitis“) jsou právě metabolická onemocnění a nevhodná dieta. Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda vysoké plazmatické hladiny sEng ovlivňují metabolismus žlučových kyselin v játrech u myší, které jsou krmené vysokotukovou dietou, která indukuje NASH.

Metody:

V experimentu byli použiti tři měsíce staří myší samci s podkladem CBAxC57BL/6J ($n = 8$, v každé skupině): 1) „wild-type“, kteří byli po dobu 6 měsíců krmeni standartní dietou (WT_{chow}); 2) „wild-type“ myší samci krmeni vysokotukovou dietou (cholesterol, glukóza a fruktóza) (WT_{HFD}); 3) samci exprimující lidský sEng ($sENG_{HFD}$), kteří byli krmeni vysokotukovou dietou, glukózou a fruktózou. Pro zjištění toku žluče byla provedena *in vivo* kinetická studie. Expres transportních proteinů zodpovědných za transport žlučových kyselin byla provedena na úrovni mRNA a proteinu pomocí metody qRT-PCR a Western blot.

Výsledky:

Vysoké hladiny solubilního endoglinu neovlivnily homeostázu ŽK a expresi transportních mechanismů v hepatocytu (Ntcp, Bsep, Mrp2, Mrp3, Mrp4). Snížená exprese Bsep transportního proteinu u obou skupin myší s HFD dietou by mohla vysvětlovat snížení toku žluči u těchto zvířat.

Závěr:

Vysoké hladiny solubilního endoglinu významně neovlivňovaly homeostázu ŽK během NASH.

Abstract

Barbora Jiroušková

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

Diploma thesis

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Pharmacy

Background:

Increased plasma concentrations of soluble endoglin (sEng) have been demonstrated in metabolic disorders such as hypercholesterolemia or insulin resistance. Metabolic diseases and inappropriate diet are the basis for the development of NASH (Non-alcoholic steatohepatitis). The aim of this diploma thesis was to determine how high plasma concentrations of sEng affect the bile acids metabolism in the liver of mice fed with high-fat diet, which induced NASH.

Methods:

Three-month-old male mice with CBAxC57BL/6J base (n = 8, in each group) were used in experiment: 1) “wild-type”, which were fed a standard diet (WT_{chow}) for 6 months; 2) “wild-type” male mice fed a high fat diet (cholesterol, glucose and fructose) (WT_{HFD}); 3) males expressing human sEng (sENG_{HFD}) which were fed a high fat diet, glucose and fructose. *In vivo* kinetic study was performed to determine bile flow. Expression of transport proteins responsible for bile acids transport was performed at mRNA and protein level by qRT-PCR and Western blot.

Results:

High levels of soluble endoglin did not significantly affect BA homeostasis and expression of transport mechanisms in hepatocytes (Ntcp, Bsep, Mrp2, Mrp3, Mrp4). Decreased Bsep protein expression in both groups of mice on HFD diet could explain the reduction in bile flow observed in these animals.

Conclusions:

High levels of soluble endoglin did not significantly affect BA homeostasis during NASH.

Obsah

Úvod	10
1. Teoretická část	11
1.1 Játro	12
1.1.1 Anatomie a morfologie jater	12
1.1.2 Jaterní krevní oběh	14
1.2 Endoglin	14
1.2.1 Exprese endoglinu	15
1.2.2 Struktura a funkce endoglinu	15
1.2.3 Role endoglinových forem v cévní patologii	19
1.3 Solubilní endoglin v játrech	20
1.4 Metabolismus žlučových kyselin	22
1.4.1 Žlučník a žlučové cesty	22
1.4.2 Tvorba žluče a metabolismus žlučových kyselin	22
1.4.3 Enterohepatální cirkulace	26
1.4.4 Regulace syntézy ŽK	26
1.4.5 Jaderné receptory aktivované žlučovými kyselinami.	29
1.4.6 Transportní mechanismy v játrech	33
1.5 NAFLD	36
1.5.1 Patogeneze	37
1.5.2 NASH	38
1.5.3 Experimentální modely NAFLD/NASH	42
2. Cíl diplomové práce	44
3. Praktická část	45
3.1 Metodiky	46
3.1.1 Chemikálie	46

3.1.2	Pokusná zvířata	46
3.1.3	Kvantitativní RT-PCR	46
3.1.4	Western blot analýza	48
3.1.5	Statistická analýza dat	49
3.2	Výsledky	50
3.2.1	<i>In vivo</i> kinetická studie	50
3.2.2	qRT-PCR	51
3.2.3	Western Blot	52
3.3	Diskuze	54
3.4	Závěr	57
4.	Seznam použitých zkratk	58
5.	Seznam použité literatury	61

Úvod

Endoglin (ENG, CD105 nebo receptor TGF- β typu III) byl poprvé objeven v 80. letech minulého století, jako marker lidských endotelových buněk. Je přítomen na plazmatických membránách mnohých buněk např. endotelových buněk, fibroblastů, makrofágů, placentárních syncytiotrofoblastů nebo jaterních hvězdicových buněk. Exprese endoglinu byla prokázána v cévách trpících aterosklerózou, hlavně v endotelových buňkách a buňkách hladkého svalstva. Endoglin hraje určitou roli v aterogenezi. Exprese endoglinu také souvisí s revitalizací stěny cév, expresí eNOS v endotelu, tvorbou kolagenu a stabilizací aterosklerotických lézí.

Solubilní forma endoglinu (sEng) vzniká štěpením endoglinu vázaného na membránu pomocí enzymu *metaloproteináza 14*. Zvýšené hladiny sEng jsou často zaznamenávány u metabolických onemocnění (např. ateroskleróza, Diabetes mellitus typu II), které jsou doprovázeny hyperchoesterolémií.

Podkladem pro vznik NASH („Non-alcoholic steatohepatitis“) jsou právě zmíněná metabolická onemocnění, hyperchoesterolémie a nevhodná dieta.

Předchozí studie prováděná na zdravých myších se standartní dietou potvrdila, že vysoké hladiny sEng ovlivňují homeostázu žlučových kyselin na základě komplexních účinků sEng na játra. Nebyla však provedena studie, která by se zabývala vlivem sEng na játra, která jsou již v důsledku nevhodné diety poškozena onemocněním NASH.

1. Teoretická část

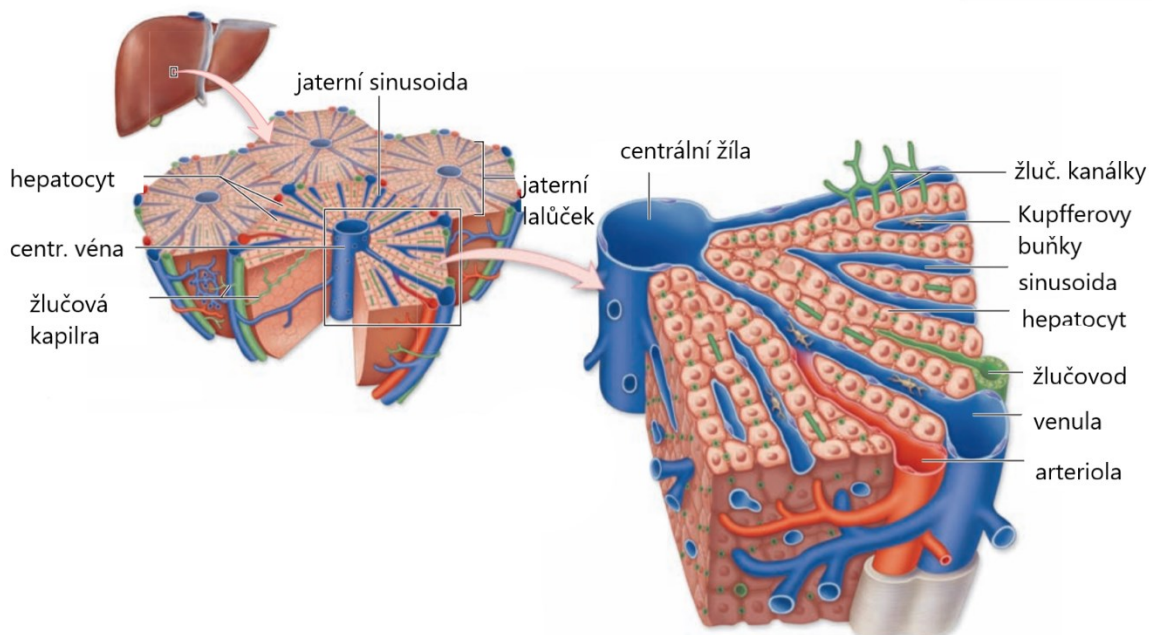
1.1 Játra

Játra (*hepar*) jsou největší exokrinní žlázou v lidském těle. Jsou uložena v dutině břišní, pod bránicí, váží přibližně 1500 g a proteče jimi asi 1,5 l krve/min. Tvoří tak důležitý převodník mezi živinami, přicházejícími ze střeva, krví a žlučí. Játra jsou centrálním úložištěm živin, jako je například glykogen, lipidy či bílkoviny. Pro svou metabolickou a detoxikační funkci jsou důležitým čistícím centrem celého těla. Látky, které do jater přicházejí buď *venou portae* nebo lymfatickým systémem jsou zpracovány v hepatocytu a následně odvedeny, buď do krve nebo do žluče. Žluč je exokrinním sekretem jater a umožňuje trávení lipidů a vitaminů rozpustných v tucích (1).

1.1.1 Anatomie a morfologie jater

Podle uložení jater do dutiny břišní rozdělujeme tento orgán na část přiloženou k bránici – *facies diaphragmatica* a dále na část obrácenou k břišním orgánům – *facies visceralis*. V předu jsou tyto plochy odděleny ostře *margo inferior*, zatímco na zadní straně jater přechází plynule jedna do druhé. Další způsob, jak lze játra rozdělit je podle laloků a těmi jsou: *lobus dexter, sinister, quadratus* a *caudatus*.

Hlavní stavební složkou jater je **hepatocyt** neboli jaterní buňka (Obr. 1). Tato buňka je specifického polyedrického tvaru a obsahuje jedno až dvě jádra. Jaterní buňky jsou seskupeny do **trámců**, a ty jsou pak uskupeny do **jaterního lalůčku** (*lobulu*), což je základní morfologická jednotka jater. Mezi trámci se vyskytuje oblast sinusoid (2).



Obrázek 1. Detail jaterního lalůčku. Převzato z (2), upraveno.

Jaterní lalůčky jsou často v těsném kontaktu, a proto nelze přesně vymezit jejich plochu. V některých úsecích lalůčky ale i přesto sousedí s vazivem, v němž je uložen takzvaný portobiliární prostor. Těchto prostor je okolo lalůčku 3 - 6 a ukrývá se v něm **trias hepatica** složená z *venuly*, *arterioly* a žlučovodu (*ductus bilifer interlobularis*). *Venula* je odnož *vena portae* a přináší do jaterního lalůčku odkysličenou krev plnou živin ze střev. *Arteriola* je větev *arteria hepatica*, která nese okysličenou krev a vyživuje jaterní tkáň. Žlučovod odvádí z jaterního lalůčku žluč a ta se nakonec vlévá do *ductus hepaticus*. V portobiliárním prostoru jsou uloženy také lymfatické cévy, které vedou lymfu a vyúsťují do krevního řečiště.

Jaterní sinusoida a její okolí je další specifický jaterní prostor. Samotná sinusoida se nachází mezi trámcí hepatocytů. Sinusoida je kapilára tvořená endotelovou buňkou, která je velmi propustná zejména díky fenestracím v endotelové buňce a nekompletní bazální membráně. Hepatocyt a tyto endotelové buňky od sebe dělí pouze **Disseho prostor**, do nějž zasahují mikrokly hepatocytů a dále se zde vyskytují retikulární vlákna. Ve vrstvě endotelu sinusoid se nachází další dva typy buněk. Prvním z nich jsou **Kupfferovy buňky**, které v játrech plní funkci makrofágů, odbourávají staré erytrocyty a tráví jejich hemoglobin. Dalším typem jsou **Itovy buňky**, které mají hvězdicovitý tvar a ukládají tuky. Jejich úloha spočívá v uskladňování vitamínu A

vstřebaného ve střevě, avšak zatím nebyla objasněna cesta jeho metabolismu ani transportu.

Sinusoidy napodobují jakési cévní prostory, sbíhající se od kraje jaterního lalůčku do středu. Tok krve začíná z okraje lalůčku, a to zásobováním z *venul* a dále z jaterních *arteriol*. Krev teče následně do centrálních vén (1, 3).

1.1.2 Jaterní krevní oběh

Játra přijímají krev ze dvou zdrojů – z *vena portae*, ta vede ze střev krev odkysličenou, ale bohatou na živiny a dále z *arteria hepatica*, která vede krev okysličenou.

Vena portae se dělí na portální venuly, které prochází buď přes portobiliární prostor nebo obkružují jaterní lalůček a importují krev do sinusoid. Krev se sinusoidami dostává do středu jaterního lalůčku, do centrální vény. Následně tato véna opouští lalůček a vlévá se do sublobulární vény a ta dále do *vena hepatica*. Následně krev končí ve *vena cava inferior*. Celý žilní oběh má za úkol transportovat do jater odkysličenou krev z břišních orgánů (např. žaludku, střeva).

Arteriální oběh, zprostředkovává zásobení jater kyslíkem. *Arteria hepatica* se dělí na interlobulární arterioly. Tato krev proniká až do sinusoid, a tudíž sinusoidou protéká směs krve, jak okysličené, tak odkysličené.

V rámci jaterního lalůčku je krev transportována z periferie směrem ke středu. Okolní hepatocyty, které jsou na periférii jaterního lalůčku, tak z krve přijímají určité látky a kyslík a hepatocyty, které se vyskytují na opačném konci, u centrální vény, jsou o látky v krvi obsažené již ochuzeny. Tím pádem se liší výživa a okysličení hepatocytů podle toho, kde se hepatocyt v jaterním acinu nachází. Tento rozdíl „výživy“ se projevuje hlavně v patologických procesech, kdy se změny na buňkách přednostně objevují buď na periférii nebo centrálně (1).

1.2 Endoglin

Endoglin (ENG, CD105 nebo endoglinový receptor TGF- β typu III) byl poprvé objeven v 80. letech minulého století, jako marker lidských endotelových buněk, rozpoznávaný monoklonální protilátkou 44G4, vytvořenou proti pre-B leukemické linii

buněk (4). Později se ukázalo, že endoglin je přítomen i na plazmatických membránách jiných buněk, např. fibroblastů, makrofágů, placentárních syncytiotrofoblastů nebo jaterních hvězdicových buněk (5). Je to homodimerický transmembránový glykoprotein s molekulovou hmotností 180 kDa (4, 5).

1.2.1 Exprese endoglinu

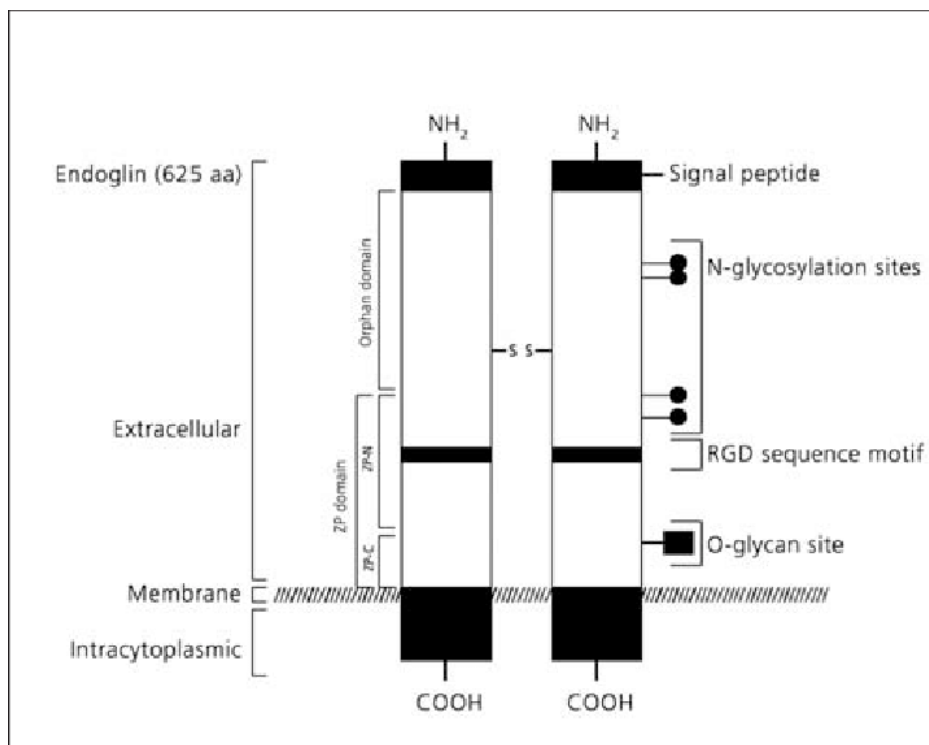
Lidský gen kódující endoglin se nachází na chromozomu 9, a to v jeho dlouhém raménku. Tento protein je homodimerický, protože oba jeho monomery spojené disulfidickými můstky jsou stejné (5). Exprese endoglinu byla prokázána v cévách trpících aterosklerózou, hlavně v endotelových buňkách a buňkách hladkého svalstva. Endoglin se vyskytuje jak u lidí, tak u myši a hraje určitou roli v aterogenezi. Exprese endoglinu také souvisí s opravou stěny cév, expresí eNOS v endotelu, tvorbou kolagenu a stabilizací aterosklerotických lézí. Zvýšené hladiny solubilního endoglinu byly navíc u lidí spojeny s akutním infarktem myokardu, hypercholesterolémií a diabetem mellitem (6).

1.2.2 Struktura a funkce endoglinu

Z hlediska umístění zasahuje větší část endoglinu do prostoru nad membránou. Tato hydrofobní extracelulární doména je tvořena 561 aminokyselinami, zatímco intracelulární část je složena ze 47 aminokyselinových zbytků, které jsou bohaté na serin a threonin. Každý monomer se skládá ze tří dobře identifikovatelných částí. Na N-konci obsahuje velká doména aminokyselinové zbytky Glu26-Ile359. Tento fragment nevykazuje žádnou homologní podobnost s ostatními proteinovými rodinami a nazývá se **sirotčí doména** (4). Lidský endoglin obsahuje peptidickou frekvenci **RGD** („Arginylglycylaspartic acid“), která je místem adheze mnoha dalších proteinů pohybujících se v extracelulární matrix (Obr. 2) (7).

Strukturálně patří endoglin do tzv. ZP („Zona pellucida-like domain“) proteinové rodiny. Jedná se o rozsáhlý extracelulární region obsahující 260 aminokyselin, který přisedá těsně k membráně. Tato doména byla pozorována v různých receptorových eukaryotických glykoproteinech. Funkční a krystalografické studie odhalily, že region“ ZP domény“ společný pro všechny tyto receptory je polymerizační proteinový modul,

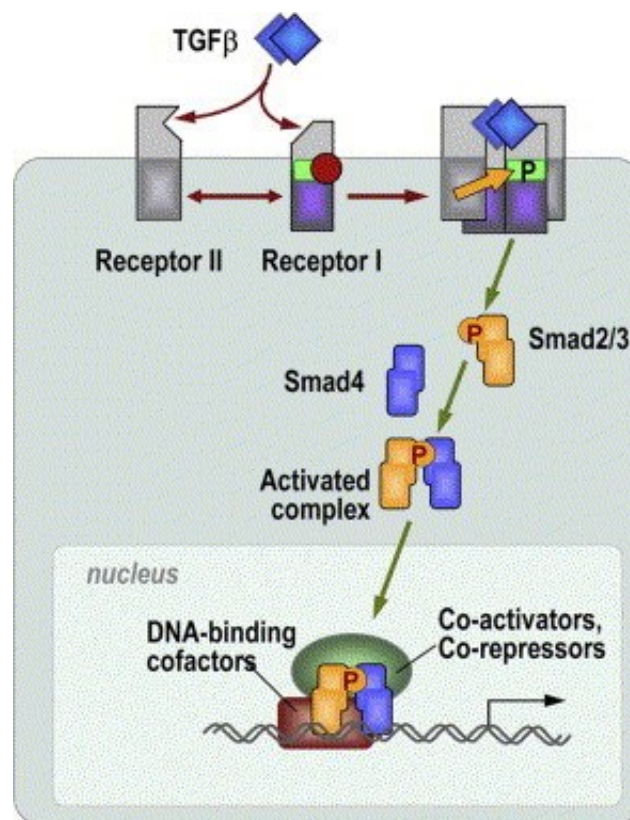
který se skládá ze dvou odlišných, ale strukturálně příbuzných domén ZP-N a ZP-C. ZP modul je umístěn v C-terminální části extracelulární oblasti, s výjimkou nepolymerního člena rodiny endoglinů a obsahuje 8 až 10 Cys zbytků, které jsou zapojeny do disulfidových vazeb (8). ZP doména je důležitá pro správnou funkci endoglinu (4).



