

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Solubilný endoglin: vplyv na transport žlčových kyselín a
cholesterolu v pečeni**

**Soluble endoglin: effect on bile acids and cholesterol
transport in livers**

MÁRIA GREŠKOVÁ

Vedúci diplomovej práce: Prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant diplomovej práce: PharmDr. Eva Doleželová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Čestne prehlasujem, že som túto prácu spracovala samostatne na základe získaných teoretických vedomostí a je mojím pôvodným autorským dielom. Použitá literatúra, z ktorej som čerpala, je v práci riadne vyznačená a uvedená v zozname použitej literatúry. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Dátum:

Podpis:

PodĎakovanie

V prvom rade Ďakujem konzultantke mojej diplomovej práce, PharmDr. Eve Doleželovej, Ph.D. a vedúcemu diplomovej práce, Prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D., za získanie nových skúseností, poučenie, cenné rady a pripomienky pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Taktiež Ďakujem Mgr. Alene Prašnickej a všetkým spolupracovníkom, ktorí mi pomohli pri experimentálnej práci v laboratóriu. Prof. MUDr. Stanislavovi Mičudovi, PhD. a pracovníkom Ústavu farmakológie, Lekárskej fakulty v Hradci Králové Ďakujem za umožnenie pracovať na mojej diplomovej práci.

Veľké Ďakujem patrí aj mojim rodičom, sestram a manželovi, ktorí pri mne stáli a podporovali ma počas celého štúdia. Touto formou Vám vyslovujem svoje podĎakovanie.

Abstrakt

Mária Grešková

Solubilný endoglin: vplyv na transport žlčových kyselín a cholesterolu v pečeni

Diplomová práca

Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmácia

Cieľ práce:

Zvýšené plazmatické hladiny solubilného endoglínu (sEng) boli zistené u pacientov s prejavmi akútneho srdečného zlyhania, hypertenziou, diabetom mellitom typu 2, a ďalších metabolických a kardiovaskulárnych ochorení ako napr. hypercholesterolémia, ateroskleróza a cystická fibróza, ktoré ovplyvňujú i funkciu pečene. Vzhľadom k tomu, že nie sú dostupné dáta s vplyvom sEng na transport cholesterolu a žlčových kyselín, bolo zámerom tejto diplomovej práce popísanie tohoto procesu.

Metódy:

V experimente boli použité šesť mesiacov staré samice s vysokou hladinou sEng na CBAxC57BL/6J podklade a kontrolné myši (n = 8, v každej skupine), kŕmené tri mesiace štandardnou diétou. Pre zistenie toku žlče bola uskutočnená *in vivo* štúdia. Genová expresia transportných proteínov, ktoré zprostredkovávajú transport cholesterolu a žlčových kyselín bola stanovená metódou qRT-PCR.

Výsledky:

sEng nevedol k zmene v toku žlči ani ku zmenám v koncentrácii cholesterolu v plazme ani pečeni. Analýzou mRNA expresie transportných proteínov nebola zistená žiadna zmena medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou u *Sr-b1*, *Hmgcr*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Acat2*, *Abcb4*, *Abcb11*, *Abcc2*. Bola pozorovaná znížená mRNA expresia *Cyp7a1*.

Záver:

Výsledky diplomovej práce ukázali, že vysoká plazmatická hladina sEng znížila expresiu *Cyp7a1*, tzv. „rate limiting“ enzýmu v syntéze žlčových kyselín *de novo*. Vzhľadom k tomu, že neboli pozorované funkčné zmeny pečene je možné predpokladať, že sEng nebude ovplyvňovať metabolizmus cholesterolu a žlčových kyselín v tomto experimentálnom modeli.

Abstract

Mária Grešková

Soluble endoglin: effect on bile acids and cholesterol transport in livers

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background:

Increased plasma levels of soluble endoglin (sEng) have been shown in patients with acute heart failure, hypertension, diabetes mellitus type 2, and other metabolic and cardiovascular diseases such as e.g. hypercholesterolemia, atherosclerosis and cystic fibrosis, which influence as well liver functions. As there are no available data showing effect of sEng on the transport of cholesterol and bile acids, the aim of this diploma thesis was to describe them.

Methods:

In this study were used six months-old female mice with high level of sEng on CBAXC57BL/6J background and control mice (n = 8, in each group) fed with chow diet for three months. *In vivo* study was performed to analyze bile flow. mRNA expression of proteins responsible for cholesterol and bile acids transport and metabolism in the liver was performed by qRT-PCR.

Results:

sEng did not lead to changes neither in the bile flow nor in the concentration of cholesterol in plasma and liver. There were found no changes in the mRNA expression of *Sr-b1*, *Hmgcr*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Acat2*, *Abcb4*, *Abcb11*, *Abcc2*. sEng led to decrease in mRNA expression of *Cyp7a1*.

Conclusion:

The results of the diploma thesis showed that high plasma levels of sEng decreased mRNA expression of *Cyp7a1*, rate limiting enzyme in the synthesis of bile acids *de novo*. Nevertheless, there were found no functional changes in the liver. Therefore it can be assumed that sEng will not affect metabolism of cholesterol and bile acids in our experimental model.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	6
Obsah	8
1. Teoretická časť	10
1.1 Pečeň	11
1.1.1 Tvar a členenie pečene.....	11
1.1.2 Stavba pečene	13
1.1.3 Krvné zásobenie pečene.....	15
1.2 Transport látok v pečeni	16
1.2.1 Transport na bazolaterálnej membráne.....	17
1.2.2 Transport na kanalikulárnej membráne	21
1.3 Žlč	23
1.3.1 Žlčové cesty	24
1.3.2 Žlčové kyseliny	24
1.4 Cholesterol	26
1.5 TGF-β	26
1.6 Endoglín	28
1.7 Solubilný endoglín	33
2. Cieľ diplomovej práce	37

3. Experimentálna časť	38
3.1 Metodika	39
3.1.1 Chemikálie.....	39
3.1.2 Pokusné zvieratá	39
3.1.3 <i>In vivo</i> štúdia.....	39
3.1.4 Biochemická analýza.....	40
3.1.5 qRT-PCR	40
3.2 Výsledky	42
3.2.1 <i>In vivo</i> štúdia.....	42
3.2.2 Biochemická analýza.....	42
3.2.3 qRT-PCR	44
4. Diskusia.....	49
5. Záver	51
6. Zoznam použitých skratiek.....	53
7. Zoznam použitej literatúry	55

1. Teoretická část

1.1 Pečeň

Pečeň (*hepar*) je najťažšia a najväčšia žľaza ľudského tela s hmotnosťou asi 1,5 kg. Tvorí 1/50 hmotnosti tela, pričom muži majú väčšiu hmotnosť pečene ako ženy. V embryonálnom vývoji je sídlom krvotvorby (Čihák, 1988; Kuntz a Kuntz, 2009). Pečeň je umiestnená v pravej klenbe bránice, ku ktorej je pripevnená väzivovým puzdrom obaľujúcim jej hmotu, no zasahuje aj do ľavej klenby (Čihák, 1988; Dylevský, 2009). Hnedočervená, mäkká, pružná a krehká hmota s bohatým krvným riečiskom má mnoho metabolických funkcií. Účastní sa na metabolizme tukov a cukrov, biotransformácií xenobiotík a endogenných látok, podieľa sa na tvorbe a vylučovaní žlče, účastní sa na imunitných reakciách a má i vaskulárnu funkciu (Čihák, 1988; Kuntz a Kuntz, 2009).