Obrázek 2. Struktura endoglinu. Převzato z (4).

Endoglin ovlivňuje TGF- β signalizační dráhu a také vaskulární homeostázu. Členové nadrodiny TGF- β , kam patří BMP („Bone morphogenetic protein“), aktivin a podrodiny TGF- β , regulujících mnoho různých procesů v kardiovaskulárním systému, včetně vývoje srdce a angiogeneze. Důležitost signalizace TGF- β v kardiovaskulárním systému je zdůrazněna pozorováním, že genetická delece několika členů TGF- β , jejich receptorů nebo signalizačních proteinů u myši vede k úmrtí většiny mutantů z důvodu závažných defektů při novotvorbě cév. Členové nadrodiny TGF- β přenáší signál pomocí receptorů typu I a II umístěných na povrchu buněčných membrán, které vedou signál a receptorů typu III a koreceptorů, které patří do nesignalizační složky této kaskády. Receptory typu I a II jsou **serin/threonin kinázy** a jsou zapojeny do downstream TGF- β signalizace, zatímco **koreceptory, včetně endoglinů a betaglykanů**, jsou proteiny bez známých signálních motivů. Jádru signální dráhy TGF- β obsahuje nejméně 7 receptorů typu I (také známých jako ALK „Activin-like kinase“ receptory) a 5 receptorů typu II (9).

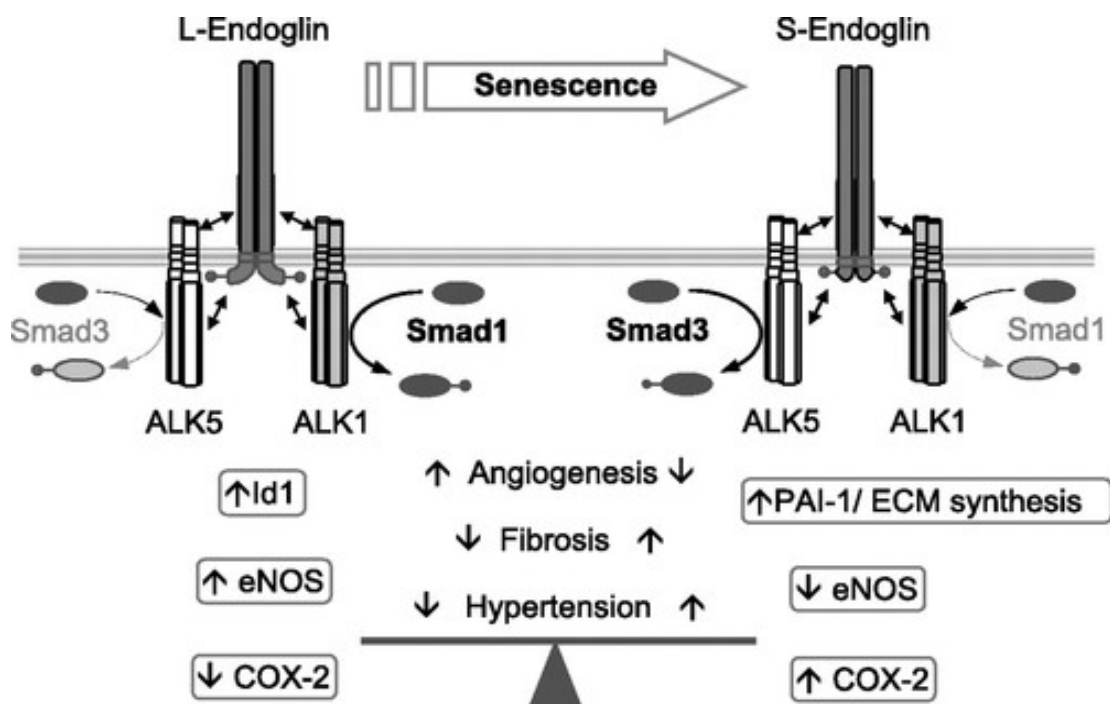
Receptory typu I zahrnují **BMP** (ALK1, ALK2, ALK3 a ALK6), **aktivin** (ALK1, ALK2, a ALK4) a **TGF- β** (ALK1, ALK2 a ALK5) receptory. Po navázání ligandu, receptor typu II fosforyluje receptor typu I, který následně šíří signál pomocí receptorů rodiny Smad proteinů (R-Smad a S-mad1, -2, -3, -5 a -8), které opět fosforyluje. Poté R-Smad tvoří heteromerní komplexy se spolupracujícím homologem, tzv. Co-Smad (Smad4). Tyto komplexy jsou translokovány do jádra, kde regulují transkripční aktivitu cílových genů (Obr. 3) (10).



Obrázek 3. TGF- β signální kaskáda Smad. Převzato z (10).

Endoglin tvoří proteinový komplex s TGF- β receptory typu I (ALK1 a ALK5) a typu II s ligandy. Několik členů nadrodiny TGF- β , včetně **TGF- β 1** a **TGF- β 3** (nikoli však TGF- β 2) **aktivinu-A**, **BMP-7** a **BMP-2**, jsou schopny vázat endoglin a tato vazba vyžaduje přítomnost odpovídajících signálních receptorů. Naproti tomu endoglin je schopen vázat **BMP-9** v nepřítomnosti signálních receptorů. Zajímavé je, že BMP-9 se ukázal jako specifický ligand ALK1 a mezi účinky závislé na BMP-9 patří **inhibice proliferace a migrace endotelových buněk *in vitro***, stejně jako inhibice neoangiogeneze *in vivo*. Zdá se, že tyto účinky BMP-9 jsou zprostředkovány receptorovým komplexem

tvořeným ALK1, receptorem BMP typu II a endoglinem. Endoglin moduluje vazbu a signalizaci ligandu asociací s ALK1 a ALK5 (Obr. 4). Tyto receptory typu I aktivují signální dráhy prostřednictvím Smad-1, -5 a -8 (ALK1) nebo Smad-2 a -3 (ALK5), aby mimo jiné regulovaly proangiogenní inhibitor ID1 („DNA-binding protein inhibitor“ hraje roli v buněčném růstu a diferenciaci) nebo PAI-1 („Plasminogen activator inhibitor-1“ ovlivňuje fibrin a trombin) (11, 12). Rovnováha mezi signálními cestami **ALK1** a **ALK5** v endotelových buňkách a VSMC („Vascular smooth muscle cells“) hraje klíčovou roli při **remodelaci cév a angiogenezi**, ačkoli přesné molekulární mechanismy musí být ještě objasněny. Endoglin se jeví jako esenciální modulátor rovnováhy mezi signalizací ALK1 a ALK5. Mechanismus, kterým endoglin zesiluje signalizaci TGF- β /ALK1, zahrnuje přímé spojení ALK1 s cytoplazmatickou a extracelulární doménou endoglinu, zatímco extracelulární doména zprostředkovává zesílení signalizace ALK1 (7).



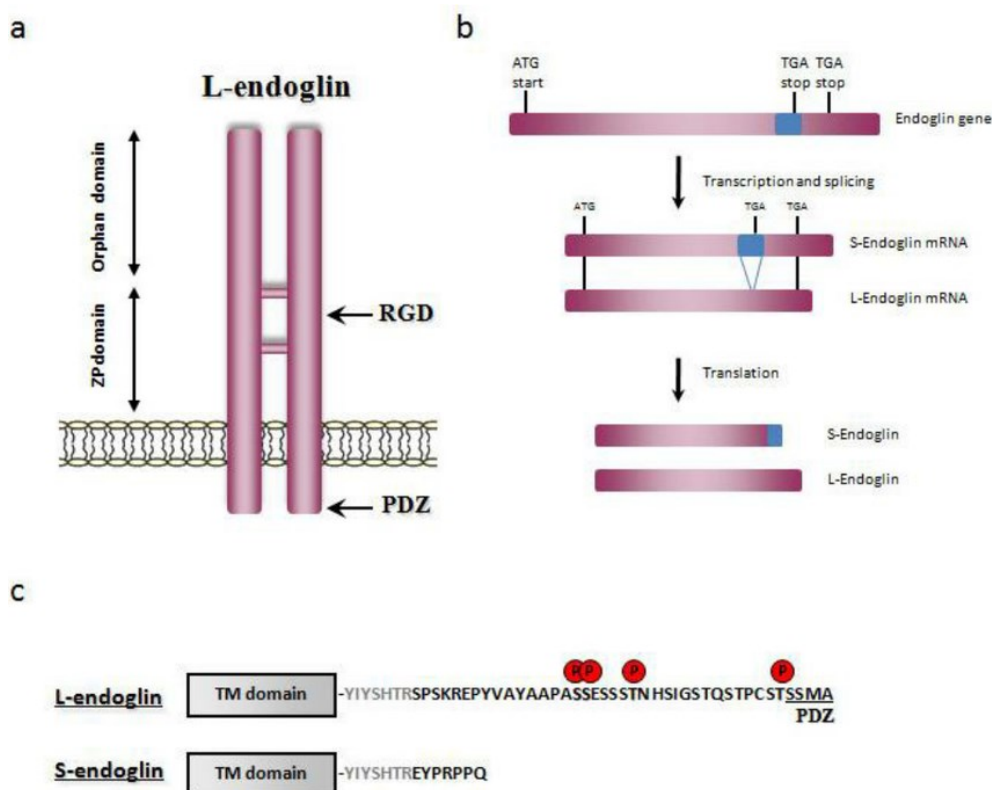
Obrázek 4. Vyjadřuje změnu L-endoglinu („Long-endoglin“) na S-endoglin („Short-endoglin“) pomocí senescence (stárnutí) buněk a ukazuje tak tvorbu jakéhosi „přepínače“ ke spuštění kardiovaskulární patologie. Z obrázku je patrné i zvýšení hladin COX-2 („Cyclooxygenase 2“), které je následkem snížení hladin L-eng (13), což bylo potvrzeno i na tkáních transgenních myší (14). Převzato z (7).

Tomuto tvrzení přispívá také skutečnost, že patogenní mutace v genech pro endoglin nebo ALK1 vedou k HHT (hereditární haemorrhagická telangiectasie = dědičné onemocnění drobných cév, u kterých dochází k dilataci a zvýšené krvácivosti) (15).

Extracelulární a cytoplazmatická doména endoglinu také interaguje s ALK5 a receptorem typu II, ale ALK5 interaguje s endoglinovou cytoplazmatickou doménou pouze tehdy, když je kinázová doména neaktivní. Po spojení ALK-5 a receptoru typu II fosforylují endoglinovou cytoplazmatickou doménu - ALK5, ale ne receptor typu II. ALK5 se následně z komplexu odpojuje. Tento objev značí hypotézu, že extracelulární a cytoplazmatické části endoglinu hrají v signalizaci odlišné role (7, 16).

1.2.3 Význam různých izoforem endoglinu v cévní patologii

Předchozí informace o endoglinu se vztahují na jeho nejvíce zastoupenou formu, a to membránově vázaný L-endoglin. Byla však popsána další izoforma membránového endoglinu, která se vytvořila pomocí alternativního sestřihu stejného genu, což vedlo ke vzniku S-endoglinu (Obr. 5).



Obrázek 5. Schéma L a S izoforem endoglinu. Převzato z (17).

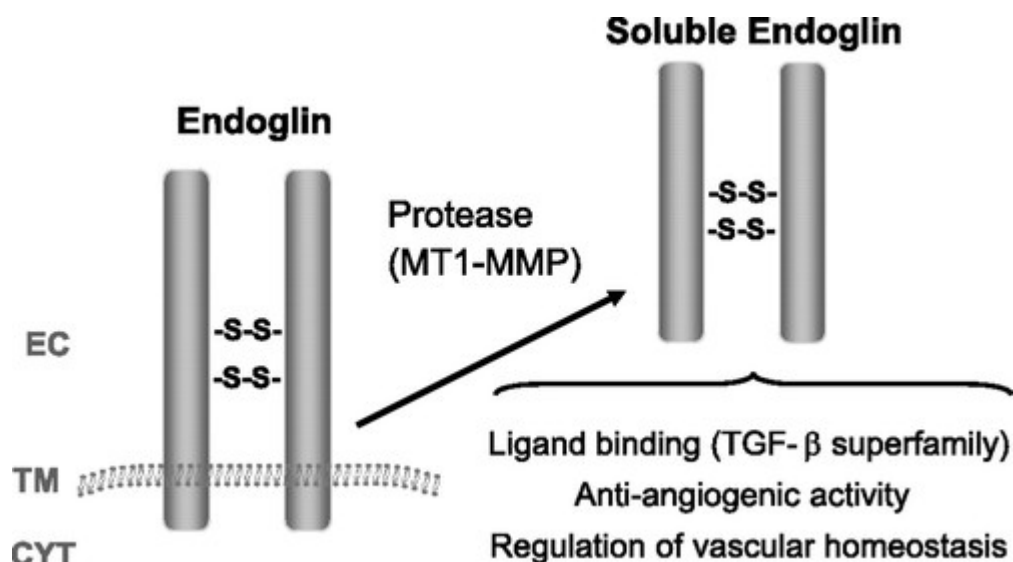
U lidí je S-endoglin v cytoplazmatické části o 33 aminokyselin kratší než L-endoglin a studie porovnávající tyto dvě izoformy odhalily jejich odlišné funkce. S-endoglin ve studiích vykazoval antiangiogenní účinek (18), na rozdíl od proangiogenní role L-endoglinu (19). Důkazem byla studie, kde myši transgenní pro lidský S-endoglin vykazovaly zpožděný růst nádoru, podobně jako myši s deficitem v L-endoglinu (20).

S-endoglin se také podílí na senescenci (stárnutí) endotelových buněk. Poměr izoform S-endoglinu ku L-endoglinu se zvyšuje během stárnutí lidských endotelových buněk *in vitro*, stejně jako v myších tkáních (14). Odlišná funkce S- a L-endoglinu zřejmě pramení z jejich odlišných drah signalizace, kdy se impuls od různé izoformy vydává různým směrem. V myoblastech a endotelových buňkách, L-endoglin podporuje cestu ALK1/ID1, zatímco S-endoglin upřednostňuje cestu ALK5/PAI-1. Tyto odlišné cesty se pak výrazně projeví v expresi TGF- β 1 indukovaného kolagenu a v inhibici buněčné proliferace.

Mechanismus podtrhující odlišné chování těchto izoform by mohl spočívat i v odlišné afinitě k TGF- β receptorům. Interakce S-endoglinu s ALK5 je silnější než s ALK1 a přesný opak platí pro L-endoglin. Z toho lze vyvodit, že poměr S-endoglinu a L-endoglinu v endotelových buňkách může přispívat k vyvážení signálu TGF- β , díky tomu, že L-endoglin je více afinitní k ALK1 a volí si cestu ALK1/ID1 (proangiogenní) oproti S-endoglinu, který je více afinitní k ALK5 a volí si cestu ALK5/PAI-1 (antiangiogenní). Obr. 4 vyjadřuje změnu L-endoglinu na S-endoglin pomocí senescence (stárnutí) buněk a ukazuje tak tvorbu jakéhosi „přepínače“ ke spuštění kardiovaskulární patologie. Z obrázku je patrné i zvýšení exprese COX-2 jako následek snížené exprese L-endoglinu (13), což bylo potvrzeno i na tkáních transgenních myší (14).

1.3 Solubilní endoglin v játrech

Solubilní forma endoglinu (sEng) je protein, který vzniká štěpením endoglinu vázaného na membránu. Toto štěpení zprostředkovává enzym *metalloproteináza 14* („Metalloproteinase 14“ MMP14) (Obr. 6) (21). Solubilní endoglin byl detekován pomocí analýzy ELISA v plazmě, séru a moči u pacientů s různými patologickými onemocněními jako jsou například nádorová onemocnění, preeklampsie, kardiovaskulární a metabolická onemocnění typu hypercholesterolemie, Diabetes mellitus typ II (DM II), arteriální hypertenze nebo jaterní onemocnění (22).



Obrázek 6. Odštěpení solubilního endoglinu. Převzato z (23).

Zajímavé je, že sEng lze považovat za biomarker u onemocnění souvisejících s endotelovou dysfunkcí a/nebo může být sám induktorem endotelové dysfunkce. Zároveň odráží účinnost některých terapeutických intervencí jako je například léčba statiny nebo LDL aferéza, které prokazatelně snižují hladiny sEng. Naproti tomu, sEng může ovlivnit signalizaci TGF- β / e-NOS nebo BMP-9, což naznačuje jeho roli ve vývoji endoteliální dysfunkce (6).

Je podstatné zmínit, že sEng se jeví sice jako biomarker těchto onemocnění, ale může být potencionálně i proteinem, který se těmto patologickým stavům snaží zabránit (22). Vzhledem k tomu, že za patologických podmínek jsou hladiny sEng zvýšené, zároveň je zvýšená i koncentrace cholesterolu v plazmě a jedinec má poškozená játra, pak vyvstává otázka, zda hladina sEng může ovlivnit jaterní funkce. Studie Dolezelova et al. 2019 hypotézu potvrdila a došla k zajímavým výsledkům. Tato studie byla prováděna na transgenních myších, které exprimují lidský sEng a byly krmeny standartní dietou. Tyto myši vykazovaly snížené plazmatické koncentrace celkového i LDL cholesterolu díky upregulaci jaterních receptorů **Srb-1** (zprostředkovává uptake HDL-cholesterolu z plazmy) a **Ldlr** (zodpovědný za uptake LDL-cholesterolu). Dále u nich byla zjištěna zvýšená koncentrace cholesterolu v játrech a také jeho zvýšený eflux z jater do žluči pomocí **Abcg8** transportéru a **Mdr-2** kanalikulárního transportéru. Transgenní myši zároveň vykazovaly zvýšenou přeměnu cholesterolu na ŽK díky upregulaci **CYP7A1** a zvýšené expresi **Mdr1** receptoru. Plazmatické koncentrace žlučových kyselin byly u těchto myši zvýšené kvůli jejich lepší reabsorpci z ilea. Zvýšený

obsah žlučových kyselin v játrech vedl k jejich zvýšené žlučové exkreci spojené s choleretickou aktivitou (24).

1.4 Metabolismus žlučových kyselin

1.4.1 Žlučník a žlučové cesty

Žlučník je orgán hruškovitého tvaru, který je uložen na viscerálním povrchu jater ve *fossa vesicae felleae*, což je linie, která odděluje pravý jaterní lalok od levého. Anatomicky se skládá z nejširší části-*fundu*, dále užšího těla a *infundibula*, což je oblá část navazující na zkroucený krček. Tento krček se následně zužuje do *ductus cysticus*, který je dlouhý asi 3 cm a vlévá se do *ductus hepaticus communis*. Z 80 % zajišťuje krevní zásobení *a. cystica*, která je odnoží *a. hepatica* a vytváří síť ve stěně žlučníku. Odkysličenou krev odvádí *v. cystica*, která se vlévá do portálního systému. Kolem krčku a žlučovodů jsou lymfatické uzliny, kde obíhá lymfa. Žlučník a játra mají mezi sebou rozsáhlé lymfatické spoje, a to bohužel napomáhá i šíření karcinomů.

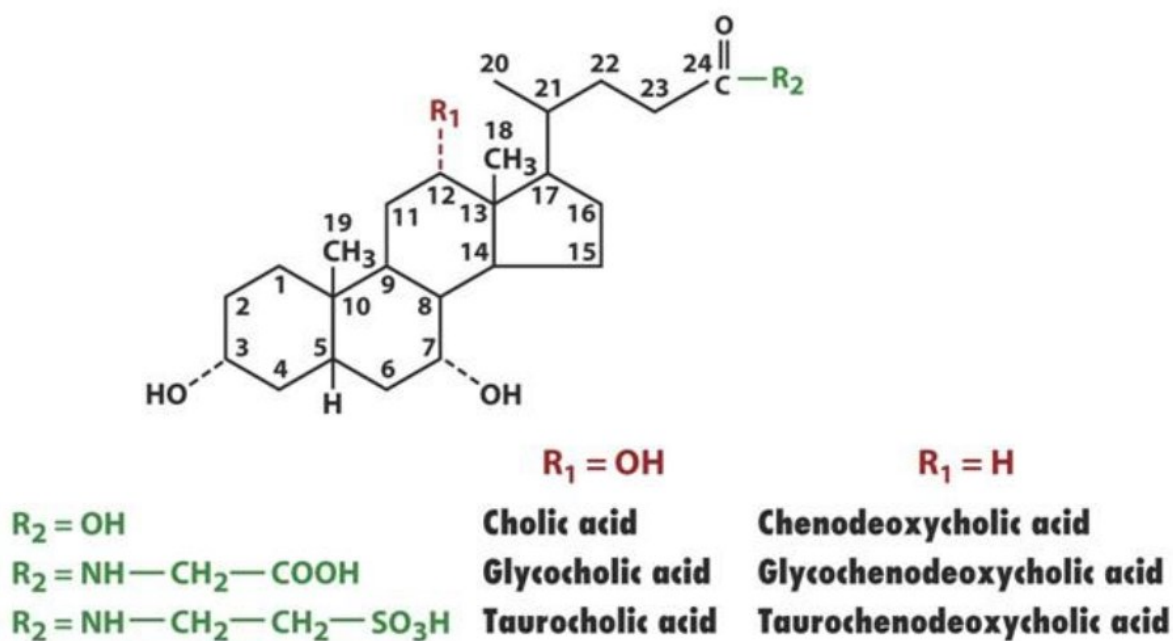
Žlučové cesty začínají v játrech jako žlučové kapiláry, probíhající skrz trámce hepatocytů. V portobiliárních prostorech pokračují a slévají se do větších řečišť, až se žluč vlévá do *ductus hepaticus dexter et sinister*. Spojením těchto dvou duktů vzniká *ductus hepaticus communis*, který opouští játra a spojuje se s *d. cysticus*. Tyto dvě větve, první pocházející z jater a druhá ze žlučníku, společně tvoří *d. choledochus* s vyústěním v *duodenu*. Duodenální část choledochu je obkroužena cirkulárními i podélnými svalovými vlákny Oddiho svěrače (25).

1.4.2 Tvorba žluče a metabolismus žlučových kyselin

Denní produkce jaterní žluči u člověka činí asi 600 - 1000 ml. Izotonicitou a složením elektrolytů je žluč podobná plazmě. Samotné „zahuštění“ žluči probíhá až ve žlučníku, kde jsou z ní odváděny anionty a voda. Hlavními komponentami žluče jsou **žlučové kyseliny (ŽK, 70 %)**, cholesterol, fosfolipidy a bilirubin. Dále se v ní vyskytují xenobiotika, voda, elektrolyty a glutathion. ŽK se vyskytují i v plazmě,

ale jejich koncentrace je tady asi 100 - 1000krát nižší než ve žluči. V játrech vznikají ŽK enzymatickou přeměnou cholesterolu. Člověk tvoří z cholesterolu dvě primární ŽK: **kyselinu cholovou (CA)** a **kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA)** (25).

ŽK vznikají z cholesterolu a nesou i jeho steroidní jádro, které má čtyři kondenzované uhlíkové kruhy, které se skládají ze tří 6-uhlíkových kruhů a jednoho 5-uhlíkového kruhu (Obr. 7). Konverze cholesterolu na ŽK zahrnuje nasycení dvojné vazby mezi uhlíky C5 a C6, epimeraci 3-hydroxylové skupiny, která má ve všech ŽK konfiguraci α a oxidační štěpení 3-uhlíkové jednotky z postranního řetězce. ŽK jsou amfipatické molekuly, protože všechny hydroxylové skupiny i karboxylová skupina jsou obráceny na jednu stranu uhlíkového skeletu a tvoří tak hydrofilní plochu, zatímco opačná strana skeletu je hydrofobní. Při fyziologickém pH tvoří většina ŽK sodné soli, aby se zvýšila jejich rozpustnost.

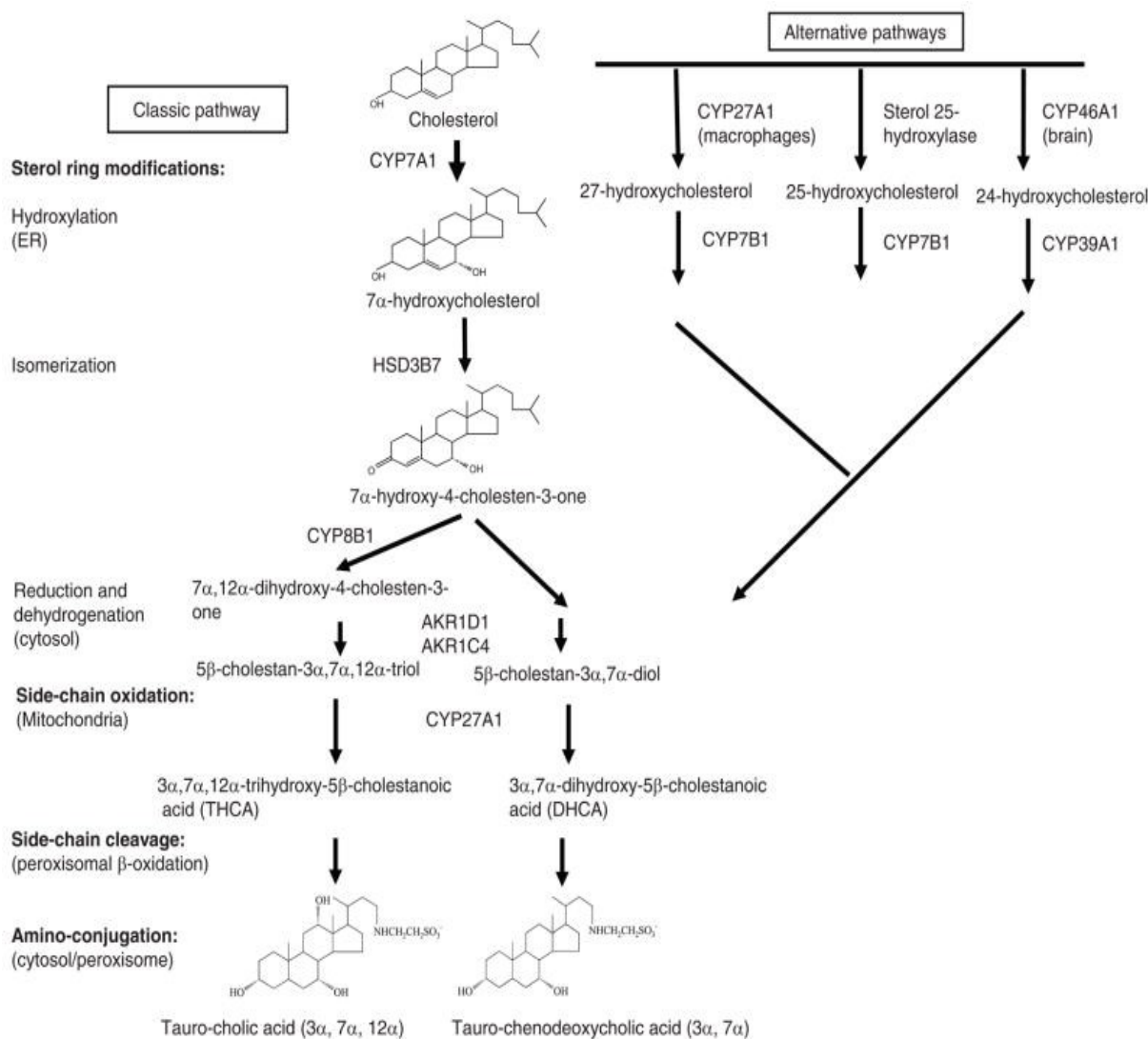


Obrázek 7. Struktura hlavních žlučových kyselin a jejich glycinových a taurinových konjugátů.
Převzato z: Voet D et al. 2006

Lidská játra syntetizují denně asi 200 - 600 mg ŽK a stejné množství je vylučováno i stolicí. Denní obrat ŽK je asi 5 % z celkového poolu ŽK, který je 3 g. Přeměna cholesterolu na ŽK zahrnuje 17 enzymů nacházejících se v peroxizomech, mitochondriích, endoplazmatickém retikulu a cytosolu. Tyto enzymy katalyzují přeměnu

steroidních kruhů a oxidační štěpení tří uhlíků postranního řetězce cholesterolu za vzniku ŽK.

Existují dvě hlavní cesty biosyntézy ŽK: **klasická cesta** a **cesta kyselého štěpení postranního řetězce** (Obr. 8). Při klasické cestě se nejprve modifikuje steroidní kruh a až potom se štěpí postranní řetězec, zatímco v kyselé cestě je to naopak.



Obrázek 8. Přeměna cholesterolu na ŽK. Převzato z (26).

Klasická cesta je iniciována *cholesterol 7 α -hydroxylásou* (**CYP7A1**), což je jediný enzym omezující rychlost syntézy ŽK. CYP7A1 se nachází na endoplazmatickém retikulu a napomáhá syntetizovat dvě primární ŽK: CA a CDCA. CYP7A1 přidá molekule cholesterolu OH skupinu do polohy 7 a následně vzniká chenodeoxycholová kyselina (CDCA). Tato kyselina může být následně přeměněna pomocí **CYP8B1** neboli *sterol 12 α -hydroxylázy* proběhne její modifikace na cholovou kyselinu (CA), která vzniká další hydroxylací, tentokrát v poloze 12 (26).

Tyto kyseliny jsou slabě polární a pro vyloučení z těla by samotná hydroxylace nestačila, proto jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem. Z chenodeoxycholové kyseliny tak vzniká buď glykochenodeoxycholová kyselina (GCDCA) nebo taurochenodeoxycholová kyselina (TCDCa). Z cholové kyseliny pak vznikne „glykocholová kyselina“ (GCA) nebo „taurocholová kyselina“ (TCA) (26). Poměr glycinových a taurinových derivátů je v normální žluči asi 3:1. (25)

Alternativní cesta neboli kyselá cesta je iniciována *sterol 27-hydroxylázou* (CYP27A1), což je enzym mitochondrie cytochromu P450, který je široce distribuován ve většině tkání a makrofágů. Bylo popsáno, že kyselá cesta může přispívat asi v 9 % k celkové syntéze ŽK v lidských hepatocytech (27). Kyselá cesta má také kvantitativní význam u novorozenců a u pacientů s onemocněním jater. Alternativní cesta může být katalyzována ještě dalšími dvěma sterolovými hydroxylázami, které přeměňují cholesterol na oxysteroly: *mikrozomální sterol 25-hydroxyláza* v jaterních mikrozomech a *sterol 24-hydroxyláza* (CYP46A1) v mozku.

Alternativní cesta má tedy 3 různé možnosti startu, kdy každá z cest hydroxyluje cholesterol, avšak v různých polohách (27, 25, 24). U výsledných produktů s OH skupinou v poloze 27 nebo 25 pokračuje reakce pomocí CYP7B1, zatímco u zbylého produktu s hydroxylem v poloze 24 pokračuje v reakci enzym CYP39A1. Oba tyto enzymy katalyzují další hydroxylaci.

U lidí je většina ŽK konjugována s aminoskupinou na karboxylové skupině (amidací). Touto konjugací se zvyšuje jejich ionizace a rozpustnost ve fyziologickém pH, zabrání se tak srážení s Ca^{2+} , minimalizuje se pasivní absorpce a ŽK se stanou rezistentní vůči štěpení pankreatickými karboxypeptidázami. V distálním střevě jsou nejprve konjugované CA a CDCA dekonjugovány, a potom pomocí *bakteriální 7 α -dehydroxylázy* převedeny na kyselinu deoxycholovou DCA (z původní CA) a kyselinu lithocholovou LCA (z původní CDCA) (26). DCA a LCA jsou **sekundární ŽK**. LCA je toxická, podléhá konjugaci se sulfáty, stává se tak neresorbovatelnou a odchází z těla stolicí (25). Sulfatace je hlavní cestou pro detoxikaci hydrofobních ŽK u lidí (28).

U myši je CDCA hydroxylována na α -muricholovou kyselinu a 6β -muricholovou kyselinu, což jsou dvě hlavní primární ŽK u myši. 7α -hydroxylové skupiny v CDCA mohou být také epimerizovány na 7β z kyseliny ursodeoxycholové kyseliny (UDCA). Hydroxylace v poloze $6\alpha/\beta$ nebo 7β zvyšuje rozpustnost ŽK a snižuje jejich toxicitu (26).

1.4.3 Enterohepatální cirkulace

ŽK syntetizované v játrech jsou ihned vylučovány do žluči, reabsorbují se ve střevě a putují zpět do jater. Enterohepatální cirkulace je u lidí velmi účinná. Malé množství ŽK se může dostat do systémové cirkulace, avšak při průchodu ledvinovými tubuly se reabsorbuje a cirkulaci je přivedeno zpět do jater. Některé ŽK vylučované přes žlučovod jsou reabsorbovány pomocí cholagocytů (epiteliální buňky žlučovodu) a recyklovány zpět do hepatocytů (cholagiohepatický zkrat). ŽK ve střevě pomáhají trávení tuků a vitaminů v nich rozpustných. Po každém jídle se vylučuje ze střeva cholecystokynin a stimuluje tak kontrakci žlučníku a vpravení ŽK do střevního traktu. Jak ŽK prochází střevním traktem, tak se jejich malé množství v nekonjugované podobě reabsorbuje do horního střeva pasivní difúzí. Většina ŽK (95 %) je reabsorbována v terminálním ileu prostupem přes enterocyt a vylučována do portální krve do jaterních sinusoid a absorbována do hepatocytů. v tlustém střevě je DCA reabsorbována a recyklována společně s CA a CDCA do jater. Celkový pool ŽK (asi 3 g) je složen ze 40 % CA, 40 % CDCA, 20 % DCA a ze stopového množství LCA a recykluje se 4 až 12krát denně. ŽK odvedené z těla stolicí (asi 0,5 g/den) se doplňují *de novo* syntézou v játrech, aby se udržela jejich konstantní zásoba (26).

1.4.4 Regulace syntézy ŽK

1.4.4.1 Zpětná regulace ŽK

Dřívější studie prokázaly, že aktivitu CYP7A1, a tudíž rychlost syntézy ŽK reguluje množství ŽK, cholesterolu, hormon štítné žlázy, glukokortikoidy, inzulin a cirkadiální rytmy (29, 30). Přerušení enterohepatální cirkulace ŽK pryskyřicemi vázajícími ŽK, jako je např. cholestyramin, nebo výskyt žlučovodové píštěle silně stimuluje aktivitu enzymu CYP7A1 a syntézu ŽK u potkanů. Podávání ŽK v krmné směsi silně snížilo aktivitu enzymu CYP7A1 (26). Syntéza ŽK je tedy regulována mechanismem negativní zpětné vazby a ŽK, které se vracejí do jater enterohepatálním oběhem mohou přímo nebo nepřímo inhibovat syntézu ŽK inhibicí aktivity CYP7A1. Mnoho studií ukazuje, že ŽK inhibují mRNA cytochromu 7A1, a i jeho proteinovou a enzymatickou aktivitu, a tudíž i syntézu ŽK u hlodavců, zatímco cholesterol ji

stimuluje. Studie prokázaly, že aktivita CYP7A1 je regulována hlavně na úrovni transkripce (31, 32).

Poločas rozpadu mRNA CYP7A1 byl odhadován jako velmi krátký, asi 30 minut. Je ale možné, že ŽK mohou snížit stabilitu mRNA CYP7A1 prostřednictvím „response elements“ ŽK umístěných v 3'-UTR (=3' nepřekládaná oblast transkriptu CYP7A1 v potkaních hepatocytech) (32, 33). Postranskripční regulace CYP7A1 však nebyla podrobně studována (26).

1.4.4.2 *Nutriční regulace syntézy ŽK*

Metabolizmus jater se velmi zvyšuje v postprandiálním období a bylo prokázáno, že existuje fyziologická souvislost mezi indukcí syntézy ŽK a regulací postprandiálního metabolismu živin. Nutrice tak může hrát klíčovou roli v syntéze ŽK, což zpětně reguluje vstřebávání živin a metabolickou homeostázu (26).

CYP7A1 je vysoce specifická hydroxyláza, která používá jako substrát pouze cholesterol a vkládá hydroxylovou skupinu do polohy 7 α . Tento enzym se nachází na ER, což je prostředí chudé na cholesterol. Aktivitu CYP7A1 tudíž reguluje dostupnost cholesterolu, a vědci se domnívají, že vhodným substrátem je cholesterol syntetizovaný *de novo*, který má přímou souvislost se syntézou ŽK. Zvýšená syntéza ŽK, tak sníží hladinu cholesterolu/oxysterolu v játrech a vede ke stimulaci syntézy cholesterolu *de novo* za účelem poskytnutí substrátu pro CYP7A1 (26).

Když se hladiny intracelulárního oxysterolu **snižují**, zapojuje se do děje Srebp-2 („Sterol regulatory element-binding proteins“), což je hlavní regulátor syntézy sterolů a mastných kyselin. Prekurzor Srebp2 je pak přenesen do Golgiho aparátu, kde se aktivují sterol sensitive proteázy S1P a S2P, aby štěpily N koncový fragment. Tento fragment je následně transportován do jádra hepatocytu, kde se váže na elementy steroidní odpovědi. Stimuluje tak všechny cholergenní geny a startuje *de novo* syntézu cholesterolu z acetyl-CoA. Pro biosyntézu cholesterolu aktivuje Srebp expresi genů, jako je HMG-CoA reduktáza, HMG-CoA syntáza a mevalonát syntáza. Pro absorpci cholesterolu aktivují Srebp expresi LDL receptoru (LDLR) (34).

Když jsou hladiny intracelulárního oxysterolu naopak **vysoké**, SREBP-2 je zadržen v endoplazmatickém retikulu a syntéza cholesterolu je inhibována. U myši, které jsou krmené dietou s vysokým obsahem cholesterolu, se tělo přirozeně brání díky přeměně cholesterolu na ŽK. Oxysterolem se aktivuje jaderný receptor LXR α („Liver X

receptor α) a ten pak indukuje transkripci genu CYP7A1. Srebp-1a a Srebp-1c po svém přepisu indukují všechny geny lipogeneze (35).

Předchozí studie na potkanech ukázaly souvislost mezi „lačněním/příjmem potravy“ a změnou poolu ŽK. Pool ŽK se u diabetických potkanů zvýšil a snížil se naopak u potkanů léčených inzulinem. U léčených myší se snížila i aktivita CYP7A1 a CYP8B1 (36, 37, 38). Z čehož můžeme vyvodit, že pokud má tělo dostatek funkčního inzulinu, pak inzulin potlačuje aktivitu CYP7A1 a CYP8B1, a tím je snížena produkce ŽK. V případě diabetického onemocnění mají potkani nedostatek inzulinu, což indukuje aktivitu CYP7A1. Nedostatek inzulinu symbolizuje „hladovění tkání“, které nemohou přijímat glukózu. Stejný stav nastává při lačnění a zvýšených hladinách glukagonu v krvi a všechny tyto stavy vyvolávají indukci CYP7A1. Výsledná up-regulace exprese CYP7A1 a syntézy ŽK probíhá během lačnění a tělo se tak připravuje na budoucí přísun potravy a její intestinální absorpci (26).