1.1.1 Tvar a členenie pečene

Tvar pečene sa môže prirovnať k ovoidu oddelenému rovinou vedúcou šikmo zprava dole doľava hore. Pečeň sa člení na dve plochy, a to *facies diaphragmatica* a *facies visceralis* (Čihák, 1988).

Facies diaphragmatica sa stýka s bránicou a odpovedá myslenému segmentu ovoidu. Je súvislá a podľa smeru, ktorými je obrátená, sa na nej rozoznávajú jednotlivé časti:

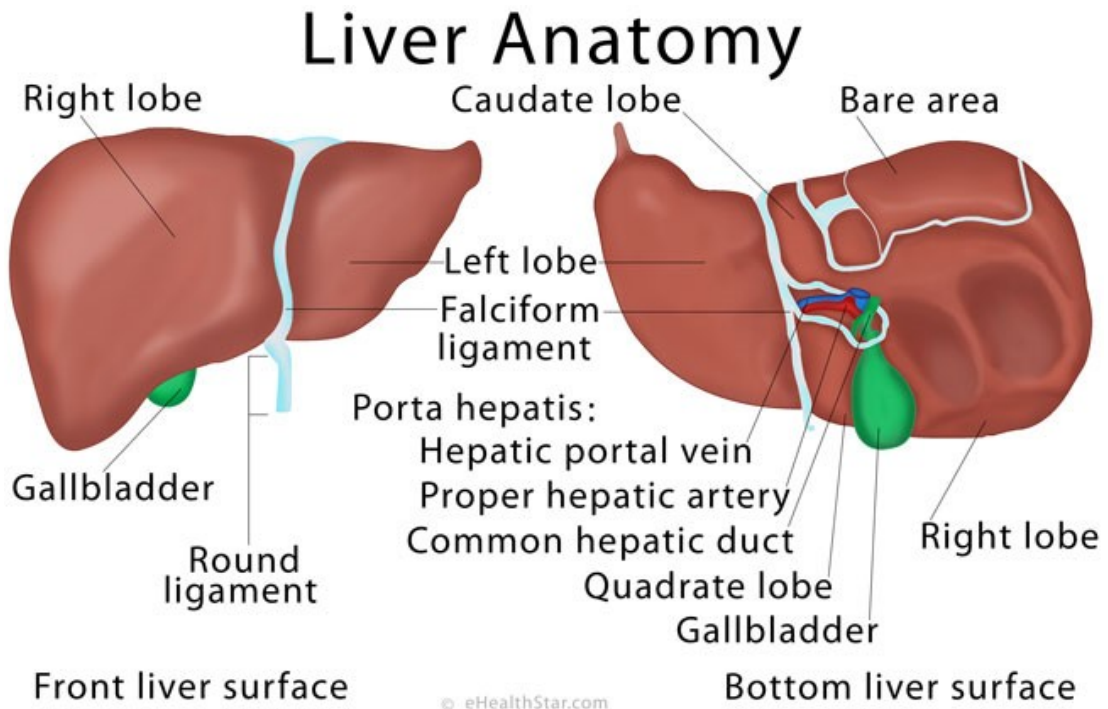
- a) *pars dextra* – časť obrátená doprava proti bránici a stene hrudníka,
- b) *pars anterior* – časť prilahlá dopredu na bránicu, na stenu hrudníka a na stenu brušnú,
- c) *pars posterior* – časť otočená k zadnej strane bránice a zadnej stene brušnej (Čihák, 1988).

Facies visceralis, obrátená dole proti brušným orgánom, odpovedá rovine oddeľujúcej myslený segment ovoidu. Táto spodná plocha pečene nesie charakteristické ryhy, ktoré oddeľujú štyri laloky pečene (*lobi hepatis*):

- a. *lobus dexter* (pravý lalok) – najväčší z lalokov,
- b. *lobus sinister* (ľavý lalok) – menší a plochý; medzi *lobus dexter* a *lobus sinister* sú:

- c. *lobus quadratus* (zaoblene štvorhranný lalok) – plochší a uprostred vpredu,
- d. *lobus caudatus* (oválny lalok) – mierne vyčnievajúci a najmenší z lalokov, lokalizovaný uprostred vzadu (Obr. 1) (Čihák, 1988).

Pečeňové ryhy, ktoré oddeľujú tieto laloky na *facies visceralis* je možné si predstaviť ako písmeno H, v ktorom sa rozlišujú sagitálne vklesliny, pravá a ľavá, a priečna vkleslina. Z priečnej vklesliny vstupujú do pečene cievy a vystupujú pečeňové žľčové vývody (Čihák, 1988; Kuntz a Kuntz, 2009). Priečna vkleslina sa nazýva *porta hepatis* a v nej vstupujú do pečene pravou a ľavou vetvou *arteria hepatica propria* a *vena portae*, zatiaľ čo z pečene vystupuje *ductus hepaticus dexter et sinister* (pravý a ľavý žľčový vývod pečene), ktoré sa spojujú v *ductus hepaticus communis* – spoločný vývod pečene. Pred rozdelením pravej a ľavej vetvy ciev a po spojení pravého a ľavého vývodu pečene je usporiadanie týchto útvarov *ductus hepaticus communis* vpredu vpravo, *a. hepatica propria* vpredu vľavo a *vena portae* vzadu (Čihák, 1988). Takéto miesto vstupu ciev a nervov a výstupu vývodov, ako *porta hepatis*, sa označuje ako hilus (*hilum*) (Čihák, 1988; Kuntz a Kuntz, 2009).

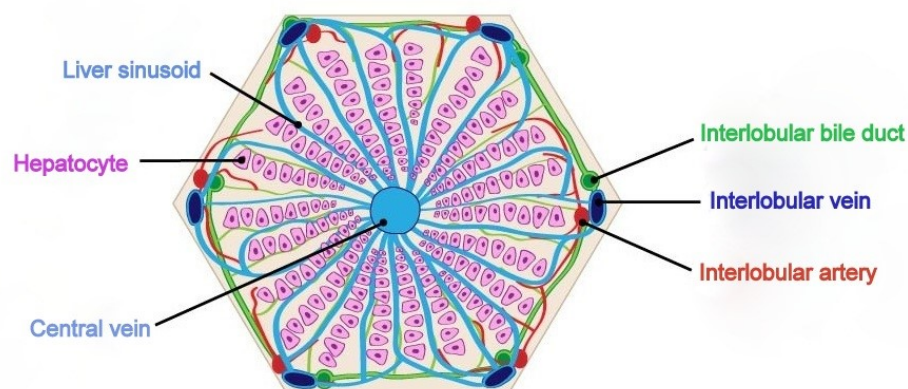


Obr. 1. Pečeň - Predný povrch pečene („Front liver surface“) a spodný povrch pečene („Bottom liver surface“). Predný povrch zobrazuje pravý lalok („Right lobe“), ľavý lalok

(„Left lobe“), kosákovitý väz („Falciform ligament“), kruhový väz („Round ligament“) a žlčník („Gallbladder“). Spodný povrch pečene ďalej zobrazuje zaoblene štvorhranný lalok („Quadrato lobe“), oválny lalok („Caudate lobe“), holé miesto („Bare area“) a *porta hepatis* („Porta hepatis“) zloženú z pečenej portálnej žily („Hepatic portal vein“), pravej pečenej cievy („Proper hepatic artery“) a spoločného pečenej žlčovodu („Common hepatic duct“). Prevzaté z (Modric, 2016).

1.1.2 Stavba pečene

Parenchým pečene je označenie pre špecifické tkanivo tvorené bunkami pečene – hepatocytmi (Čihák, 1988). Tvoria asi dve tretiny pečenej tkaniva, zvyšok tvoria neparenchýmové bunky. Patria medzi ne Kupfferove bunky, endotelové bunky („liver sinusoidal endothelial cells“ – LSEC), epitelové bunky žlčových ciest (cholangiocyty), Itove bunky (hviezdicové bunky) a Pit bunky (Ehrmann et al., 2014).



Obr. 2. Schéma pečenej lalôčky. V strede každého lalôčky je centrálna žila („Central vein“), okolo ktorej sú usporiadané hepatocyty („Hepatocyte“) a pečenej sinusoidy („Liver sinusoid“). Interlobulárny žlčový kanálik („Interlobular bile duct“), interlobulárna žila („Interlobular vein“) a interlobulárna artéria („Interlobular artery“) tvoria tzv. portálnu triádu. Prevzaté a upravené z (Fontana et al., 2014).

Existuje niekoľko možností ako popísať štruktúru pečene, a tak porozumieť jej funkcii. Najnázornejšie sa popisuje troma funkčne-štrukturálnymi jednotkami – pečeňový lalôčik, portálny lalôčik a pečeňový acinus (Fontana et al., 2014).

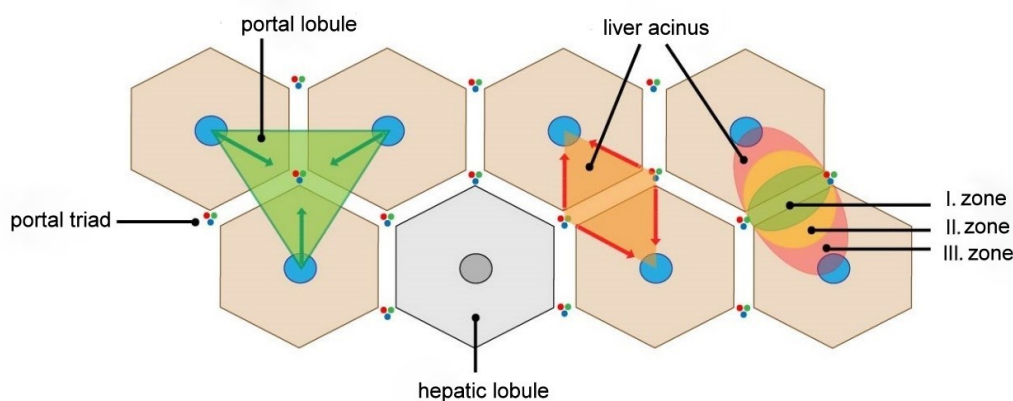
Anatomickou jednotkou pečene je pečeňový lalôčik – *lobulus* (Obr.2) (Rokyta et al., 2000). V pečeni sa nachádza päťdesiat až stotisíc pečeňových lalôčikov situovaných okolo centrálnej žily (*vena centralis*) (Ehrmann et al., 2014). Sú cylindrovitého tvaru a tvoria ich jednovrstvé až dvojvrstvé trámce buniek obklopené krvnými sinusoidami. *Vena centralis* pokračuje za sinusoidami do *vena hepatis*. Krvné sinusoidy su vystlané endotelom s veľkými pórami a fixnými makrofágmi - Kupfferovými bunkami, ktoré tu tvoria obrannú bariéru pred cudzorodým materiálom (Rokyta et al., 2000). Medzi endotelom a trámcami pečeňových buniek je úzky štrbinový priestor, ktorý sa nazýva Disseho priestor (Ehrmann et al., 2014). Tam sa filtruje plazma a cez póry prechádzajú rôzne molekuly. Týmto spôsobom vzniká lymfa, ktorá sa odvádza do lymfatických ciev v septe a ďalej do lymfatických uzlín. Medzi trámcami hepatocytov sa nachádzajú žľčovú kanáliky, ktoré zbierajú žľč vzniklú na žľčovom póle hepatocytov a odvádzajú ju do terminálnych žľčovodov v septe. V septe sa teda zídu terminálna portálna venula, z ktorej tečie krv do sinov a do *vena centralis*, *arteria hepatica*, ktorá predstavuje nutričný krvný obeh pečene, terminálny žľčovod, ktorým sa odvádza žľč do väčších žľčovodov, a lymfatická cieva odvádzajúca lymfu vzniklú v Disseho priestore (Rokyta et al., 2000). Je to tzv. portálna triáda (Fontana et al., 2014).

Základnú štruktúru pečene môžeme definovať tiež ako portálny lalôčik. Jedná sa o útvar orientovaný okolo portálnej triády, obsahuje všetky hepatocyty, z ktorých je žľč odvádzaná do jedného terminálneho žľčovodu. Portálny lalôčik je ohraničený dvoma alebo viacerými centrálnymi žilami (Ehrmann et al., 2014). Svoje vrcholy má v troch *vena centrales* a vykazuje teda tvar trojuholníku. Pečeňový (portálny) acinus má tvar oválu a je najmenšou funkčnou jednotkou. Krátku osu acinu tvoria spojnice susedných portálnych triád, dlhá osa prebieha medzi dvoma susednými centrálnymi žilami (Fontana et al., 2014). Portálny acinus je členený na tri zóny:

- 1) Zóna I – najbližšie prírodným cievam – najviac zásobená kyslíkom a živinami. Prevláda tu oxidatívny metabolizmus ako glukoneogenéza či proteosyntéza.
- 2) Zóna II – stredná – menej zásobená kyslíkom a živinami.

- 3) Zóna III – najbližšie k centrálnej žile – najmenej zásobená kyslíkom a živinami, prevažujú tu redukčné procesy napr. detoxikácia (Obr.3) (Ehrmann et al., 2014; Fontana et al., 2014).