Mechanismus syntézy ŽK u lidí však funguje na odlišných principech. Hlavním meziproduktem, který odráží rychlost syntézy ŽK je 7α -hydroxy-4-cholesten-3-on (C4). Prekurzorem C4 je 7α -hydroxycholesterol, který vzniká z cholesterolu pomocí CYP7A1. Hladina C4 se u lidí snižuje během hladovění a zvyšuje postprandiálně (39), což naznačuje, že syntéza ŽK je indukována po jídle a inhibována během lačnění. Předpokládalo se, že mezidruhové rozdíly by mohly vysvětlit i rozdílnou regulaci syntézy ŽK vzhledem k lačnění a postprandiální době. Novější studie ukazují, že zvýšené hladiny inzulinu a glukózy zvyšují expresi genu CYP7A1 a zvýšená hladina glukagonu naopak snižuje tuto expresi (40, 41, 42). Indukce exprese CYP7A1 vede ke zvýšené syntéze ŽK a jejich zvýšené cirkulaci.

Inzulín může mít duální funkci, kdy za fyziologických koncentrací stimuluje CYP7A1, ale při rezistenci na inzulin, kdy jsou v plazmě zaznamenány jeho vysoké hladiny, CYP7A1 inhibuje (40). Glukóza indukuje CYP7A1 epigenetickým mechanismem, a to zvýšením acetylace histonů promotoru genu CYP7A1 (43). Na druhé straně, glukagon silně inhibuje expresi CYP7A1 aktivací PKA („Proteinkinase A“), která fosforyluje HNF4 α („Hepatic nuclear factor 4 α “), aby zrušila svou vazebnou aktivitu k DNA a vede tak k inhibici exprese CYP7A1 v lidských hepatocytech (42). Tyto nedávné studie jasně prokázaly, že živiny hrají esenciální roli v regulaci syntézy ŽK během střídání lačnění a postprandiálního stavu.

Je známo, že ŽK mohou napodobovat působení inzulinu při regulaci metabolismu glukózy, a to stimulací syntézy glykogenu a inhibicí glukoneogeneze. ŽK mají schopnost

ovlivňovat apoptózu hepatocytu, záleží pouze na jejich hydrofilitě. Hydrofilní ŽK zvyšují intracelulární cAMP a aktivují cestu MAPK („Mitogen-activated protein kinase“) a PI3K („Phosphoinositide 3-kinase“), aby ochránily hepatocyty před apoptózou, zatímco hydrofobní ŽK apoptózu indukují (44, 45). U diabetiků jsou ŽK zvýšeny a po léčbě inzulinem se snižují (46). Nedávné studie ukázaly, že snížení cirkulujících ŽK výrazně zhoršilo dietně způsobenou obezitu a diabetes, zatímco zvýšení poolu ŽK zlepšilo glukózovou homeostázu (47). Je zajímavé, že u pacientů s normální glukózovou tolerancí se po perorálním podání glukózy nejvíce zvyšovaly sérové hladiny ŽK, avšak u pacientů s narušenou glukózovou tolerancí byla tato odpověď hluchá (48). Zvýšený pool ŽK, ale nemá být vnímán jako příčina diabetu, nýbrž jako důsledek dysregulace metabolismu žlučových kyselin a změněné metabolické homeostázy. Hladiny ŽK v séru se staly biomarkery pro diagnostiku onemocnění jater, cukrovky a obezity (26).

1.4.5 Jaderné receptory aktivované žlučovými kyselinami.

ŽK podporují enterohepatální oběh, napomáhají digesci a absorpci tuků a vitamínů v nich rozpuštěných. V posledních dvou dekadách se ŽK prokázaly i jako signalizační molekuly (26), které prostřednictvím různých receptorů regulují svou vlastní syntézu, jakož i další metabolické procesy ovlivňující metabolismus glukózy, lipidů a energetickou homeostázu. Žlučové kyseliny přímo aktivují tři jaderné receptory, FXR („Farnesoid X receptor“), PXR („Pregnane X receptor“) a VDR („Vitamin D receptor“) a také členy nadrodiny receptorů vázaných na G-protein. Zdá se, žlučovými kyselinami aktivované membránové GPCR („G-protein coupled receptor“), TGR5 („Takeda G-protein coupled receptor 5“, také známý jako GPBAR1 „G-protein-coupled bile acid receptor 1“) a S1P2 („Sphingosin-1-phosphate receptor 2“) hrají roli při stimulaci energetického metabolismu, chrání játra a střevo před zánětem a steatózou a zlepšují inzulinovou resistenci (49). Tyto receptory jsou exprimovány tkáněmi v enterohepatálním oběhu, ale i mimo játra a GIT, kde zprostředkovávají systémové účinky ŽK. TGR5 je umístěn v adipocytech, myocytech, buňkách imunitního systému, buňkách žlučovodu, Kupfferových buňkách atd. (50).

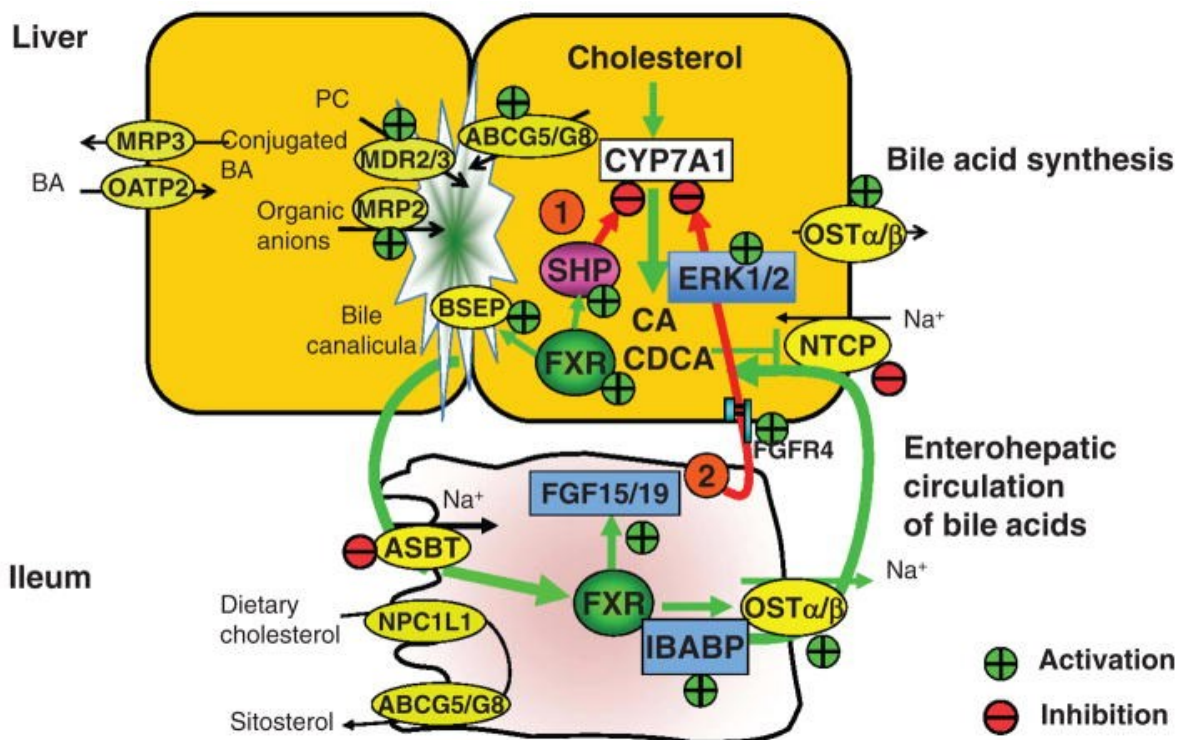
FXR je aktivován volnými i konjugovanými ŽK. Hydrofobní ŽK CDCA je nejúčinnější ligand pro FXR receptor (EC_{50} = asi 10 μ mol/l), dalšími ligandy jsou LCA, DCA a CA, zatímco hydrofilní ŽK (UDCA-ursodeoxycholová kyselina a MCA-

muricholová kyselina) FXR neaktivují. Pro VDR i PXR jsou neúčinnější ligandy LCA (EC₅₀= asi 100 nmol/l) a její metabolit 3-keto-LCA. PXR je vysoce exprimován v játrech a střevě a hraje důležitou roli v detoxikaci ŽK, léčiv a toxických sloučenin. PXR aktivuje metabolickou fázi I cytochromu P450, fázi II, kde probíhá konjugace xenobiotik, a i fázi III, což je fáze transportní, která xenobiotika eliminuje z organismu. PXR také inhibuje transkripci genu CYP7A1 inhibicí transaktivace genu HNF4 α a PGC-1 α .

1.4.5.1 Role FXR v regulaci syntézy ŽK a v jejich transportu

Mnoho studií spojuje FXR s regulací syntézy ŽK, jejich sekrecí, intestinální absorpcí a jaterním vychytáváním. FXR aktivuje transkripci cílového genu většinou vazbou na invertovanou repetici s mezerou mezi bázemi (IR1) v genovém promotoru. Funkce FXR v játrech je blokovat CYP7A1 (Obr. 9). Důkazem toho je studie, kdy na FXR knock-out myších byla pozorována zvýšená exprese CYP7A1 a zvýšená syntéza ŽK (51). Negativní účinek FXR může být zprostředkován nepřímo pomocí SHP („Small heterodimer partner“), což je negativní jaderný receptor inhibující transaktivátory CYP7A1 a CYP8B1 pomocí HNF4 α a LRH1 („Liver related homolog 1“). FXR také indukuje exportní pumpu žlučových solí, BSEP („Bile salt export pump“, *ABCB11*) lokalizované na kanalikulární membráně hepatocytů. BSEP je hlavním transportním proteinem žlučových kyselin, které pro svůj chod využívá hydrolyzu ATP.

Konjugované žlučové kyseliny jsou vylučovány z hepatocytu proti koncentračnímu spádu do žlučového kanálku, kde je koncentrace ŽK 1000krát větší. FXR indukuje i expresi MDR3 („Multidrug resistance-associated protein 3“, *ABCB4*), což je protein zajišťující transport fosfatidylcholinu do žluče. FXR indukuje dále expresi MRP2 („Multidrug resistance protein 2“, *ABCC2*), který transportuje organické anionty, glukuronidované a sulfatované ŽK a řadu léčiv. Heterodimér ABCG5/8 je zodpovědný za transport cholesterolu do žluče.

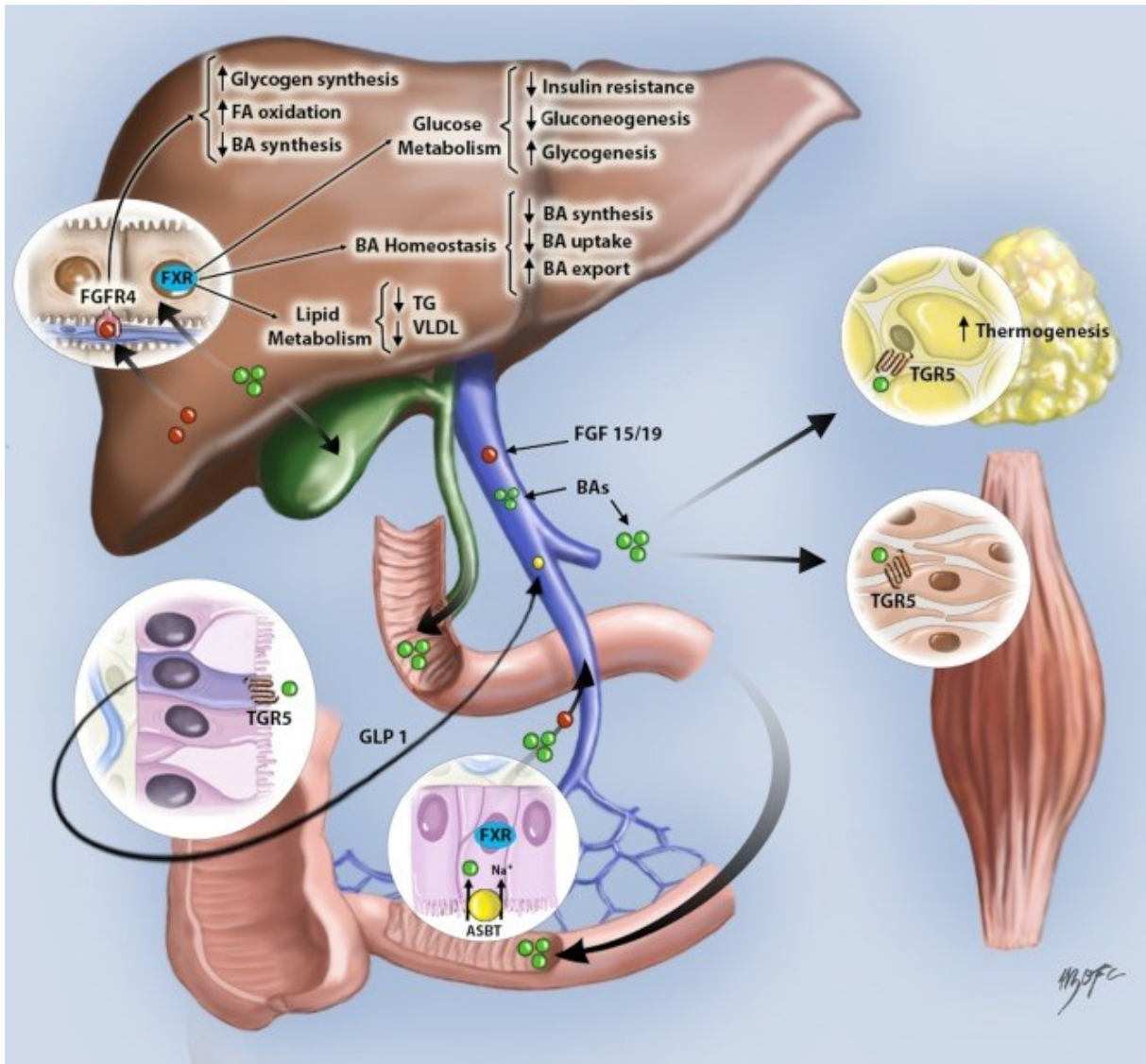


Obrázek 9. Vliv FXR na transportní mechanismy v hepatocytech a ve střevě. Převzato z (26).

Ve žlučníku jsou ŽK skladovány ve vysokých koncentracích (mmol/l) díky tvorbě micel. Micely jsou složeny z fosfatidylcholinu, cholesterolu a ŽK. Toto uspořádání zabraňuje vysrážení cholesterolu ve žlučníku. V terminálním ileu jsou konjugované ŽK reabsorbovány transportérem ASBT („Apical sodium-dependent bile salt transporter“), který se nachází na apikální membráně enterocytů (26). Jakmile je ŽK uvnitř enterocytu, váže se na střevní protein vázající ŽK (IBABP „Ileal bile-acid-binding protein“), jehož tvorba je indukována FXR (52). ŽK jsou následně vylučovány do portální cirkulace pomocí OST α/β („Organic solute transporter α/β “) lokalizovaného na bazolaterální membráně enterocytu (53) a FXR opět indukuje jeho transkripci. ŽK kolují portální krví, kde je vychytává NTCP („Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide“) zpět do hepatocytu. FXR inhibuje transkripci NTCP, aby předešlo vysoké koncentraci ŽK v játrech (54). OST α/β je lokalizován kromě střeva také v hepatocytu, kde je jeho funkce opět regulována FXR a kde přispívá k odtoku ŽK do sinusové krve, aby se zabránilo hromadění ŽK.

FXR tedy hraje významnou roli v enterohepatální cirkulaci ŽK a reguluje syntézu, sekreci, reabsorpci a vylučování ŽK a také jejich zpětné vychytání do hepatocytu. Defektní regulace FXR cílových genů narušuje enterohepatální cyklus a významně přispívá k cholestatickým onemocněním jater (55). PXR a CAR („Constitutive

androstane receptor“) mohou hrát doplňkovou úlohu při ochraně jater proti cholestáze a detoxikaci ŽK, hlavní roli hraje FXR (56). Mnoho membránových transportérů (ASBT, OST α/β , MRP2/3) se nachází také v cholangiocytech a ledvinových proximálních tubulárních buňkách, kde umožňují reabsorpci ŽK (26).



Obrázek 10. Ovlivnění TGR5 a FXR žlučovými kyselinami. Převzato z (57).

Obr. 10 znázorňuje, jak je FXR aktivován žlučovými kyselinami. V játrech inhibuje lipogenezi a snižuje TG (triacylglyceroly) a VLDL („Very low-density lipoproteins“). Snižuje také syntézu ŽK *de novo* a snižuje i glukoneogenezi, ale zvyšuje naopak glykogenezi a inzulínovou senzitivitu. ŽK putují z jater do žlučníku a následně do tenkého střeva a zde jsou *venou portae* odváděny zpět do jater. Venózní řečiště je však zanáší i do ostatních tkání jako jsou adipocyty nebo svaly. V obou případech ŽK ovlivňují

TGR5 receptor. V adipocytech zvýší termogenezi a ve svalech jejich energetický výdej. V tlustém střevě je TGR5 také aktivován a zvýší uvolňování GLP1 z L buněk. Následkem je zvýšené uvolňování inzulínu z pankreatických β -buněk. ŽK jsou v terminálním ileu vychytávány zpět do jater pomocí ASBT. Tento transportér ovlivní uvnitř enterocytu FXR jaderný receptor a ten dává "příkaz" k expresi „Fibroblast growth factors“ FGF15 (u myši), nebo FGF19 (u lidí). Tento faktor *venou portae* putuje do jater a nasedá na FGF receptor 4 (FGFR4), který přímo inhibuje CYP7A1 (58). Zpětně tak tlumí syntézu ŽK a zvyšuje oxidaci mastných kyselin (57).

1.4.6 Transportní mechanismy v játrech

1.4.6.1 Bazolaterální transportní proteiny

NTCP (*SLC10A1*)

„Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide“ funguje jako elektrogenní sodíkový kotransportér, který přenáší dva nebo i více iontů Na⁺ na molekulu rozpuštěné látky (59). Mezi hlavní fyziologické substráty NTCP patří všechny konjugáty ŽK s taurinem a glycinem, zatímco nekonjugované ŽK jsou slabé substráty. Vysoká exprese NTCP na sinusoidální membráně hepatocytu a zároveň jeho vysoká afinita pro konjugované ŽK je důsledkem jejich účinné extrakce z portální krve. Tudíž funkce NTCP spočívá v udržování enterohepatické cirkulace ŽK a udržuje jejich koncentraci v krvi na minimu. Zároveň spadá pod regulaci FXR, který ho dokáže efektivně blokovat, aby nedošlo k přehlcení hepatocytu žlučovými kyselinami (26).

OATP (*SLCO*)

Všechny OATP („Organic anion transporting polypeptides“) jsou transmembránové glykoproteiny o dvanácti doménách se širokou substrátovou preferencí. Jejich substráty jsou (ne)konjugované ŽK, bilirubin a některá léčiva. Nejčastější jaterní podrodiny OATP jsou OATP1A a OATP1B. Odhadnout roli každé jednotlivé izoformy OATP *in vivo* je velmi obtížné, protože substrátová specifita se často u obou izoform prolná a hlodavčí Oatp formy nemají přesné lidské orthology (60). Na rozdíl od NTCP, členové OATP rodiny s expresí na sinusoidální membráně hepatocytů, jako je např. OATP1A1 (*SLCO1C1*), účinně transportují nekonjugované

nebo sulfatované ŽK, což naznačuje, že se tyto nosiče podílejí i na jaterním příjmu ŽK (61). Další studie naznačují, že OATP1A1 a OATP1A4 přednostně transportují sekundární nekonjugované ŽK a mohly by tak měnit metabolismus střevních ŽK (62). Deficience v genech OATP1B1 a OATP1B3 se u lidí vyznačuje Rotorovým syndromem, který se projevuje zvýšenými hladinami bilirubinu v krvi (63).