Na základe popísaného delenia sa hepatocyty rozdeľujú na periportálne a perivenózne hepatocyty. Periportálne hepatocyty sú bohato zásobené kyslíkom a živinami, obsahujú mitochondrie a hladké endoplazmatické retikulum, a preto tu prevažuje oxidatívny metabolizmus napr. detoxikácia amoniaku syntézou urey. Perivenózne hepatocyty majú chudšie zásobenie kyslíkom a živinami, preto tu prevažujú redukčné reakcie napr. detoxikácia amoniaku cestou syntézy glutamínu (Fontana et al., 2014).



Obr. 3. Schéma zobrazujúca rozdiel medzi pečeňovým lalôčikom („hepatic lobule“), portálnym lalôčikom („portal lobule“) orientovaný okolo portálnej triády („portal triad“) a pečeňovým lalôčikom, zvaným tiež pečeňový acinus („liver acinus“), ktorý je rozdelený na I., II., III. zónu („zone“). Prevzaté a upravené z (Fontana et al., 2014).

1.1.3 Krvné zásobenie pečene

Krv priteká do pečene pečeňovou tepnou, ale tiež vrátnicovou (portálnou) žilou - privádza krv z oblasti tenkého a hrubého čreva (tzv. splachnická oblasť) a sleziny, a má hlavný podiel (70 %) na prívode krvi (Lukáš a Žák, 2007; Lüllman-Rauch, 2012). Táto krv je bohatá na vstrebané živiny, ktoré sú v pečeni premieňané (Lukáš a Žák, 2007). Žila aj tepna vstupujú do pečene v *porta hepatis*. Z pečene tu vystupujú žľčovody (*ductus*

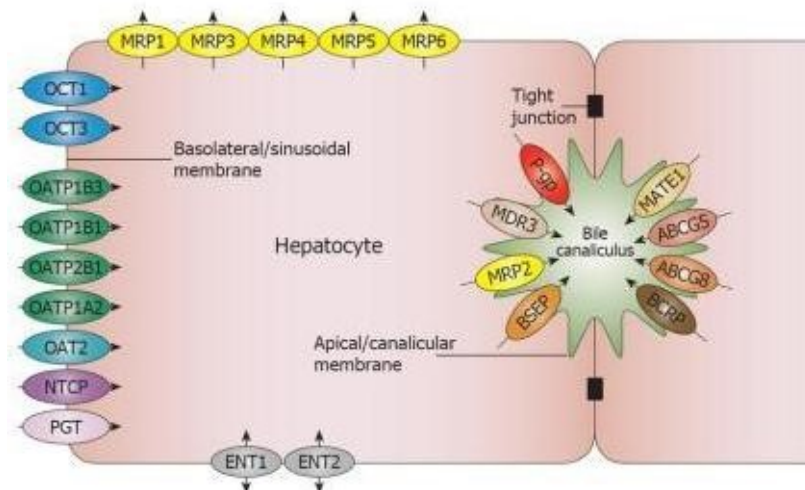
hepatici) (Lüllman-Rauch, 2012). V pečenevom lalôčiku spolu vždy beží portálna žila, pečenevá tepna a začínajúci žlčovod. Krv sa práve tu dostáva mimo klasický cievny systém, preteká tzv. sinusoidami okolo pečenevých buniek a je odvádzaná žilným systémom do pečenevých žíl (*vv. hepaticae*), ktoré ústia do dolnej dutej žily a napojujú sa na systémový krvný obeh. Začiatok pečenevých žíl predstavujú centrálné žily okolo pečenevých lalôčikov (Obr. 2.) (Lukáš a Žák, 2007; Lüllman-Rauch, 2012). Pečeňou prejde 1500 ml krvi za minútu, čo zodpovedá 30% minútového srdečného objemu (Rokyta et al., 2000).

1.2 Transport látok v pečeni

Transport látok v pečeni sprostredkávajú hepatocyty. Hepatocyty transportujú látky z krvi cez bazolaterálnu (sinusoidálnu) membránu, ďalej prebieha transport v cytozole hepatocytov, ale aj intracelulárna degradácia, biotransformácia, exkrécia látok a ich produktov do žlče cez apikálnu (kanalikulárnu) membránu (Ehrmann et al., 2014).

Veľa zlúčenín, endogénneho aj exogénneho pôvodu, sú vylučované z tela pečene. Lipofilné molekuly prechádzajú jednoduchou alebo facilitovanou difúziou, ostatné molekuly sa prepravujú pomocou transportných proteínov (Chandra a Brouwer, 2004; Kacevska et al., 2011). Dôležitý transportný systém sú aj iontové pumpy. Špecifické systémy, transportné proteíny, sa v hepatocytoch nachádzajú na bazolaterálnej (sinusoidálnej) a apikálnej (kanalikulárnej) membráne (Ehrmann et al., 2014). Anatomickú bariéru medzi membránami tvoria tesné spoje („tight junctions“) a takto sa udržiavajú koncentračné gradienty medzi krvou a žlčou (Obr. 4) (Trauner a Boyer, 2003).

Do superrodiny transkripčných faktorov patria nukleárne receptory PXR („Pregnan X Receptor“), CAR („Constitutive Androstane Receptor“), FXR („Farnesoid X Receptor“) a PPAR $\alpha/\delta/\gamma$ („Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha/delta/gama“) (Chandra a Brouwer, 2004). Ovplyvnením transkripcie génov transportných proteínov a enzýmov sa podieľajú na transporte a metabolizme (Kullak-Ublick et al., 2000).



Obr. 4. Bazolaterálne a kanalikulárne transportné proteíny hepatocytu. Na bazolaterálnej/sinusoidálnej membráne („Basolateral/Sinusoidal Membrane“) sa nachádzajú proteíny MRP („Multidrug resistance-associated protein“) 1, 3, 4, 5, 6, OCT („Organic cation transporters“) 1 a 3, OATP („Organic anion transporting polypeptides“) 1B3, 1B1, 2B1 a 1A2, OAT2 („Organic anion transporter-2“), NTCP („Sodium taurocholate co-transporting polypeptide“), PGT („Prostaglandin transporter“) a ENT („Equilibrative nucleoside transporter“) 1 a 2. Na apikálnej/kanalikulárnej membráne („Apical/Canalicular Membrane“) sa nachádzajú transportéry P-gp („P-glycoprotein“), MDR3 („Multidrug resistance protein 3“), MRP2 („Multidrug resistance-associated protein 2“), BSEP („Bile salt export pump“), MATE1 („Multidrug and toxin extrusion protein-1“), ABCG5 („ATP-binding cassette transporter G family member 5“), ABCG8 („ATP-binding cassette transporter G family member 8“) a BCRP („Breast cancer resistance protein“). Prevzaté a upravené z (Anonymous, 2017).

1.2.1 Transport na bazolaterálnej membráne

Hlavný transportný systém na bazolaterálnej membráne je sodno-draselná pumpa udržiavajúca vysokú cytosolickú koncentráciu draslíka a nízku koncentráciu sodíka, a ATP-dependentná Ca^{2+} pumpa, udržiavajúca nízku cytosolickú koncentráciu vápnika (Ehrmann et al., 2014). Na^+/K^+ -ATP-áza vymieňa tri intracelulárne ióny sodíka za dve extracelulárne ióny draslíka pričom zachováva chemický gradient (Sherlock a Dooley, 2008). Tento chemický, sodíkový, gradient je hnacou silou pre ďalšie transportéry.

Glukóza je v hepatocytoch vychytávaná facilitovanou difúziou GLUT2 transportérom, nezávislým na inzulíne. Na bazolaterálnej membráne sa ďalej nachádzajú transportné proteíny zaisťujúce transport rôznych endogénnych a exogénnych látok (Ehrmann et al., 2014).

1.2.1.1 NTCP (*SLC10A1*)

„Sodium taurocholate co-transporting polypeptide“ je transportný proteín, ktorý sprostredkováva vychytávanie žlčových solí závislých na sodíku z portálnej cirkulácie (Van Berge Henegouwen et al., 2001; You a Morris, 2007). Tieto žlčové soli sú konjugované s glycínom alebo taurinom (Sherlock a Dooley, 2008). Nekonjugované alebo sulfátované žlčové kyseliny sa transportujú tiež, ale len v obmedzenom množstve (Tazuma a Takikawa, 2017). Príjem žlčových solí sa deje kotransportom dvoch molekúl sodíka s jednou molekulou taurocholátu poháňaný sodíkovým gradientom, ktorý udržiava Na^+/K^+ -ATP-áza (Trauner a Boyer, 2003). NTCP umožňuje prenos aj iných látok, napr. steroidov, cyklických oligopeptidov, niektorých liečiv (verapamil) a hormónov štítnej žľazy (Ehrmann et al., 2014; Trauner a Boyer, 2003). Transportér bol tiež identifikovaný ako celulárny receptor pre ľudský vírus hepatitídy B (HBV) (Chen et al., 2016). Regulácia NTCP transportéru je dôležitá pre potlačenie ďalšieho prítoku prípadných toxických žlčových kyselín (Tazuma a Takikawa, 2017).

1.2.1.2 OATP (*SLCO*)

„Organic anion transporting polypeptides“ je rodina transportérov, ktoré sprostredkujú vychytávanie cholefilných molekúl nezávislých na Na^+ (Cao et al., 2001). Vychytávanie prebieha facilitovanou výmenou s intracelulárnymi iónmi napr. GSH, HCO_3^- (Trauner a Boyer, 2003). OATP transportéry sú nielen v pečeni, ale aj v srdci, pľúcach, tenkom čreve, obličkách, hematoencefalickej bariére, placentе a semenníkoch (Piscitelli a Rodvold, 2007). U človeka bolo identifikovaných 11 transportérov OATP rodiny (Kalliokoski a Niemi, 2009). Vychytávajú nielen konjugované, ale aj nekonjugované žlčové soli, bilirubín, kardioglykozidy, neutrálne steroidy, organické katióny a množstvo liečiv (Trauner a Boyer, 2003).

1.2.1.3 OAT (*SLC22*)

„Organic anion transporters“ transportujú menšie a viac hydrofilné organické anióny než OATP proteíny. Rodina OAT sa skladá z 10 členov vyskytujúcich sa v mozgu, placenty, kostrových svaloch aj bazolaterálnej membráne proximálneho tubulu obličiek (Nigam et al, 2015; Roth et al., 2012). V pečeni je najviac zastúpený OAT2. OAT7 sa vyskytuje vo fetálnej pečeni a pečeni dospelých na bazolaterálnej membráne (Roth et al., 2012). OAT1 a OAT3 majú podobnú substrátovú špecifickosť pre liečivá (Bush et al., 2017). Prenos látok sa deje výmenou organického aniónu s dikarboxylátom (napr. α -ketoglutarátom). Sodno-dikarboxylátový kotransportér udržiava gradient α -ketoglutarátu (Roth et al., 2012).

1.2.1.4 OCT (*SLC22A*)

„Organic cation transporters“ sú transportéry prenášajúce organické katióny facilitovanou difúziou obojsmerne. Obsahujú širokú škálu substrátov ako acetylcholínové, cholínové a monoaminové neurotransmitery, až po radu xenobiotik (napr. metformín) (Lee et al., 2009). U človeka nachádzame OCT1, OCT2, OCT3 (Nigam et al., 2015). OCT1 je exprimovaný hlavne v pečeni na bazolaterálnej membráne a luminálnej membráne pľúc. OCT2 identifikujeme na luminálnej membráne proximálnych tubulov v obličkách a pľúcach, no aj v pyramídových bunkách mozgovej kôry a hipokampe. OCT3 nachádzame v pečeni, placenty, obličkách, kostrových svaloch, pľúcach, srdci a mozgu. OCT3 je tiež známy ako extraneuronálny monoaminový transportér (Roth et al., 2012).

1.2.1.5 OST α/β (*SLC51*)

„Organic solute transporter“ je heterodimérny transportér nachádzajúci sa na bazolaterálnej membráne, ktorý prenáša alebo vychytáva žľožové kyseliny a steroidy. Väčší, polytopický membránový proteín sa označuje ako OST α . Menší, jednopriechodový membránový proteín je OST β (Dawson et al., 2010). Transport je obojsmerný, sprostredkovaný facilitovanou difúziou v závislosti od elektrochemického gradientu prenášaného substrátu. Je exprimovaný v tenkom čreve, pečeni, obličkách,

semenníkoch a nadobličkách (Ballatori et al., 2009). Hlavnú úlohu hraje OST α/β v enterohepatálnej cirkulácii žlčových kyselín (Dawson et al., 2010; Mihaljevič et al., 2017).

1.2.1.6 MRP1 (ABCC1)

„Multidrug resistance-associated protein-1“ je exprimovaný takmer vo všetkých ľudských tkanivách. Najviac je zastúpený v pľúcach, slezine, semenníkoch, obličkách, štítnej žľaze, placentе, močovom mechúri a nadobličkách (Yin a Zhang, 2011). MRP1 je lokalizovaný aj v choroidnom plexe a spolu s P-glykoproteínom, ktorý je na luminálnej membráne mozgových buniek, hraje dôležitú úlohu v ochrane CNS pred rôznymi xenobiotikami (Suzuki, 1999). Zaisťuje eflux liečiv, aniónov ťažkých kovov, toxických látok, konjugátov glutatiónu (napr. leukotrién C4), glukuronidu, sulfátu a mnohých ďalších substrátov (Keppler, 2011; Yin a Zhang, 2011). Transport týchto konjugátov chráni tkanivá pred poškodením. Niektoré substráty MRP1 sú stimulované glutationom (GSH), niektoré na ňom závislé (Grant et al., 2008). Substráty MRP1 sú aj cytostatiká (napr. antracyklíny, epipodofylotoxíny, vinca alkaloidy, metotrexát), na ktoré sa, pri nadmernej expresii MRP1, získava rezistencia v liečbe rakoviny (Yin a Zhang, 2011). MRP1 je negatívnym indikátorom v liečbe (Grant et al., 2008).