MRP3 (*ABCC3*)

Tento jednosměrný efluxní transportér je ATP-dependentní a nachází se na bazolaterální membráně hepatocytu, což znamená že, své substráty efluxuje z hepatocytu do krve (64). Je vysoce exprimován v hepatocytech, enterocytech a cholangiocytech (65), a dále i v placentě, ledvinách nebo např. plicích. Nadměrná exprese je pozorována u nádorových buněk a v cholestatických játrech. Typickými substráty pro MRP3 jsou organické anionty, jako jsou ŽK a glukuronidáty léčiv. Rovněž usnadňuje absorpci konjugovaných forem některých estrogenů a antioxidantů přijatých potravou (66).

Je up-regulován v případě cholestázy nebo při narušené funkci MRP2. Indukce MRP3 při cholestáze, jak v hepatocytech, tak ve střevě je zprostředkována pomocí FXR. V hepatocytech FXR také indukuje OST α/β , aby se zabránilo nadměrnému hromadění ŽK a ty tak odcházejí do sinusoidální krve (26). Důležitou roli při adaptaci jater na cholestatické poškození mohou hrát i jiné mechanismy, které jsou zaměřené na snížení toxicity žlučových kyselin (např. hydroxylace, sulfatace nebo glukuronidace) (67). Hydroxylace ŽK prostřednictvím CYP3A4 může usnadnit jejich sulfataci a glukuronidaci a ŽK se tak stávají lepšími substráty pro MRP3 a MRP2 (68).

MRP4 (*ABCC4*)

„Multidrug resistance-associated protein 4“ umožňuje transport 3',5'-cyklických nukleotidů, přesněji cAMP (cyklického adenosinmonofosfátu) a cGMP (cyklického guanosinmonofosfátu). Mrp4 je lokalizován na bazolaterální membráně hepatocytu. Podílí se na eliminaci organických aniontů a žlučových kyselin z hepatocytu do sinusoidální krve. Upregulace efluxních transportérů v játrech (např. Mrp2, Mrp3, Mrp4) prokazatelně přispívá ke zmírnění jaterního poškození u cholestatických jater (69).

1.4.6.2 Kanalikulární transportní proteiny

BSEP (*ABCB11*)

Tento protein původně pojmenovaný „sestra P-glykoproteinu“ je transportér *ABC* rodiny, úzce příbuzný s P-glykoproteinem, ten je někdy nazýván také MDR1 („Multidrug resistance protein 1“) (70). „Bile salt export pump“ je jednosměrný transportér, který je závislý na ATP. Účinně odčerpává konjugované ŽK ven z hepatocytu do žlučového kanálku a ten je odvádí dále do gastrointestinálního traktu. BSEP je téměř výhradně exprimován v játrech a jeho zastoupení v ledvinách je minoritní. ŽK jsou hlavním fyziologickým substrátem BSEP, ale zároveň je schopen transportovat některá léčiva, např. inhibitor HMG-CoA reductázy, pravastatin. Další léčiva jako cyklosporin nebo glibenklamid nejsou přímo substráty BSEP, ale interagují s ním a inhibují export ŽK. Tyto interakce jsou relevantní hlavně pro hepatotoxicitu, protože inhibice BSEP léčivem, nebo jeho metabolitem vede k nahromadění ŽK v játrech a následně k cholestáze (71).

G5/G8 (*ABCG5/ABCG8*)

Transportéry *ABC* rodiny („ATP-binding cassette“) přesněji *ABCG5* (G5) a *ABCG8* (G8) tvoří transportér pro cholesterol a fytosteroly, který působí v játrech, aby bránil hromadění dietních sterolů. Mutace v *ABCG5* nebo v *ABCG8* způsobují sitosterolémii, což je recesivní porucha charakterizovaná akumulací sterolů a předčasnou koronární aterosklerózou. Jaterní G5/G8 zprostředkovává vylučování cholesterolu do žluči (72).

MRP2 (*ABCC2*)

„Multidrug resistance-associated protein 2“ je jednosměrný efluxní transportér. Primárně transportuje organické anionty, dále také konjugovaný bilirubin a léčiva. MRP2 je u člověka exprimován v mnoha tkáních, zejména v játrech, ledvinách, GIT a placentě. Nejvíce je exprimován v játrech, kde usnadňuje vylučování glukuronidů bilirubinu, kladně nabitých léčiv a dalších konjugátů. Je lokalizován na apikální membráně hepatocytu a svoje substráty efluxuje do žlučového kanálku. Primární úlohou MRP2 je omezit distribuci jeho substrátů v buňce. Důkazem je i Dubin-Johnsonův syndrom, onemocnění, kde mají postižení jedinci mutaci v genu *ABCC2*, což vede k nefunkčnímu MRP2 a ke chronické hyperbilirubinémii (73).

MDR1 (*ABCB1*)

„Multi-drug resistance protein 1“ je běžněji označován jako P-glykoprotein. Je to efluxní transportér, který omezuje distribuci svých substrátů do orgánů a zároveň je z orgánů i vylučuje. Exprimován je v hematoencefalické bariéře, GIT, placentě, ledvinách, varlatelych a dalších částech těla. MDR1 má velmi široké spektrum substrátů a zdá se, že působí synergicky s enzymem CYP3A4 a BCRP („Breast cancer resistance protein“), což je další efluxní transportér, se kterým sdílí mnoho substrátů a inhibitorů. Synergická souhra je v GIT velmi důležitá a moduluje absorpci substrátů (74).

MDR3 (*ABCB4*)

Tento protein spadá do *ABC* („ATP-binding cassette“) nadrodiny a nachází se na apikální membráně hepatocytu. Mdr2 transportér, je homologem MDR3 u potkanů. Pomocí ATP přenáší fosfatidilcholin z hepatocytu do žlučového kanálku, čímž chrání hepatobiliární systém před škodlivými detergentními a litogenními vlastnostmi žluče (74). Mutace v *ABCB4* může mít různé klinické projevy a vést k několika fenotypům onemocnění jater, a to progresivní familiární intrahepatální cholestáze typu 3, syndromu cholelitiázy asociované s nízkými fosfolipidy, intrahepatální cholestáze s vysokou γ -glutamyltransferázou a biliární fibróze/cirhóze. Studie zabývající se genomem zdokumentovaly u pacientů s deficitem *ABCB4*/MDR3 výskyt maligních nádorů, převážně hepatobiliárních. Věk pacienta v době prvního projevu cholestatického onemocnění, a i jeho závažnost souvisí s alelickým stavem *ABCB4* (76).

1.5 NAFLD

„Non alcoholic fatty liver disease“ nebo-li nealkoholová jaterní choroba je celosvětově rozšířené onemocnění, které postihuje 25 – 30 % celkové populace a je významným rizikovým faktorem pro jaterní i kardiometabolickou mortalitu a úmrtí spojené s DM II. NAFLD zahrnuje spektrum změn v jaterní tkáni, počínaje nezánnětlivou izolovanou steatózou, až po NASH („Non-alcoholic steatohepatitis“), nebo také nealkoholová steatohepatitida, které je charakterizována steatózou, nekrotizujícími změnami a různým stupněm fibrózy jater. Díky rychle rostoucí prevalenci tohoto onemocnění a jeho agresivní formě, NASH, je cílem vědeckého zájmu vyhledávat nové terapeutické postupy, které zabrání progresi onemocnění v pokročilou fibrózu, cirhózu

nebo až rakovinu jater. V současné době je NASH jako příčina chronického onemocnění jater druhou vedoucí etiologií cirhózy u dospělých, kteří čekají na transplantaci jater ve Spojených státech (77).

Přibližně čtvrtina evropské populace je postižena tímto onemocněním jater, bohužel prevalence se liší podle způsobu detekce NAFLD. V roce 2016 byla zveřejněna metaanalýza, která popisovala průměrnou prevalenci NAFLD v Evropě 23,71 %. Procentuální odlišnost v různých zemích Evropy se pohybuje mezi 5 % - 44 % (78). Data z kohortové studie v Pomořansku (SHIP „Study of health in Pomerania“) v severovýchodním Německu odhaduje, že prevalence NAFLD při diagnostice pomocí ultrasonografie je přibližně 30 % (79).

Další studie byla prováděna ve Francii, kde byli pacienti testováni pomocí jaterní biopsie, protože se u nich nevysvětlitelně vyskytovaly abnormální jaterní testy. NAFLD trpělo 26,8 % pacientů, z nichž 32,7 % mělo NASH (80).

1.5.1 Patogeneze

Rozvoj NAFLD je pravděpodobně závislý na více faktorech. Jedním z nich je změna v metabolismu lipidů, která vede ke zvýšené kumulaci tuku v hepatocytech, což způsobí oxidační stres a následně i buněčné poškození. Jiný mechanismus by mohly vykazovat adipocyty, které uvolňují cytokiny (adiponectin, leptin, resistin, IL-6, TNF- α) vyvolávající zánět a fibrózu jater (81).

V předchozích studiích se ŽK prokázaly jako molekuly s potenciálem pro signalizaci. ŽK se pohybují a působí, jak v jaterní tkáni, tak v extrahepatálních tkáních a regulují metabolické dráhy lipidů, sacharidů a zároveň i energetickou homeostázu. Ze studií je patrné, že modulace nebo aktivace receptorů pro ŽK (např. FXR, TGR5 nebo transportérů, jako je BSEP) ovlivňuje jak inzulínovou sensitivitu, tak patogenezi NAFLD/NASH (57). Ve studii zkoumající BSEP u pacientů s NASH bylo prokázáno, že snížená funkce tohoto transportéru korelovala se stupněm NAFLD (82).

V léčbě NAFLD zůstává základním pilířem změna životního stylu, stravovacích a pohybových návyků a kontrola komorbidit jako je DM II nebo dyslipidémie. Intenzivně jsou zkoumány i nové léčebné cesty jako je například potenciál derivátů žlučových kyselin, které ovlivňují ŽK-dependentní signální dráhy (49).

1.5.2 NASH

„Non-alcoholic steatohepatitis“ je dynamickou formou NAFLD a postihuje asi 2-3 % dospělé lidské populace. Z hlediska patologie prochází zprvu pouze ztukovatělá játra zánětlivou reakcí a dochází k destrukci hepatocytů a jejich náhradě vazivovou tkání. Tento stav zánětlivé reakce doprovází i zvýšení aktivity aminotrasferáz (AST „Aspartate aminotransferase“, ALT „Alanine aminotransferase“). Při těžším průběhu vede NASH k jaterní cirhóze a až ke smrtelnému ohrožení života. Klinický obraz NASH zahrnuje hepatomegalii, obezitu a někdy i cirhózu. V laboratorním nálezu se objevují příznaky metabolického syndromu jako je dyslipidémie a hyperglykémie (83).

U obézních jedinců byla popsána korelace mezi hladinami ŽK a závažností NASH, a také dysregulace signalizace ŽK v NASH vyvolaná volnými mastnými kyselinami (84). Později byly potvrzeny změny u pacientů s NASH ve složení ŽK v séru a ve stolici, kde se zvýšil počet ŽK konjugovaných s taurinem a glycinem, a i množství sekundárních ŽK (85).

Množství sekundárních ŽK může působit opakované záněty, které by nakonec mohly přispívat k progresi NASH. Samotná NAFLD je asymptomatická a jen v některých případech ovlivňuje jaterní funkce, ale může progredovat až do NASH a dále do konečného stadia onemocnění jater. Do dnešní doby není žádná kauzální terapie pro NASH (81).

Metabolomické analýzy (HPLC, UHPLC, GC) odhalily signifikantně zvýšené sérové hladiny glykochendeoxycholátu, glycholátu a taurocholátu ve srovnání se zdravými kontrolními jedinci (86). U přibližně pětiny až šestiny pacientů propukne NASH v cirhózu jater (81).

Nalezení účinné léčby NAFLD/NASH je jednou z velkých výzev na poli hepatologie. Důvodem je komplexnost onemocnění a potřeba zaměřit se na více než jeden problém NAFLD. Je třeba nalézt látku, která dokáže léčit inzulinovou rezistenci, změněný metabolismus lipidů, zánět a progredující fibrózu. Stabilizace metabolismu ŽK na fyziologické hladiny, která byla zaznamenána u zdravých kontrol, se zdá být důležitou součástí terapie. Vědci zatím objevili slibné cíle jako je UDCA (Ursodeoxycholová kyselina) a OCA (Obeticholová kyselina), které budou v příštích letech procházet klinickým testováním. Dalším důležitým krokem je zdokonalit prognostické metody

a záchyt pacientů, kteří jsou náchylnější k přechodu NAFLD do NASH, fibrózy, cirhózy a kteří budou pravděpodobní kandidáti na transplantaci jater (81).

1.5.2.1 ŽK a TGR5: Dopad na energetický metabolismus a zánětlivou reakci

Pro NAFLD/NASH je důležitá role TGR5, který reguluje energetický výdej, metabolismus glukózy a imunitní reakce (57).

Studie na myších ukázaly, že aktivace TGR5 v hnědé tukové tkáni BAT („Brown adipose tissue“) a ve svalu pozitivně stimuluje energetický výdej. K tomuto ději dochází aktivací termogeneze v BAT a svalech, čemuž předchází zvýšená regulace genu kódujícího jodtyronin-deiodinázu typu 2 (D2), která přeměňuje neaktivní tyroxin (T4) na aktivní trijodtyronin (T3), což vede ke zvýšené spotřebě kyslíku a zvýšenému energetickému výdeji (50, 87).

Klinické studie prokázaly souvislost mezi hladinami ŽK v séru a výdejem energie, což potvrdila studie, kde zdravým ženám byla krátkodobě podávána CDCA, což vedlo ke zvýšení aktivity BAT a tělesné spotřeby energie (88).

Signalizace pomocí TGR5 je také zapojena do homeostázy glukózy. Ve střevě se nacházejí L buňky, které mají na svém povrchu TGR5 receptor a po jeho aktivaci působí endokrinně. L buňky v ileu i tlustém střevě vyplavují inkretinový hormon GLP-1 („Glukagon-like peptide-1“), v závislosti na přítomnosti živin v lumen střeva (89). Následně putuje GLP-1 do pankreatu, kde zvyšuje syntézu a uvolňování inzulínu. Zároveň přispívá k proliferaci β -buněk pankreatu a inhibuje jejich apoptózu, navíc snižuje chuť k jídlu. Zprvu se zdálo, že hlavním spouštěčem pro uvolnění GLP-1 je přítomnost uhlohydrátů v lumen střeva. Dnes je díky farmakologickým a genetickým postupům již známo, že ŽK také nasedají na TGR5 a následně uvolňují GLP-1. U obézních myší se zvýšená hladina ŽK projevila jako zlepšení inzulínové tolerance spojené s GLP-1 a zlepšila se i funkce jater a pankreatu (90). Další studie ukazuje, že TGR5 je exprimován i na pankreatických β -buňkách, kde může regulovat sekreci inzulínu (91).

Vzhledem k tomu, že TGR5 je exprimován v mononukleárních buňkách, včetně Kupfferových buněk, tzv. makrofázích jater, má jeho modulace dopad na zánětlivé stavy. Zdá se, že aktivace TGR5 v těchto buňkách vyvolává silné protizánětlivé účinky potlačením tvorby cytokinů (například TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1R α , adiponectin, leptin a další) (92) a inhibicí jaderné translokace jaderného faktoru kappa B (49,93). Další studie

na myších prokázaly, že TGR5 moduluje polarizaci a infiltraci makrofágů do adipocytů i do jater a snižuje tak metabolický zánět (93).

1.5.2.2 Transportéry ŽK a NASH

Vzhledem k výše uvedeným metabolickým účinkům ŽK, by změny v jejich enterohepatálním cyklu a distribuci mohly ovlivňovat homeostázu glukózy a lipidů. Mezi hlavní nosiče udržující enterohepatální oběh patří hlavně proteiny rodiny *ABC* a *SLC*: NTCP (*SLC10A1*), BSEP (*ABCB11*), ASBT (*SLC10A2*), OST α/β (*SLC51*) (94). Funkcí těchto transportérů je zachovat a kompartmentizovat ŽK, udržet tak jejich vysoké koncentrace ve střevním a hepatobiliárním traktu a omezit systémovou expozici (94).

Nicméně stále chybí komplexní pohled na metabolický dopad pozměněného cyklu žlučových kyselin. Studie zaměřené na interakce mezi enterohepatálním cyklem ŽK a patogenezi NASH jsou často zlomkovité a poněkud protichůdné. Například u obézních hlodavců se ztukovatěním jater se zdá, že sinusoidální transport ŽK je zachován, zatímco jejich kanalikulární transport je omezen, což má za následek mírnou cholestázu (95). V souladu s tímto byla jako důsledek pozorována zvýšená exprese Bsep (kanalikulární receptor), který zabraňuje nadměrné akumulaci lipidů v játrech (96). Jiná studie však naznačuje přesný opak, a to tak, že zvýšená jaterní exprese BSEP způsobuje hypercholesterolémii, díky zvýšení *in vivo* syntézy cholesterolu, a obezitu u myší (97). Otázkou tedy zůstává, zda změna transportérů ŽK, vyvolaná NASH, játra spíše zanáší kumulací lipidů a ŽK nebo naopak.

Počet klinických studií hodnotících expresi BSEP při NASH je omezený (98). Neexistují dostatečně jasné důkazy, které by podpořily roli BSEP (*ABCB11*) v náchylnosti nebo progresi NASH. Další studie na 358 pacientech s NAFLD, která měla za cíl najít souvislost mezi pokročilou jaterní fibrózou a běžným polymorfismem v genu *ABCB11* skončila s negativním výsledkem (99). Bude tedy nutné provést další studie k objasnění úlohy jaterních kanalikulárních a sinusoidálních transportérů ŽK v NASH.

1.5.2.3 Vliv ŽK na střevní mikrobiotu a NASH

Střevní bakterie pravděpodobně ovlivňují hromadění lipidů v hepatocytech, a to nezávisle na množství tělesného tuku. Zdá se, že pokud má člověk nízké hladiny ŽK, pak počet G+ bakterií ve střevě klesá (100). Progrese NASH je spojena s narušením střevní mikrobioty (také nazývané „dysbióza“), přesný mechanismus však není znám. Přesněji by změna mikrobioty mohla mít vliv na vývoj fibrózy, jaterní steatózy a zánětu (101). Z těchto poznatků vyplývá myšlenka, zabránit rozvoji/progresi NASH pomocí skladby střevních bakterií souvisejících se žlučovými kyselinami. Střevní mikrobiota se jeví jako kritický modulátor složení a velikosti poolu ŽK, a to prostřednictvím enzymatických reakcí (jako například dekonjugace, dehydroxylace, oxidace a epimerace) a může tak významně modifikovat chemické a signalizační vlastnosti žlučových kyselin (102).

U pacientů s NAFLD/NASH se objevil zvýšený počet bakterií metabolizujících taurin a glycin, což naznačuje zvýšenou produkci sekundárních ŽK ve střevě (103). Sekundární ŽK s největší pravděpodobností modulují FXR a TGR5 silněji než primární ŽK (104). DCA (antagonista FXR, sekundární ŽK) byla u těchto pacientů zvýšena, zatímco CDCA (agonista FXR, primární ŽK) byla snížena a můžeme tak částečně vysvětlit potlačení signalizace zprostředkované FXR a zpětnou blokadou syntézy ŽK pomocí FGFR4 (103). Změny ve složení cirkulujících ŽK s potenciálním přínosem pro NASH lze dosáhnout manipulací se střevním mikrobiomem nebo modulací transportérů žlučových kyselin pomocí vhodných substrátů (49).