1.2.1.7 MRP3 (ABCC3)

„Multidrug resistance-associated protein 3“ je transportér lokalizovaný na bazolaterálnej membráne. Sprostredkováva eflux organických aniónov ako sú lipofilné konjugáty glukuronátu, sulfátu, glutationu, glukuronidy bilirubínu do krvi (Keppler, 2014; Lee et al., 2004). Na rozdiel od MRP1 a MRP2 neprenesie GSH, no jeho konjugáty áno v nízkej miere (Grant et al., 2008). MRP3 je dôležitý pri nefunkčnosti MRP2 a konjugovanej hyperbilirubinémii pri cholestáze. Transportujú sa takto glukuronidy bilirubínu do moču. V intestinálnom epiteli sa glukuronidy bilirubínu, transportované cez MRP3 do krvi, podieľajú na zásobe bilirubínu v sére (Keppler, 2014). Expresia MRP3 je za fyziologických podmienok nízka (Chai et al., 2012). Expresia génu je znížená aj u kožných nádorov, nárast podporuje rezistenciu na chemoterapiu (Wiel et

al., 2016). Zvýšená expresia je tiež pri extrahepatálnej cholestáze, v pokročilých štádiách primárnej biliárnej cirhózy a je spojená so zvýšenou hladinou TNF α (Chai et al., 2012).

1.2.2 Transport na kanalikulárnej membráne

Kanalikulárny transport je sprostredkovaný MDR1 (*ABCB1*), MRP2 (*ABCC2*), BSEP (*ABCB11*), BCRP (*ABCG2*) a MDR3 (Köck a Brouwer, 2012; Wang et al., 2012). Látky sú vylučované do žlče primárne proteínmi nadrodiny ABC. Tento proces je závislý od ATP. Na apikálnej/kanalikulárnej membráne sa tiež nachádza efluxný transportér pre katióny MATE1 („Multidrug and toxin extrusion exchanger-1“) (Köck a Brouwer, 2012).

1.2.2.1 MRP2 (*ABCC2*)

„Multidrug resistance-associated protein 2“ je transportér nachádzajúci sa v pečeni, obličkách, črevách, mozgu a prsiach. MRP2 je lokalizovaný na kanalikulárnej membráne hepatocytov, proximálnych tubuloch obličiek a membráne tenkého čreva (Chai et al., 2015). MRP2 je tiež známy ako cMOAT („Canalicular multispecific organic anion transporter“). Je exprimovaný nádorovými bunkami a prispieva k multidrogovej rezistencii (Myint et al., 2015). Exportuje a detoxikuje endogénne látky aj xenobiotiká (Keppler, 2014). Zabezpečuje vylučovanie konjugovaných organických aniónov ako bilirubínu, konjugovaných žlčových kyselín, glutatiónu a liečiv. U pacientov s Dubin-Johnsonovým syndrómom je žltacka a hyperbilirubinémia prejavom nefunkčnosti MRP2 (Chai et al., 2015). Nedostatok MRP2 pri tejto chorobe spôsobuje, že je transport glukuronidov bilirubínu presmerovaný prostredníctvom MRP3 transportéru do moču. Takto sa kompenzuje nedostatok MRP2 (Keppler, 2014).

1.2.2.2 BSEP (*ABCB11*)

„Bile salt export pump“ je proteín lokalizovaný výlučne na kanalikulárnej membráne hepatocytov. Zohráva dôležitú úlohu pri transporte žlčových kyselín, primárne

monoanionických konjugovaných žľových kyselín (Suchy a Ananthanarayanan, 2006). Žľové kyseliny sú hnacou silou toku žľče a tento transportér k nim vykazuje vysokú afinitu (Köck a Brouwer, 2012; Suchy a Ananthanarayanan, 2006). Inhibítormi BSEP je mnoho liečiv napr. rifampicín, cyklosporín A, glibenklamid (Suchy a Ananthanarayanan, 2006). Zníženie funkcie BSEP môže viesť k zníženiu sekrécie žľových kyselín, cholestáze až k poškodeniu pečene (Köck a Brouwer, 2012).

1.2.2.3 MDR1 (*ABCB1*)

„Multidrug resistance protein 1“ alebo „P-glykoproteín“ (P-gp) transportuje rozmanitú škálu endogénnych látok (napr. leukotriény, estrogénové konjugáty), xenobiotiká, ťažké kovy, organické anióny a lipidy (He et al., 2011). Eliminuje peptidy, toxíny a xenobiotiká v bariérových orgánoch (Inui et al., 2012). V tenkom čreve, hepatocytoch, hematoencefalickej bariére a proximálnych tubuloch obličiek MDR1 transportuje liečivá z buniek (Wessler et al., 2013). Blokuje aj prenos hydrofóbných xenobiotík cez placentu (Milojkovic et al., 2015). MDR1 bol lokalizovaný v hematopoetických aj nádorových bunkách. Znížením intracelulárnych koncentrácií látok chráni organizmus (Inui et al., 2012). MDR1 ovplyvňuje farmakokinetiku mnohých podávaných liečiv (Li et al., 2015). Vysoká expresia P-gp znižuje účinnosť liečiv (Milojkovic et al., 2015). Pri karcinóme renálnych buniek, rakovine vaječníkov a iných nádorových bunkách môže viesť k rezistencii na chemoterapeutiká (napr. doxorubicin, daunomycin, vinkristin) (Gao et al., 2015; Schuurhuis et al., 1995).

1.2.2.4 MDR3 (*ABCB4*)

„Multidrug resistance protein 3“ je lokalizovaný na kanalikulárnej membráne hepatocytov a transportuje fosfolipidy (najmä fosfatidylcholín) do žľče. Fosfatidylcholín je dôležitý pre solubilizáciu cholesterolu a žľových solí do zmiešaných micel, prevenciu toxicity žľových kyselín a kryštalizáciu cholesterolu (Falguières et al., 2014; Morita a Terada, 2014). Genetické defekty tohto génu môžu spôsobiť progresívnu familiárnu intrahepatálnu cholestázu typu 3 a iné cholestatické a cholelitiázové ochorenia (Falguières et al., 2014). Myšací Mdr2 je homológom ľudského (Morita a Terada, 2014).

1.2.2.5 BCRP (*ABCG2*)

Presne ako MRP1 a P-gp, aj BCRP („Breast cancer resistance protein“) hrá úlohu v multirezistencii chemoterapie, ďalej regulácii biologickej dostupnosti liečiva a ochrane rakovinových kmeňových buniek. BCRP sa nachádza v tenkom a hrubom čreve, pečeni, prsnom tkanive, placentе, žlčníku, hematoencefalickej membráne, kmeňových hematopoetických bunkách a v ďalších tkanivách (Mo a Zhang, 2012).

V pečeni je BCRP lokalizovaný na kanalikulárnej membráne hepatocytov, kde zabezpečuje eflux toxických metabolitov, sulfátovaných a glukuronidových konjugátov xenobiotík a hormónov (Mo a Zhang, 2012). BCRP funguje tiež ako marker rakovinových kmeňových buniek (Liang et al., 2015). Zvýšená expresia transportéru spôsobuje rezistenciu na chemoterapeutiká, ale napríklad inhibítory tyrozínkinázy pri vysokých koncentráciách inhibujú tento transportér (Galetti et al., 2015). Inhibícia BCRP pôsobí proti rezistencii, čo by mohlo mať prínos pre liečbu (Wiese, 2015).

1.3 Žlč

Žlčník (*vesica fellea*) je hruškovitý vak, v ktorom sa zhromažďuje žlč. Leží na spodnej ploche pravého laloku pečene a má objem 50-80 ml u človeka (Lukáš et al., 2005).

Žlč je žltohnedá tekutina vylučovaná hepatocytmi, obsahujúca vodu, soli žlčových kyselín, cholesterol, lecitín, bilirubín, steroidné hormóny, vitamíny a ďalšie látky podieľajúce sa na metabolizme tukov (Kittnar et al., 2011). Za jeden deň sa vyprodukuje približne 700-1200 ml žlče (Trojan et al., 1999). Prúdi centrifugálne – v opačnom smere než krv (Lüllman-Rauch, 2012). V pečeni je žlč nevyhnutná pre trávenie a absorpciu tukov. Pomocou nej sú v organizme vylučované rôzne endogénne (napr. cholesterol, žlčové farbivá) aj exogénne látky (ťažké kovy, fenothiaziny atď.) (Kittnar et al., 2011). Časť sa zhromažďuje a zahusťuje v žlčníku (Trojan et al., 1999). Do čreva sa žlč uvoľňuje po príjme potravy, no niektoré zložky žlče sú späť rezorbované z čreva a opäť vylučované pečeňou, čo nazývame enterohepatálny obeh (Kittnar et al., 2011; Lukáš et al., 2005). Tvorba a tok žlče spočíva v aktívnom transporte iónov vytvárajúcich osmotický gradient, ktorý vznikol pôsobením Na^+/K^+ -ATP-ázy, a

ktorý podporuje tok vody do lumen žľových kanalikulov (Kittnar et al., 2011; Lüllman-Rauch, 2012; Rokyta et al., 2000). Tvorba žľe je aktívny proces, závislý na funkcii transportérov lokalizovaných na bazolaterálnej a apikálnej membráne hepatocytov a cholangiocytov (Žák et al., 2011).

1.3.1 Žľové cesty

Žľ odteká z pečene pravým a ľavým žľovodom (*ductus hepaticus dexter et sinister*). Tie vznikli spojením menších pečňových žľovodov a po opustení pečene sa zbiehajú v spoločný pečňový vývod, na ktorý sa pripojuje vývod žľníku (*ductus cysticus*) a pokračuje do dvanástniku ako žľovod (*ductus choledochus*) ústiaci na papile (*papilla Vateri*) (Merkunová a Orel, 2008). Takto žľ odteká po extrahepatálnych žľových cestách. Intrahepatálne žľové cesty začínajú vo vnútri pečňového lalôčika ako tesný kapilárny priestor bez vlastnej výstelky medzi dvoma trámami hepatocytov. V periférii sa objavuje kubický biliárny epitel, ktorý tvorí Herringov kanálik (*ductulus bilifer*) a ním prechádza žľ z lalôčiku do portobiliárneho priestoru, a napojuje sa na interlobulárny žľovod (*ductus bilifer interlobularis*) (Ehrmann et al., 2014). Ten ďalej pokračuje ako segmentové a lalokové žľovody (*ductus hepaticus dexter et sinister*), a tie opúšťajú pečeň (Čihák, 1988; Ehrmann et al., 2014).

1.3.2 Žľové kyseliny

Žľ je v pečeni vylučovaná podľa závislosti na žľových kyselinách. Žľové kyseliny, resp. ich soli, sú najdôležitejšou zložkou žľe a tvoria približne 65 % jej suchej hmotnosti (Kittnar et al., 2011; Trojan et al., 1999). Zvyšujú osmotický tlak nasledované vodou vyrovnávajúcou osmotický gradient (Trojan et al., 1999). Do kanálikov sú cez membrány transportované aktívne. Látky závislé na sekrécii žľových kyselín sú transportované pomocou špecifického transportéru BSEP („Bile salt export pump“), zatiaľ čo nezávislé na žľových kyselinách sú transportované cez MRP2 („Multidrug resistance associated protein 2“) (Dancygier, 2010).

Základnú štruktúru žlčových kyselín tvorí cyklopentaperhydrofenantrenový skelet. Degradáciou z cholesterolu v pečeni vznikajú kyselina cholová a chenodeoxycholová za účasti pečeňových enzýmov 3 α -, 7 α - a 27 α -hydroxylázy. Kyselina cholová a chenodeoxycholová sú primárne žlčové kyseliny. V pečeni sú konjugované s glycínom alebo taurinom, pričom vznikajú kyseliny glykocholová a taurocholová tvoriace nátriové a káliové soli. Obe kyseliny sú v alkalickej pečeňovej žlči vylučované do tenkého čreva. Sekundárne žlčové kyseliny, kyselina deoxycholová a lithocholová, konvertujú z primárnych pomocou črevných baktérií v tračníku (Kittnar et al., 2011; Trojan et al., 1999). Kyselina lithocholová je toxická, preto je v pečeni konjugovaná so sulfátom za vzniku kyseliny sulfolithocholovej, ktorá je po prenose do žlče vylúčená tráviacím traktom (Ehrmann et al., 2014). Soly žlčových kyselín sú v neutrálnom prostredí čreva dobre rozpustné vo vode (Trojan et al., 1999). Sú amfipatické, čiže obsahujú hydrofilné aj hydrofóbne skupiny. Preto molekuly agregujú do micel (napr. s cholesterolom a fosfolipidmi) (Kittnar et al., 2011; Trojan et al., 1999).

Na žlčových kyselinách sú tiež závislé žlčové farbivá, ktorých najdôležitejším predstaviteľom je bilirubín. Bilirubín je degradovaný z hemoglobínu v slezine a kostnej dreni. V plazme je viazaný na albumín, prenášaný do pečene, konjugovaný na bilirubíndiglukuronid, a ten transportovaný do žlčových kanálikov. Je zodpovedný za žlté sfarbenie žlče. V tračníku je bilirubíndiglukuronid konvertovaný na sterkobilinogen a urobilinogen. Črevná sliznica prepúšťa len konjugované deriváty bilirubínu, preto je väčšina vylúčená stolicou (Kittnar et al., 2011).

Poznáme aj sekréciu nezávislú na žlčových kyselinách. Zahrňuje uvoľňovanie Na⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, H₂O, ktorých hnacou silou je aktívny transport Na⁺, čiastočne stimulovaný sekretínom (Trojan et al., 1999). Prebieha v bunkách žlčových kanálikov (Kittnar et al., 2011).