Klinické studie u pacientů, kteří podstoupili bariatrický zákrok (nejčastěji je to bypass žaludku), prokazuje zvýšení hladin cirkulujících ŽK spolu s metabolickými výhodami a dále prokazuje i to, že by se ŽK mohly zapojovat do reverze NASH (105), což podporuje koncepci, že změny hladin ŽK mají relevantní metabolický efekt.

Vzhledem k dopadu signalizace FXR a TGR5 na metabolismus lipidů a glukózy, by modulatory těchto receptorů, které ovlivňují endogenní hladiny ŽK, mohly mít příznivé terapeutické účinky na NASH. Nové důkazy studií na myších a na lidech naznačují, že modulace FXR (ať už jaterního nebo střevního) nebo TGR5 může být užitečná při léčbě NAFLD/NASH, díky zvýšené sekreci inzulínu, zlepšené tkáňové senzitivitě, inhibici lipogeneze a stimulaci oxidace ŽK (57).

Jak jsem výše zmiňovala, střevní mikrobiota může ovlivňovat ŽK, ale to platí i obráceně, protože žlučové kyseliny jsou schopny modifikovat střevní mikrobiom. ŽK

mají jak přímé antimikrobiální účinky, tak mohou ovlivnit FXR receptor, který následně indukuje produkci antimikrobiálních peptidů, jako je například angogenin 1 (106).

Studie prováděné na „germ-free wild-tipe myších“ a na „FXR-deficientních myších“ ukázaly, že změny ve střevním mikrobiomu, které vedly ke změně kompozice ŽK a ke změně FXR signalizace, vytvořily u těchto myší predispozice k obezitě, která byla spojena i s výskytem NASH/NAFLD (107).

1.5.3 Experimentální modely NAFLD/NASH

Pokrok v léčbě těchto onemocnění byl dlouhou dobu omezen díky nedostatku adekvátních zvířecích modelů. Vhodný zvířecí model by měl reflektovat všechny aspekty složité etiopatogeneze, a také by měl odrážet histologické nálezy, které jsou typické pro dané stádium nemoci. Modely by měly být reprodukovatelné, jednoduché, spolehlivé a technicky dostupné. Výběr vhodného zvířecího modelu by mohl pomoci při porozumění komplexnosti patogeneze a k následnému objevu vhodné terapie (108).

V posledních letech se kladl velký důraz na vývoj vhodného modelu NASH. Většina modelů totiž úspěšně simuluje histologické změny, ale často jim chybí genetický nebo metabolický kontext lidského NASH (obezita, inzulinová rezistence, hyperglykémie, hyperinzulinémie, dyslipidémie, cytokinová/adipokinová nerovnováha) (109).

Je nutné zmínit fakt, že podle přirozené historie a patogeneze lidského NAFLD nemůže existovat ideální model. Pokrok od prosté steatózy k NASH pravděpodobně trvá roky, a navíc pouze malá část pacientů se ztukovatělými játry dojde až do fáze steatohepatitidy. Modely steatohepatitidy tedy tento progredující aspekt neodrážejí ani pokud přihlídneme ke kratší délce života potkanů. Modely chronického překrmování, u kterých se vyskytne steatóza, která následně progreduje do steatohepatitidy, jsou tak mnohem vhodnější. Tyto modely navíc odhalují i komplexnější souhru mezi jaterním poškozením a jeho vlivem na metabolické děje (110).

Jako pokusná zvířata se nejčastěji používají myši nebo potkani, u kterých se pozměňují buď určitá genetická nebo nutriční kritéria, popřípadě se tyto dvě roviny různě kombinují. Mezi nejčastější modely tak řadíme: genetické modely, diety s vysokým obsahem tuků HFD („High-fat diet“) nebo diety s nedostatkem cholinu a methioninu. U těchto modelů je běžný rozvoj jaterní steatózy a u některých modelů se následně objeví

i histologické znaky steatohepatitídy, přičemž jen malá část zvířat progreduje do stádia fibrózy (111).

Preklinické studie se obvykle provádějí na dobře definovaných populacích (druh, kmen, pohlaví, věk, hmotnost, laboratorní podmínky, nutriční atd.). Naproti tomu lidská populace se vyznačuje velkou heterogenitou hlavně díky interindividuální variabilitě, kam řadíme vlivy genetického pozadí, komorbidit, fyzické aktivity, léčiv, nutriční, životního stylu atd. I přes snahu sjednotit jedince klinických studií do nejvíce homogenních skupin, nedosahují tyto výsledky takové homogenity jako ve zvířecích modelech. Interpretovatelnost údajů je tedy pro člověka omezena a zásadní nálezy na zvířecích modelech musí být, pokud možno, ověřeny klinickým výzkumem (108).

Mezi nejvíce používané nutriční modely patří:

- „High-fat diet“, „Atherogenic diet“ (10 % w/w tuku, 2 % w/w cholesterolu)
- „High-fructose/sucrose diet“
- „High-fructose, high-fat diet“
- „Cafeteria diet“ (cookies, sýr, cereálie, krekry, zpracované maso atd.)
- „Methionine and choline-deficient diet“
- „Choline-deficient diet“.

Mezi nejvíce používané genetické modely patří:

- „Zucker fatty rats“
- „Zucker fatty rats+ high-fat diet“
- „Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats“ (108).

2. Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda solubilní endoglin (sEng) ovlivňuje transport žlučových kyselin u myši, u kterých byla navozena NASH („Non-alcoholic steatohepatitis“) pomocí vysokotukové diety. K objasnění mechanismu byla využita *in vivo* kinetická studie toku žluči a analýza exprese transportních proteinů, zodpovědných za transport žlučových kyselin v hepatocytu.

3. Praktická část

3.1 Metodiky

3.1.1 Chemikálie

Chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a Bio-Rad Laboratories (Herkules, CA, USA). Voda byla čištěna pomocí systému MilliQ (Schwalbach, Německo).

3.1.2 Pokusná zvířata

V experimentu byli použiti tři měsíce staří myši samci s podkladem CBAxC57BL/6J ($n = 8$, v každé skupině): 1) „wild-type“, kteří byli po dobu 6 měsíců krmeni standartní dietou (WT_{chow}); 2) „wild-type“ myši samci krmeni vysokotukovou dietou (cholesterol, glukóza a fruktóza) (WT_{HFD}); 3) samci exprimující lidský sEng ($sENG_{HFD}$), kteří byli krmeni vysokotukovou dietou, glukózou a fruktózou. Zvířata pocházela z Vivária Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Po celou dobu chovu ve viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové byly myši v přesně definovaném prostředí, s 12hodinovým režimem světla za den, při konstantní teplotě (22 ± 1 °C) a vlhkosti, s neomezeným přístupem ke kohoutkové vodě.

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

Byla provedena *in vivo* kinetická studie. Pomocí pentobarbitalu (50mg/kg) byla myším navozena anestezie a pod stereomikroskopem jim byl kanylován žlučník a odebírána žluč po dobu 45 min do předvážených zkumavek. Umístěním zvířat na vyhřívaných deskách byla udržována jejich tělesná teplota na 37 °C. Na konci experimentu byly myši usmrceny vykrvácením přes *vena cava*. Vzorky plazmy byly získány z plné krve centrifugací (3000 g, 5 min, 4 °C). Následně byly myším odebrána játra a vzorky byly ihned zmrazeny tekutým dusíkem a uchovány při teplotě -80 °C až do analýzy.

3.1.3 Kvantitativní RT-PCR

Pro stanovení genové exprese jednotlivých proteinových přenašečů (*Ntcp*, *Bsep*, *Mrp2*, *Mrp3* a *Mrp4*) byla využita kvantifikace jejich mRNA pomocí metody qRT-PCR

(„Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction“) za použití QuantStudio6 Flex Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, Thermo Fisher-scientific, Waltham, MA, USA). Část levého jaterního laloku byla zhomogenizována v TRI reagentu (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) za účelem extrakce RNA. Za použití NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (BioTech a.s. ČR) byla měřena absorbance vzorků při 260 nm a tím se stanovila přesná koncentrace RNA. Poměrem absorbance vzorků při 260 a 280 nm se stanovila čistota RNA. Za použití High Capacity cDNA Reverse Transcription KITu (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA) byla RNA přepsána do cDNA. Reakční směs obsahovala 12,5 ng analyzované DNA. Každý vzorek byl amplifikován v triplikátech pomocí TaqMan® Gene Expression Master Mixu a Taq-Man® Gene Expression Assay mixu pro jednotlivé geny – Tab. 1. Časově teplotní profil použitý 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 poté vypočítán podle:

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

kde E_{target} a $E_{\text{housekeeping}}$ jsou hodnoty efektivity určené ze sklonu kalibrační křivky pro každý gen, $\Delta C_{t_{\text{target}}}$ a $\Delta C_{t_{\text{housekeeping}}}$ jsou rozdíly prahových hodnot (C_t) mezi WT_{chow}, WT_{HFD} a sENG_{HFD} vzorky pro každý z genů, tj. Ntcp, Bsep, Mrp2, Mrp4 a referenční gen (Gapdh).

Tabulka 1. TaqMan® Gene Expression Assay kity (ThermoFisher Scientific) použité při kvantitativním real time RT-PCR.

Symbol genu	Transportér	Katalogové č. Life Technologies
<i>Slc10a1</i>	Ntcp	Mm00441421_m1
<i>Abcb11</i>	Bsep	Mm00445168_m1
<i>Abcc2</i>	Mrp2	Mm00496899_m1
<i>Abcc4</i>	Mrp4	Mm01226380_m1
<i>Gapdh</i>		Mm99999915_g1

3.1.4 Western blot analýza

Western blot (WB) analýze předcházela příprava vzorků, která probíhala za stálého chlazení tkáně na ledu. Zbývající část levého jaterního laloku, která se používala pro WB analýzu byla po odběru prudce zchlazena tekutým dusíkem a uchovávána při – 80 °C.

Játra byla homogenizována ve vychlazeném Tris-sukrózovém pufru (10 mmol/l Tris–HCl, 250 mmol/l sukrozy, pH 7,6), který obsahoval inhibitory proteáz (0,5 mg/ml leupeptinu, 0,5 mg/ml pepstatinu, 2 mg/ml aprotininu, 50 mg/ml benzamidinu a 40 mg/ml fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) za pomoci Magna Lyseru (Roche Diagnostics GmbH, Německo) 2 x 30 s při 6000 rpm. Peleta obohacené membránové frakce byla získána ze supernatantu po ultracentrifugaci (104 000 g, při 4 °C po 60 min). Následně byla peleta resuspendována v Tris-HCl pufru (50 mmol/l Tris–HCl, pH 7,4, obsahoval inhibitory proteáz – viz výše). Koncentrace proteinu byla stanovena BCA metodou (BCA Protein Assay Kit, Rockford, IL, U.S.A.) a vzorky byly uchovány při – 80 °C až do analýzy. Vzorky byly inkubovány se vzorkovým pufrem (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) při pokojové teplotě po dobu 30 min. Následně byly proteiny separovány pomocí SDS-PAGE („Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis“) s použitím gelu o koncentraci 6,25 % (pro proteiny o velikosti 150-200 kDa) a gelu o koncentraci 10 % (pro proteiny o velikosti 40 kDa). Poté byly proteiny přeneseny na PVDF (polyvinylidenfluoridovou) membránu (Millipore, NY, USA). Po dobu jedné hodiny byly membrány ponořeny do 5 % roztoku odtučňovacího

mléka s TRIS puřrem (0,05 % Tween 20) (TBS-T), kdy byla nespecifická vazebná místa blokována laktoglobuliny. Membrány byly inkubovány s primární a sekundární protilátkou při pokojové teplotě po dobu 1 h v koncentracích uvedených v Tab. 2. Následně byly membrány promyty v roztoku TBS-T a pomocí chemiluminiscenčního činidla (ECL kit, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, VB) byla provedena detekce. Chemiluminiscenční obraz pásů byl pořizen softwarem Evolution-capture (Fusion Solo 6S Edge, Vilber Lourmat SAS, Francie) a následně kvantifikován pomocí zobrazovacího softwaru ImageLab verze 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Jako endogenní kontrola byla stanovena exprese Gapdh.

Tabulka 2. Primární a sekundární protilátky použité pro Western blot

Protein	Velikost v kDa	Původ	Zředění	Zředění sekundární protilátky
Ntcp	50	Santa Cruz	1:3000	1:6000
Bsep	146	Thermo Fisher	1:1000	1:4000
Mrp2	150	Thermo Fisher	1:500	1:1000
Mrp4	150	Cell Signaling	1:2000	1:4000
Gapdh	37	Cell Signaling	1:8000	1:10000

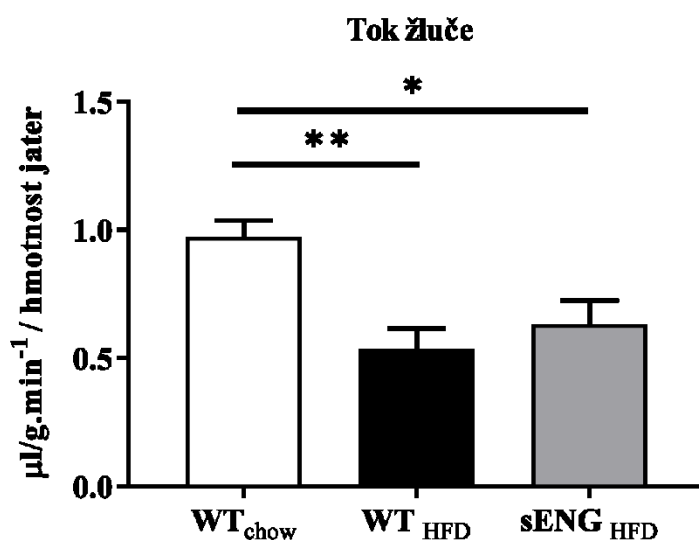
3.1.5 Statistická analýza dat

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

3.2 Výsledky

3.2.1 *In vivo* kinetická studie

Tok žluče, přepočtený na hmotnost jater znázorňuje Obr.11. Ve skupině krmené vysokotukovou dietou (WT_{HFD}) se tok žluče významně snížil na 54,88 % oproti skupině WT_{chow}. Současně i myši s vysokou plazmatickou hladinou sEng zároveň krmené vysokotukovou dietou (sENG_{HFD}) měli snížený tok žluče na 65,06 % v porovnání s WT_{chow} skupinou zvířat. Dlouhodobě podávaná vysokotuková dieta tedy vede ke snížení toku žluče, nicméně sEng tento efekt neovlivnil.



Obrázek 11. Tok žluče. Data jsou vyjádřena jako průměry \pm SEM ($n = 8$ v každé skupině); signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině WT_{chow} * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. WT_{chow} - „wild-type“ myši samci, kteří byli po dobu 6 měsíců krmeni standardní dietou; WT_{HFD} - „wild-type“ myši krmené vysokotukovou dietou (cholesterol, glukóza a fruktóza); 3) sENG_{HFD} - myši samci exprimující lidský sEng, kteří byli krmeni vysokotukovou dietou, glukózou a fruktózou.

3.2.2 qRT-PCR

Pro objasnění pozorovaných výsledků *in vivo* studie bylo provedeno měření genové exprese u *Ntcp*, *Bsep*, *Mrp2*, *Mrp3*, *Mrp4* genů (Obr. 12).

mRNA exprese *Ntcp* transportéru byla snížena u obou skupin zvířat krmených vysokotukovou dietou (na 51,91 % u WT_{HFD} a na 35,32 % u sEng_{HFD}) v porovnání s WT_{chow} skupinou zvířat. sEng nevedl k žádné významné změně v genové expresi *Ntcp*.

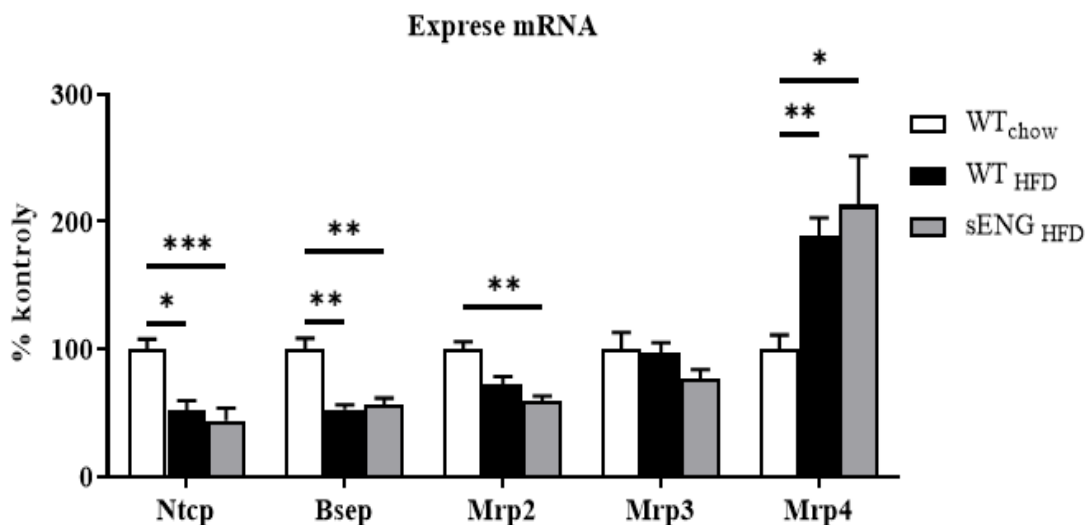
Expres *Bsep* na úrovni mRNA byla u WT myši s vysokotukovou dietou snížena na 52,6 % v porovnání se skupinou WT_{chow}. Myši s vysokou plazmatickou hladinou sEng krmené vysokotukovou dietou vykazovali také sníženou expresi *Bsep* (na 55,76 %) v porovnání s WT_{chow} skupinou zvířat. Nebyla pozorována žádná změna v expresi *Bsep* u sEng_{HFD} v porovnání s WT_{HFD}.

Expres *Mrp2* na úrovni mRNA nebyla u skupiny WT_{HFD} signifikantně změněna oproti myším WT_{chow} (snížení na 72,52 %). Ve skupině sEng_{HFD} byl pozorován signifikantní pokles exprese na 58,80 %. sEng neovlivnil genovou expresi *Mrp2* u myši s NASH.

Mrp3 genová exprese nebyla změněna ani u jedné experimentální skupiny zvířat.

Expres *Mrp4* mRNA byla signifikantně zvýšena u sEng myši, které byly krmeny vysokotukovou dietou (zvýšení na 213,27 %). Současně bylo pozorované zvýšení genové exprese i u WT_{HFD} skupiny myši (na 189,36 %).

Z grafu tedy lze vyčíst, že změna exprese mRNA příslušných genů je ovlivněna hlavně dlouhodobě podávanou vysokotukovou dietou a sEng jejich genovou expresi neovlivnil.



Obrázek 12. Grafické znázornění výsledků qRT-PCR analýzy *Ntcp*, *Bsep*, *Mrp2*, *Mrp3*, *Mrp4* transportérů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. (n = 8, v každé skupině). WT_{chow} - „wild-type“ myši samci, kteří byli po dobu 6 měsíců krmeni standardní dietou; WT_{HFD} - „wild-type“ myši krmeni vysokotukovou dietou (cholesterol, glukóza a fruktóza); sENG_{HFD} - samci exprimující lidský sEng, kteří byli krmeni vysokotukovou dietou, glukózou a fruktózou. Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině WT_{chow} (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). Kontrola = 100 %.

3.2.3 Western Blot

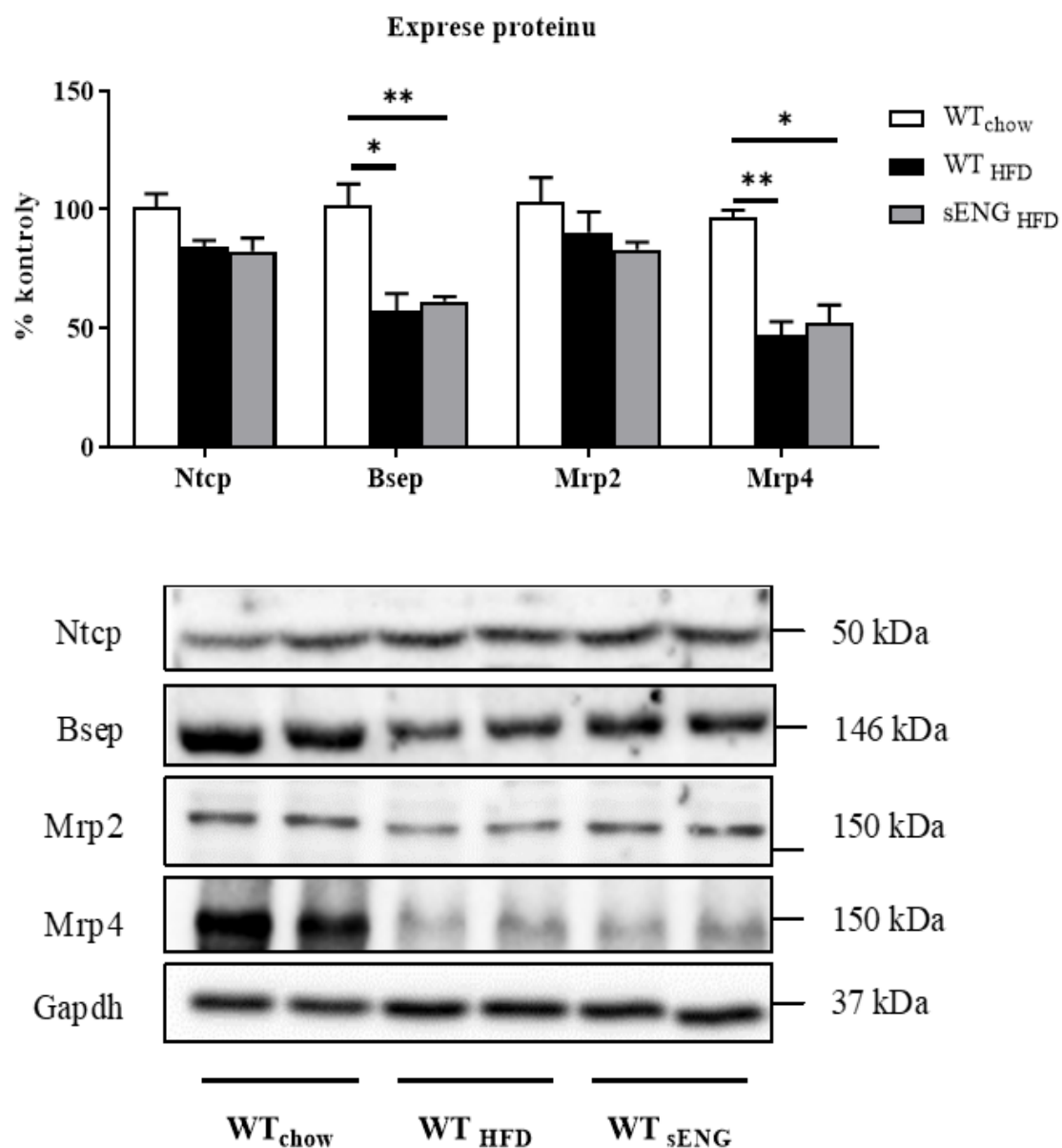
Expres transportérů na úrovni proteinu byla provedena metodou Western Blot. (Obr. 13).

Expres transportérů *Ntcp* a *Mrp2* nebyla signifikantně změněna ani u jedné experimentální skupiny zvířat.

Signifikantní snížení bylo pozorováno v expresi proteinu *Bsep*, kde u WT myši na vysokotukové dietě bylo snížení na 56,25 % a u sEng myši na vysokotukové dietě snížení na 60,18 %.

Expres *Mrp4* byla snížena na 54,16 % u sEng myši a na 48,73 % u WT_{HFD} skupiny zvířat.

Obr.14 obsahuje i reprezentativní obrázky Western blotu s denzitometrickou analýzou dat (kontrola = 100 %).



Obrázek 13. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy transportérů Ntcp, Bsep, Mrp2 a Mrp4. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. (n = 8, v každé skupině). WT_{chow} - „wild-type“ myši samci, kteří byli po dobu 6 měsíců krmeni standardní dietou; WT_{HFD} - „wild-type“ myši krmeni vysokotukovou dietou (cholesterol, glukóza a fruktóza); sENG_{HFD} - samci exprimující lidský sEng, kteří byli krmeni vysokotukovou dietou, glukózou a fruktózou. Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině WT_{chow} (* p < 0,05; ** p < 0,01). Kontrola = 100 %. Endogenní kontrola – Gapdh.

3.3 Diskuze

Endoglin (ENG, CD105 nebo endoglinový receptor TGF- β typu III) je přítomen na plazmatických membránách například endotelových buněk, fibroblastů, makrofágů, placentárních syncytiotrofoblastů nebo jaterních hvězdicových buněk (5). Exprese endoglinu byla prokázána v cévách postižených aterosklerózou, hlavně v endotelových buňkách a buňkách hladkého svalstva. Endoglin se vyskytuje jak u lidí, tak u myši a mnoha dalších druhů a hraje určitou roli v aterogenezi. Exprese endoglinu také souvisí s opravou stěny cév, expresí eNOS v endotelu, tvorbou kolagenu a stabilizací aterosklerotických lézí (6).

Solubilní forma endoglinu (sEng) vzniká štěpením endoglinu vázaného na membránu pomocí enzymu *metaloproteináza 14* (21). Solubilní endoglin byl detekován pomocí analýzy ELISA v plazmě, séru a moči u pacientů s různými patologickými onemocněními jako je například rakovina (prsů, prostaty, ovárií, slinivky), preeklampsie, kardiovaskulární a metabolická onemocnění typu hypercholesterolemie, Diabetes mellitus typu II (DM II), arteriální hypertenze nebo jaterní onemocnění a jeví se tak, jako biomarker těchto onemocnění (22).

Podkladem pro vznik NASH („Non-alcoholic steatohepatitis“) jsou právě metabolická onemocnění, hypercholesterolemie a nevhodná dieta (110). NASH je dynamickou formou NAFLD („Non alcoholic fatty liver disease“) a postihuje asi 2-3 % dospělé lidské populace. Z hlediska patologie prochází zprvu pouze ztukovatělá játra (=reversibilní stav) zánětlivou reakcí a dochází k destrukci hepatocytů a jejich náhradě vazivovou tkání (=ireversibilní poškození). Tento stav zánětlivé reakce doprovází i zvýšení aktivity aminotrasferáz (AST „Aspartate aminotransferase“, ALT „Alanine aminotransferase“). Při těžším průběhu vede NASH k jaterní cirhóze a až ke smrtelnému ohrožení života. Klinický obraz NASH zahrnuje hepatomegalii, obezitu a někdy i cirhózu. V laboratorním nálezu se objevují příznaky metabolického syndromu jako je dyslipidémie a hyperglykémie (83).

Studie Doleželová et al. 2019 prováděná na zdravých myších se standartní dietou potvrdila, že vysoké hladiny sEng ovlivňují homeostázu žlučových kyselin na základě komplexních účinků sEng na játra (24).

Doposud však nebyla provedena studie, která by se zabývala vlivem sEng na játra, která jsou již v důsledku nevhodné diety poškozena onemocněním NASH.

Cílem této diplomové práce tak bylo blíže objasnit vliv sEng na transportéry žlučových kyselin v myších játrech, které trpí NASH a navázat tak na předchozí studii Doleželová et al. 2019 (24).

V práci byly porovnávány 3 skupiny myší (WT_{chow} , WT_{HFD} , $sENG_{HFD}$). Myši byly krmeny buď standartní nebo vysokotukovou dietou. Jedna skupina myší na vysokotukové dietě současně vykazovala vysoké plazmatické hladiny sEng.

U obou experimentálních skupin myší s vysokotukovou dietou bylo pozorováno snížení toku žluče. Změny v transportních mechanismech byly pozorovány provedením analýzy genové a proteinové exprese transportérů zodpovědných za transport žlučových kyselin v játrech - *Ntcp*, *Bsep*, *Mrp2*, *Mrp3* a *Mrp4*.

Mezi jedinci WT krmenými standartní a vysokotukovou dietou došlo na úrovni mRNA k signifikantnímu snížení exprese *Ntcp* a *Bsep*. U skupiny zvířat s vysokou plazmatickou hladinou sEng bylo pozorováno snížení genové exprese *Ntcp*, *Bsep* i *Mrp2* transportních proteinů v porovnání s WT_{chow} skupinou myší. Naproti tomu genová exprese *Mrp4* byla u obou skupin myší s vysokotukovou dietou signifikantně zvýšena. Genové exprese ani jednoho z transportních proteinů nebyla ovlivněna sEng.

Z výsledků qRT-PCR analýzy vyplývá, že vysoké plazmatické koncentrace solubilního endoglinu u myší na vysokotukové dietě výrazně neovlivňovaly expresi mRNA u zkoumaných genů pro transportní systémy žlučových kyselin.

Mezi jedinci WT krmenými standartní dietou a vysokotukovou dietou došlo na úrovni proteinu k signifikantnímu snížení exprese *Bsep* transportéru. U skupiny zvířat s vysokou plazmatickou hladinou sEng bylo také pozorováno snížení exprese *Bsep* proteinu v porovnání s WT_{chow} skupinou myší. Tento protein původně pojmenovaný „sestra P-glykoproteinu“ je transportér ABC rodiny, úzce příbuzný s P-glykoproteinem (70). „Bile salt export pump“ je jednosměrný transportér, který je závislý na ATP. Účinně odčerpává konjugované ŽK z hepatocytu do žlučového kanálku a ten je odvádí do žluče a následně do gastrointestinálního traktu. (71). Snížená exprese *Bsep* transportního proteinu u obou skupin myší krmených vysokotukovou dietou může vysvětlovat snížení toku žluče oproti WT_{chow} skupině.

Western blot analýza dále prokázala signifikantní snížení exprese *Mrp4* transportéru („Multidrug resistance-associated protein 4“) u obou skupin zvířat krmených vysokotukovou dietou. *Mrp4* je bazolaterální efluxní transportér, který se podílí na eliminaci organických aniontů a žlučových kyselin z hepatocytu do sinusoidální krve. Upregulace efluxních transportérů v játrech (např. *Mrp2*, *Mrp3*, *Mrp4*) prokazatelně

přispívá ke zmírnění jaterního poškození u cholestatických jater (69). Zvýšená exprese Mrp4 by mohla vést ke zvýšení plazmatické koncentrace žlučových kyselin v plazmě u skupin zvířat s vysokotukovou dietou. Studie Lickteig et al., 2007 se zabývala vlivem NAFLD (zahrnující SHL („Simple fatty liver“) i NASH) na expresi efluxních transportérů potkaních jater a na vylučování metabolitu acetaminofenu (APAP). Studie prokázala, že v potkaních játrech došlo k výraznému zvýšení Mrp2/3/4 na úrovni mRNA i proteinu a po podání netoxické dávky APAP byly biliární koncentrace APAP-sulfátu, APAP-glukuronidu a APAP-glutathionu sníženy. Jejich zvýšené koncentrace byly naopak pozorovány v plazmě (112).

Expresе bazolaterálního Ntcp transportéru nebyla signifikantně ovlivněna ani mezi skupinami WT_{chow}/WT_{HFD}, ani mezi skupinami WT_{chow} a sENG_{HFD}. Ntcp neboli „Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide“ funguje jako elektrogenní sodíkový kotrasportér, který přenáší žlučové kyseliny z plazmy do hepatocytu (59). Mezi hlavní fyziologické substráty Ntcp patří všechny konjugáty ŽK s taurinem a glycinem, zatímco nekonjugované ŽK jsou slabé substráty.

Expresе Mrp2 efluxního transportéru nebyla signifikantně ovlivněna ani mezi skupinami WT_{chow}/WT_{HFD}, ani mezi skupinami WT_{chow} a sENG_{HFD}. Primární úlohou Mrp2 je omezit distribuci jeho substrátů v buňce (73).

Z výsledků diplomové práce je patrné, že solubilní endoglin neovlivnil ani genovou ani proteinovou expresi sledovaných transportérů. *In vivo* kinetická studie toku žluče signifikantně prokázala jeho snížení u myši krměných vysokotukovou dietou, a to nezávisle na přítomnosti solubilního endoglinu.

V této diplomové práci byly pozorovány signifikantní změny v genové/proteinové expresi transportních systémů mezi skupinami WT_{chow} a WT_{HFD}/sEng_{HFD}. Lze tudíž konstatovat, že pozorované změny jsou důsledkem vysokotukové diety nikoliv vlivu sEng.

Studie Doleželová et al. 2019, již potvrdila, že solubilní endoglin má vliv na homeostázu ŽK z důvodu komplexního vlivu na jejich metabolismus a transport v játrech u myši krměných standardní dietou (24). Z výsledků této diplomové práce nicméně vyplývá, že u jater poškozených NASH sEng neovlivňuje homeostázu ŽK.

3.4 Závěr

Diplomová práce byla provedena v návaznosti na předchozí studii Doleželová et al. 2019, která již prokázala vliv solubilního endoglinu na expresi jaterních transportérů žlučových kyselin (24). Tato studie porovnávala dvě skupiny myší, které byly krmeny standartní laboratorní dietou a jedna ze skupin vykazovala vysoké hladiny solubilního endoglinu v plazmě.

Tato diplomová práce se zabývala vlivem solubilního endoglinu (sEng) na metabolismus žlučových kyselin v játrech transgenních myší vykazujících vysoké hladiny sEng, kterým byla navozena NASH („Non-alcoholic steatohepatitis“) pomocí vysokotukové diety.

V práci byly porovnávány 3 skupiny myší (WT_{chow} , WT_{HFD} , $sENG_{HFD}$). Myši byly krmeny buď standartní nebo vysokotukovou dietou. Jedna skupina myší krmena vysokotukovou dietou současně vykazovala vysoké plazmatické hladiny sEng.

U obou experimentálních skupin myší s vysokotukovou dietou bylo pozorováno snížení toku žluče. Změny v transportních mechanismech byly pozorovány provedením analýzy genové a proteinové exprese transportérů zodpovědných za transport žlučových kyselin v játrech: Ntcp, Bsep, Mrp2, Mrp3 a Mrp4.

In vivo kinetická studie toku žluče signifikantně prokázala jeho snížení u myší krmených vysokotukovou dietou. Myši s vysokými hladinami solubilního endoglinu v krvi, které byly krmeny touto dietou, také vykazovaly snížený tok žluče.

Následně byl objasňován mechanismus tohoto efektu na molekulární úrovni, kdy byla zjišťována exprese jaterních transportních proteinů, které jsou odpovědné za sekreci žluče. Výsledky ukázaly, že myši krmené vysokotukovou dietou vykazují významný pokles exprese Bsep transportéru, což vysvětluje signifikantní snížení toku žluče. Nicméně v porovnání skupin WT_{HFD} a $sENG_{HFD}$ nebyly v expresi signifikantní rozdíly.

Závěrem lze říct, že vysoké hladiny solubilního endoglinu neměly signifikantní vliv na tok žluče ani na jaterní transportéry, tak jako tomu bylo v experimentu u myší krmených standartní dietou (24). Lze tudíž konstatovat, že pozorované změny nastaly pouze jako důsledek vysokotukové diety a solubilní endoglin je neovlivnil.

4. Seznam použitých zkratek

<i>ABC</i>	„ATP-binding cassette“
<i>ABCG5/8</i>	„ATP-binding cassette (ABC) transporters G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8)“
ALK	„Activin-like kinase“
ALT	„Alanine aminotransferase“
ASBT	„Apical sodium-dependent bile acid transporter“
AST	„Aspartate aminotransferase“
BAT	„Brown adipose tissue“
BCRP	„Breast cancer resistance protein“
BMP	„Bone morphogenetic protein“
BSEP	„Bile salt export pump“
CA	Cholová kyselina
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CAR	„Constitutive androstane receptor“
CDCA	Chenodeoxycholová kyselina
cDNA	Komplementární deoxynukleová kyselina
CYP	Izoformy cytochromu P450
CYP7A1	Cholesterol-7 α -hydroxyláza
COX-2	„Cyclooxygenase 2“
C4	7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on
DCA	Deoxycholová kyselina
DM II	„Diabetes Mellitus type II“
DNA	Deoxynukleová kyselina
D2	Jodtyronin-dejodinázu typu 2
ENG	Endoglin
L-endoglin	„Long endoglin“
S-endoglin	„Short endoglin“
sEng	Solubilní endoglin
ER	Endoplazmatické retikulum
FGF	„Fibroblast growth factors“
FXR	„Farnesoid X receptor“

GC	„Gas chromatography“
GCA	Glykocholová kyselina
GCDCA	Glykochenodeoxycholová kyselina
GPBAR1	„G-protein-coupled bile acid receptor 1“
GPCR	„G-protein coupled receptor“
HDL	„High density lipoprotein“
HFD	„High-fat diet“
HHT	Hereditární haemorrhagická telangiectázie
HMG-CoA	„ β -Hydroxy β -methylglutaryl-CoA“
HNF4 α	„Hepatic nuclear factor 4 α “
HPLC	„High-performance liquid chromatography“
IBABP	„Ileal bile-acid-binding protein“
ID1	„DNA-binding protein inhibitor“
IL	Interleukin
LCA	Litocholová kyselina
LDL	„Low-density lipoprotein“
Ldlr	„Low-density lipoprotein receptor“
LRH1	„Liver related homolog 1“
LXR α	„Liver X receptor α “
MAPK	„Mitogen-activated protein kinase“
MCA	Muricholová kyselina
MDR1	„Multi-drug resistance protein 1“
MDR2	„Multi-drug resistance protein 2“
MDR3	„Multidrug resistance-associated protein 3“
MMP14	„Metalloproteinase 14“
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MRP2	„Multidrug resistance-associated protein 2“
MRP4	„Multidrug resistance-associated protein 4“
NAFLD	„Non alcoholic fatty liver disease“
NASH	„Non-alcoholic steatohepatitis“
NTCP	„Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide“
OATP	„Organic anion transporting polypeptides“
OCA	Obeticholová kyselina
OST α/β	„Organic solute transporter α/β “

PAI-1	„Plasminogen activator inhibitor-1“
PAK	„Proteinkinase A“
PI3K	„Phosphoinositide 3-kinase“
PXR	„Pregnane X receptor“
RGD	„Arginylglycylaspartic acid“
sEng	Solubilní endoglin
SHIP	„Study of health in Pomerania“
SHP	„Small heterodimer partner“
Srb-1	„Scavenger receptor class B type 1“
Srebp	„Sterol regulatory element-binding proteins“
S1P2	„Sphingosin-1-phosphate receptor 2“
TAG	„Triacylglycerol“
TCA	Taurocholová kyselina
TCDC	Taurochenodeoxycholová kyselina
TGF- β	„Transforming growth factor β “
TGR5	„Takeda G-protein coupled receptor 5“
T4	Tyroxin
T3	Trijodtyronin
UDCA	Ursodeoxycholová kyselina
UHPLC	„Ultra-high performance liquid chromatography“
VDR	„Vitamin D receptor“
VSMC	„Vascular smooth muscle cells“
VLDL	„Very-low-density lipoprotein“
ZP	„Zona pellucida-like domain“
ŽK	Žlučové kyseliny
3'-UTR	„3'-untranslated region“

Poznámka:

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

5. Seznam použité literatury

- (1) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Základy histologie*, 1.vydání, Jinočany: H&H, 1997, str. 502, str. 303-311.
- (2) Mescher AL. *Junqueira's basic histology: text and atlas*. 12th ed., New York: McGraw-Hill Medical, 2010. str. 559, str. 332-342.
- (3) Čihák R, Grim M. *Anatomie 2*, 2.vydán, Praha: Grada, 2002, str. 488, str. 127-138.
- (4) 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 Jun; 100(6):355-360.
- (5) Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. *Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling*. Cell Signal. 2011 Apr; 23(4):683-699.
- (6) Rathouska J, Jezkova K, Nemeckova I, Nachtigal P. *Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction*. Atherosclerosis. 2015 Dec; 243(2):383-388.
- (7) Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. *The physiological role of endoglin in the cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 Oct; 299(4):H959-974.
- (8) Monné M1, Han L, Schwend T, Burendahl S, Jovine L. *Crystal structure of the ZP-N domain of ZP3 reveals the core fold of animal egg coats*. Nature. 2008 Dec; 456(7222):653-657.
- (9) Grodon KJ, Blobel GC. *Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease*. Biochim Biophys Acta. 2008 Apr; 1782(4):197-228.
- (10) Massagué J, Gomis RR. *The logic of TGFbeta signaling*. FEBS Lett. 2006 Apr; 580:2811-2820.
- (11) Wang J, Li J, Liu Q *Association between platelet activation and fibrinolysis in acute stroke patients*. Neurosci Lett. 2005 Aug; 384(3):305-309.
- (12) Vaughan DE. *PAI-1 and atherothrombosis*. J Thromb Haemost. 2005 Aug; 3(8):1879-1883.

- (13) Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carrón R, Sanz-Rodríguez F, Pérez-Barriocanal F, Rodríguez-Barbero A, Bernabéu C, López-Novoa JM. *Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation*. FASEB J. 2004 Mar; 18(3):609-611.
- (14) Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodríguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, López-Novoa JM, Bernabeu C. *S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology*. Circ Res. 2008 Dec; 103(12):1383-1392.
- (15) Fernandez LA, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodríguez F, Pericacho M, Rodríguez-Barbero A, Eleno N, López-Novoa JM, Düwell A, Vega MA, Bernabeu C, Botella LM. *Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia*. Hum Mol Genet. 2007 Jul; 16(13):1515-1533.
- (16) Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. *Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex*. J Cell Physiol. 2005 Aug; 204(2):574-584.
- (17) Pérez-Gómez E, Castillo G, Santibáñez JF, López-Novoa JM, Bernabéu C, Quintanilla M. *The Role of the TGF- β Coreceptor Endoglin in Cancer*. The Scientific World Journal. 2010 Dec; 14(10):2367-2384.
- (18) Velasco B, Ramírez JR, Relloso M, Li C, Kumar S, López-Bote JP, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM, Cowan PJ, d'Apice AJ, Bernabeu C. *Vascular gene transfer driven by endoglin and ICAM-2 endothelial-specific promoters*. Gene Ther. 2001 Jun; 8(12):897-904.
- (19) Düwell A, Eleno N, Jerkic M, Arevalo M, Bolanos JP, Bernabeu C, López-Novoa JM. *Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice*. Tumour Biol. 2007 Dec; 28(1):1-8.
- (20) Pérez-Gómez E, Eleno N, López-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabéu C, Quintanilla M. *Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development*. Oncogene. 2005 Jun; 24(27): 4450-4461.
- (21) Alt A, Miguel-Romero L, Donderis J, Aristorena M, Blanco FJ, Round A, Rubio V, Barnebeu C, Marina A. *Structural and Functional Insights into Endoglin Ligand Recognition and Binding*. PLoS One. 2012; 7(2):e29948.

- (22) Vitverova B, Blazickova K, Najmanova I, et al., *Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta*. *Atherosclerosis*. 2018 Apr; 271:15-25.
- (23) Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P. *Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP) -mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis*. *Cancer Res*. 2010 May; 70(10):4141-4150.
- (24) Dolezelova E, Sa ICI, Prasnicka A, Hroch M, Hyspler R, Ticha A, Lastuvkova H, Cermanova J, Pericacho M, Visek J, Lasticova M, Micuda S, Nachtigal P. *High soluble endoglin levels regulate cholesterol homeostasis and bile acids turnover in the liver of transgenic mice*. *Life Sci*. 2019 Sep; 232:116643.
- (25) Brodanová M et al., *Onemocnění žlučníku a žlučových cest*, 1.vydání, Praha: Grada, 1998, str. 260, str. 13-19.
- (26) Chiang JY. *Bile Acid Metabolism and Signaling*. *Compr Physiol*. 2013 Jul; 3(3):1191-1212.
- (27) Duane WC, Javitt NB. *27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects*. *J Lipid Res*. 1999 Jul; 40(7):1194-1199.
- (28) Hofmann AF. *Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity*. *Drug Metab Rev*. 2004 Oct; 36(3-4):703-722.
- (29) Chiang JY. *Regulation of bile acids synthesis*. *Front Biosci*. 1998 Feb; 3:d176-193.
- (30) Myant NB, Mitropoulos KA. *Cholesterol 7 alpha-hydroxylase*. *J Lipid Res*. 1977 Mar; 18(2):135-153.
- (31) Li YC, Wang DP, Chiang JY. *Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase in the liver. Cloning, sequencing, and regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase mRNA*. *J Biol Chem*. 1990 Jul; 265(20):12012-12019.
- (32) Baker DM, Wang SL, Bell DJ, Drevon CA, Davis RA. *One or more labile proteins regulate the stability of chimeric mRNAs containing the 3'-untranslated region of cholesterol-7alpha-hydroxylase mRNA*. *J Biol Chem*. 2000 Jun; 275(26):19985-19991.
- (33) Agellon LB, Cheema SK. *The 3' untranslated region of the mouse cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA contains elements responsive to post-transcriptional regulation by bile acids*. *Biochem J*. 1997 Dec; 328(Pt 2):393-399.

- (34) Blair BM. Srebp2: *A master regulator of sterol and fatty acid synthesis*. J Lipid Res. 2016 Mar; 57(3):333-335.
- (35) Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Lièvre X, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferré P, Foufelle F. *ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose*. Mol Cell Biol. 1999 May; 19(5):3760-3768.
- (36) Subbiah MT, Yunker RL. *Cholesterol 7 alpha-hydroxylase of rat liver: an insulin sensitive enzyme*. Biochem Biophys Res Commun. 1984 Nov; 124(3):896-902.
- (37) De Fabiani E, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G, Crestani M. *Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle*. J Biol Chem. 2003 Oct, 278(40):39124-39132.
- (38) Shin DJ, Campos JA, Gil G, Osborne TF. *PGC-1alpha activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis*. J Biol Chem. 2003 Dec, 278(50):50047-50052.
- (39) Lundåsen T, Liao W, Angelin B, Rudling M. *Leptin induces the hepatic high density lipoprotein receptor scavenger receptor B type I (SR-BI) but not cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a1) in leptin-deficient (ob/ob) mice*. J Biol Chem. 2003 Oct; 278(44):43224-43228.
- (40) Li T, Chanda D, Zhang Y, Choi HS, Chiang JY. *Glucose stimulates cholesterol 7alpha-hydroxylase gene transcription in human hepatocytes*. J Lipid Res. 2010 Apr; 51(4):832-842.
- (41) Li T, Kong X, Owsley E, Ellis E, Strom S, Chiang JY. *Insulin regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase expression in human hepatocytes: roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c*. J Biol Chem. 2006 Sep; 281(39):28745-28754.
- (42) Song KH, Chiang JY. *Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis*. Hepatology. 2006 Jan; 43(1):117-125.
- (43) Li T, Francl JM, Boehme S, Ochoa A, Zhang Y, Klaassen CD, Erickson SK, Chiang JY. *Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity*. J Biol Chem. 2012 Jan; 287(3):1861-1873.

- (44) Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. *Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid*. J Lipid Res. 2009 Sep; 50(9):1721-1734.
- (45) Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. *Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation*. Gastroenterology. 2005 Dec; 129(6):2009-2031.
- (46) Bennion LJ, Grundy SM. *Effects of diabetes mellitus on cholesterol metabolism in man*. N Engl J Med. 1977 Jun; 296(24):1365-1371.
- (47) Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, Matakai C, Sato H, Tanigawara Y, Schoonjans K, Itoh H, Auwerx J. *Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure*. J Biol Chem. 2011 Jul; 286(30):26913-26920.
- (48) Shaham O, Wei R, Wang TJ, Ricciardi C, Lewis GD, Vasani RS, Carr SA, Thadhani R, Gerszten RE, Mootha VK. *Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity*. Mol Syst Biol. 2008; 4:214.
- (49) Schaap FG, Trauner M, Jansen PL. *Bile acid receptors as targets for drug development*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014 Jan; 11(1):55-67.
- (50) Pols TW, Noriega LG, Nomura M, Auwerx J, Schoonjans K. *The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation*. J Hepatol. 2011 Jun; 54:1263-1272.
- (51) Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. *Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis*. Cell. 2000 Sep; 102(6):731-744.
- (52) Tu H, Okamoto AY, Shan B. *FXR, a bile acid receptor and biological sensor*. Trends Cardiovasc Med. 2000 Jan; 10(1):30-35.
- (53) Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N. *OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia*. Hepatology. 2005 Dec; 42(6):1270-1279.
- (54) Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ. *The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile*

- acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp*. Gastroenterology. 2001 Jul; 121(1):140-147.
- (55) Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M. *Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations*. Mol Pharm. 2006 May-Jun; 3(3):231-251.
- (56) Guo GL, Lambert G, Negishi M, Ward JM, Brewer HB Jr, Kliewer SA, Gonzalez FJ, Sinal CJ. *Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity*. J Biol Chem. 2003 Nov; 278(46):45062-45071.
- (57) Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, Arrese M, Trauner M. *Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives*. Hepatology. 2017 Jan; 65(1):350-362.
- (58) Jahn D, Rau M, Hermanns HM, Geier A. *Mechanisms of enterohepatic fibroblast growth factor 15/19 signaling in health and disease*. Cytokine Growth Factor Rev. 2015 Dec; 26(6):625-635.
- (59) Hagenbuch B, Meier PJ. *Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes*. Semin Liver Dis. 1996 May; 16(2):129-136.
- (60) Klaassen CD, Aleksunes LM. *Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation*. Pharmacol Rev. 2010 Mar; 62(1):1-96.
- (61) Dawson PA, Lan T, Rao A. *Bile acid transporters*. J Lipid Res. 2009 Dec; 50(12):2340-2357.
- (62) Zhang Y, Csanaky IL, Selwyn FP, Lehman-McKeeman LD, Klaassen CD. *Organic anion-transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4) is important for secondary bile acid metabolism*. Biochem Pharmacol. 2013 Aug; 86(3):437-445.
- (63) van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, van Esch A, de Waart DR, Oude Elferink RP, Kenworthy KE, Sticová E, al-Edreesi M, Knisely AS, Kmoch S, Jirsa M, Schinkel AH. *Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver*. J Clin Invest. 2012 Feb; 122(2):519-528.
- (64) Borst P, et al. *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst., 2000 Aug; 92(16):1295-1302.
- (65) van de Wetering K, et al. *Intestinal breast cancer resistance protein (BCRP)/Bcrp1 and multidrug resistance protein 3 (MRP3) / Mrp3 are involved*

- in the pharmacokinetics of resveratrol.* Mol Pharmacol. 2009 Apr; 75(4):876-885.
- (66) van de Wetering K, et al. *Targeted metabolomics identifies glucuronides of dietary phytoestrogens as a major class of MRP3 substrates in vivo.* Gastroenterology. 2009 Nov; 137(5):1725-1735.
- (67) Zollner G¹, Fickert P, Fuchsbichler A, Silbert D, Wagner M, Arbeiter S, Gonzalez FJ, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H, Trauner M. *Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine.* J Hepatol. 2003 Oct; 39(4):480-488.
- (68) Akita H, Suzuki H, Hirohashi T, Takikawa H, Suqiyama Y. *Transport activity of human MRP3 expressed in Sf9 cells: comparative studie with rat MP3.* Pharm Res. 2002 Jan; 19(1):34-41.
- (69) Boyer JL, *Bile formation and secretion.* Compr Physiol. 2013 Jul; 3(3):1035-1078.
- (70) Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. *The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver.* J Biol Chem. 1998 Apr; 273(16):10046-10050.
- (71) Cheng, X, Buckley D, Klaassen CD. *Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep expression.* Biochem Pharmacol, 2007 Dec; 74(11):1665-1676.
- (72) Jin W, Mitsche MA, Lütjohann D, Cohen JC, Xie XS, Hobbs HH. *Relative roles of ABCG5/ABCG8 in liver and intestine.* J Lipid Res. 2015 Feb; 56(2):319-330.
- (73) Nies AT, Keppler D. *The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2).* Pflugers Arch, 2007 Feb; 453(5):643-659.
- (74) Wang RB. et al. *Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors.* J Clin Pharm Ther, 2003 Jul; 28(3):203-228.
- (75) Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. *MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis.* Gastroenterology. 2001 May; 120(6):1459-1467.
- (76) Sticova E1, Jirsa M2. *ABCB4 disease: Many faces of one gene deficiency.* Ann Hepatol. 2020 Mar-Apr; 19(2):126-133.
- (77) Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. *Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic*

- steatohepatitis in the United States*. Gastroenterology. 2011 Oct; 141(4):1249-1253.
- (78) Younossi ZM, et al. *Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease – meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes*. Hepatology. 2016 Jul; 64(1):73-84.
- (79) Haring R, et al. *Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum γ -glutamyl transpeptidase levels*. Hepatology. 2009 Nov; 50(5):1403-1411.
- (80) de Ledinghen V, et al. *Diagnostic and predictive factors of significant liver fibrosis and minimal lesions in patients with persistent unexplained elevated transaminases. A prospective multicenter study*. J. Hepatol. 2006 Oct; 45(4):592-599.
- (81) Gottlieb A, Canbay A. *Why Bile Acids Are So Important in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Progression*. Cells. 2019 Oct; 8(11).
- (82) Okushin K, Tsutsumi T, Enooku K, Fujinaga H, Kado A, Shibahara J, Fukayama M, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K. *The intrahepatic expression levels of bile acid transporters are inversely correlated with the histological progression of nonalcoholic fatty liver disease*. J. Gastroenterol. 2016 Aug; 51(8):808-818.
- (83) Dítě P, et al. *Farmakoterapie v gastroenterologii*. 1.vydání, Praha: Galén, 2011, str.262, str. 130-132.
- (84) Bechmann LP, Kocabayoglu P, Sowa JP, Sydor S, Best J, Schlattjan M, Beilfuss A, Schmitt J, Hannivoort RA, Kilicarslan A, Rust C, Berr F, Tschopp O, Gerken G, Friedman SL, Geier A, Canbay A. *Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology. 2013 Apr; 57(4):1394-1406.
- (85) Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, Brouwer KLR, Barritt AS. *Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis*. Dig Dis Sci. 2015 Nov; 60(11):3318-3328.
- (86) Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, Milburn M. *Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease*. Metab Clin Exp. 2011 Mar; 60(3):404-413.
- (87) Duboc H, Tache Y, Hofmann AF. *The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application*. Dig Liver Dis 2014 Apr; 46(4):302-312.

- (88) Broeders EP, Nascimento EB, Havekes B, Brans B, Roumans KH, Tailleux A, et al. *The bile acid chenodeoxycholic acid increases human brown adipose tissue activity*. Cell Metab. 2015 Sep; 22(3):418-426.
- (89) Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. *Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1*. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr; 329(1):386-390.
- (90) Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. *TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis*. Cell Metab. 2009 Sep; 10(3):167-177.
- (91) Kumar DP, Asgharpour A, Mirshahi F, Park SH, Liu S, Imai Y, et al. *Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 modulates pancreatic islet alpha cells to promote glucose homeostasis*. J Biol Chem. 2016 Mar; 291(13):6626-6640.
- (92) Hotamisligil GS. *Inflammation and metabolic disorders*. Nature. 2006 Dec; 444(7121):860-867.
- (93) Perino A, Schoonjans K. *TGR5 and immunometabolism: insights from physiology and pharmacology*. Trends Pharmacol Sci. 2015 Dec; 36(12):847-857.
- (94) Dawson PA, Karpen SJ. *Intestinal transport and metabolism of bile acids*. J Lipid Res. 2015 Jun; 56(6):1085-1099.
- (95) Pizarro M, Balasubramaniyan N, Solis N, Solar A, Duarte I, Miquel JF. et al. *Bile secretory function in the obese Zucker rat: evidence of cholestasis and altered canalicular transport function*. Gut. 2004 Dec; 53(12):1837-1843.
- (96) Figge A, Lammert F, Paigen B, Henkel A, Matern S, Korstanje R, et al. *Hepatic overexpression of murine Abcb11 increases hepatobiliary lipid secretion and reduces hepatic steatosis*. J Biol Chem. 2004 Jan; 279(4):2790-2799.
- (97) Henkel AS, Kavesh MH, Kriss MS, Dewey AM, Rinella ME, Green RM. *Hepatic overexpression of abcb11 promotes hypercholesterolemia and obesity in mice*. Gastroenterology. 2011 Oct; 141(4):1404-1411.
- (98) Okushin K, Tsutsumi T, Enooku K, Fujinaga H, Kado A, Shibahara J, et al. *The intrahepatic expression levels of bile acid transporters are inversely correlated with the histological progression of nonalcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol. 2016 Aug; 51(8):80818.

- (99) Iwata R, Baur K, Stieger B, Mertens JC, Daly AK, Frei P, et al. *A common polymorphism in the ABCB11 gene is associated with advanced fibrosis in hepatitis C but not in non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Sci (Lond). 2011 Apr; 120(7):287-296.
- (100) Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, Takei H, Muto A, Nittono H, Ridlon JM, et al. *Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis*. J. Hepatol. 2013 May; 58(5):949-955.
- (101) Janssen AWF, Houben T, Katiraei S, Dijk W, Boutens L, Van Der Bolt N, Wang Z, Brown JM, Hazen SL, Mandard S, et al. *Modulation of the gut microbiota impacts nonalcoholic fatty liver disease: A potential role for bile acids*. J. Lipid Res. 2017 Jul; 58(7):1399-1416.
- (102) Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. *Bile acids and the gut microbiome*. Curr Opin Gastroenterol. 2014 May; 30(3):332-338.
- (103) Jiao N, Baker SS, Chapa-Rodriguez A, Liu W, Nugent CA, Tsompana M, Mastrandrea L, Buck MJ, Baker RD, Genco RJ, et al. *Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD*. Gut. 2018 Oct; 67(10):1881-1891.
- (104) Long SL, Gahan CGM, Joyce SA. *Interactions between gut bacteria and bile in health and disease*. Mol Asp Med. 2017 Aug; 56:54-65.
- (105) Kohli R, Myronovych A, Tan BK, Salazar-Gonzalez RM, Miles L, Zhang W, et al. *Bile acid signaling: mechanism for bariatric surgery, cure for NASH?* Dig Dis. 2015; 33(3):440-446.
- (106) Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, Peng L, Zhao G, Downes M, et al. *Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor*. Proc Natl Acad Sci U SA. 2006 Mar; 103(10):3920-3925.
- (107) Parseus A, Sommer N, Sommer F, Caesar R, Molinaro A, Stahlman M, et al. *Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor*. Gut. 2017 Mar; 66(3):429-437.
- (108) Kucera O, Cervinkova Z. *Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats*. World J Gastroenterol. 2014 Jul; 20(26):8364-8376.
- (109) Larter CZ, Yeh MM. *Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right*. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Nov; 23(11):1635-1648.
- (110) Schattenberg JM, Galle PR. *Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man*. Dig Dis. 2010; 28(1):247-254.

- (111) London RM, George J. *Pathogenesis of NASH: animal models*. Clin Liver Dis. 2007 Feb; 11(1):55-74.
- (112) Lickteig AJ, Fisher CD, Augustine LM, Aleksunes LM, Besselsen DG, Slitt AL, Manautou JE, Cherrington NJ. *Efflux transporter expression and acetaminophen metabolite excretion are altered in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease*. Drug Metab Dispos. 2007 Oct; 35(10):1970-1978.