Význam žlčových kyselín spočíva v emulgovaní a absorpcii potravných tukov a v tuku rozpustných vitamínov, pomáhajú resorpcii kalcia, udržujú tok žlče, majú antibakteriálne pôsobenie, modulujú vonkajšiu sekréciu pankreatu a uvoľňovanie cholecystokinínu. Žlčové kyseliny sú tiež ligandom FXR a membránovo viazaného receptora TGR5 („G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1“). Po aktivácii TGR5 inkretínmi ovplyvňujú energetický metabolizmus a glukózovú homeostázu. Nukleárny receptor FXR heterodimerizuje s retinoidným X-receptorom (RXR) a následne sa viaže

na DNA (Žák et al., 2011). Žlčové soli sú takto schopné regulovať vlastnú enterohepatálnu cirkuláciu (Kullak-Ublick et al., 2000).

1.4 Cholesterol

Cholesterol je súčasťou bunecných membrán, prekursor steroidných hormónov a žlčových kyselín. Najviac cholesterolu sa tvorí v hepatocytoch, kôre nadobličiek, koži a enterocytoch. Každý deň človek vytvorí približne 1 g cholesterolu, potravou získa asi 0,3 g (Holeček, 2006). Časť cholesterolu sa vylučuje v nezmennej forme do žlče (Koolman a Röhm, 2012). Pečeň je jediný orgán schopný odstrániť cholesterol. Kľúčovým enzýmom premeny cholesterolu na žlčové kyseliny je cholesterol-7 α -hydroxyláza (CYP7A1) (Holeček, 2006). Transkripcia CYP7A1 je regulovaná negatívnou spätnou väzbou žlčovými kyselinami (Dawson et al., 2010). Syntéza cholesterolu vychádza z acetyl-CoA. Dôležitým krokom je premena HMG-CoA na mevalonát pomocou HMG-CoA-reduktázy. Inhibícia tohoto enzýmu je mechanizmom účinku statínov. Hladinu cholesterolu v bunke regulujú dva proteíny endoplazmatického retikula – SREBP („Sterol regulatory element binding protein“) a SCAP („SREBP cleavage activating protein“). Systém je aktivovaný odštiepením SREBP, ktorý sa preniesie do jadra bunky, kde reguluje expresiu génov pre tvorbu enzýmov syntézy cholesterolu, počet receptorov pre LDL na membránach, a pravdepodobne aj tvorbu špecifického prenášača nutného na prenos cholesterolu z buniek a jeho väzbu na HDL – ABCA1 („ATP-Binding Casette – A1“) (Holeček, 2006). Sekréciu cholesterolu do žlče umožňujú transportéry ABCG5 alebo ABCG8, „Scavenger receptor B1“ (SR-B1) a „Niemann-Pick C1 L1“ (NPC1L1) (Žák et al., 2011). SR-B1 viaže lipoproteíny HDL, LDL, VLDL, hovádzí sérový albumín aj proteíny konečného produktu glykácie (Trigatti et al., 2003). V žlči sa časť cholesterolu vylučuje vo forme žlčových kyselín a časť ako neesterifikovaný cholesterol. Cholesterol, ktorý je určený na sekreciu do žlče pochádza z HDL-lipoproteínu. Cholesterol pre syntézu žlčových kyselín je transportovaný LDL-lipoproteínom (Ehrmann et al., 2014).

1.5 TGF- β

TGF- β je člen superrodiny rastových faktorov, ktorá pozostáva z viac ako 30 členov (Nassiri et al., 2011). Skladá sa z rodiny cytokínov zohrávajúcich úlohu v raste

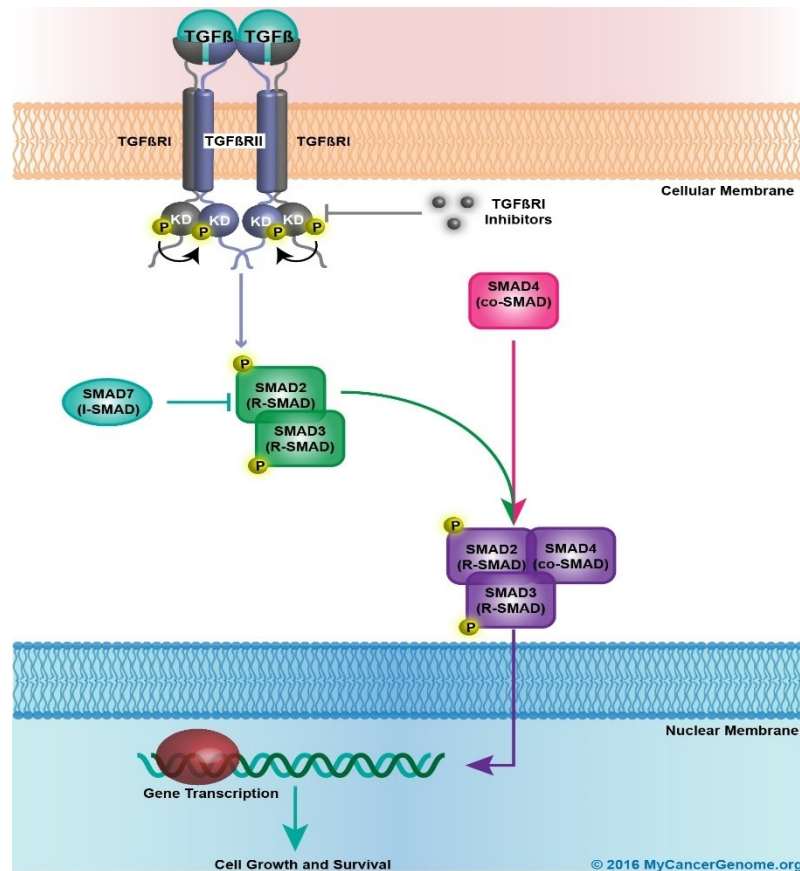
a rozvoji, migrácii a apoptóze, zápale a imunitu organizmu (Clark a Coker, 1998; Nassiri et al., 2011). Úloha TGF- β je teda v homeostatických, patogénnych a karcinogénnych procesoch charakterizovaných zápalom a fibrózou (Clark a Coker, 1998; Javelaud a Mauviel, 2004). Môže pôsobiť aj ako nádorový supresor alebo vykazovať pro-onkogénnu aktivitu (Javelaud a Mauviel, 2004).

Identifikované izoformy TGF- β u cicavcov sú TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF β 3 (Clark a Coker, 1998). Účinky jednotlivých izoformiem závisia od vývoja aktuálnych a fyziologických podmienok a typoch TGF- β (Kaminska et al., 2005). Isoformy fungujú cez receptory typu I, II a III, ktoré zaisťujú komplexné interakcie s ligandom nevyhnutné pre signálnu transdukciu. Receptory typu I a II sú transmembránové serín/treonín-kinázové receptory, receptor typu III moduluje väzbu ligandu na receptory I a II (Lin a Moustakas, 1994). U ľudí sa kóduje sedem TGF- β RI a päť TGF- β RII (Pérez-Gómez et al., 2010). Okrem klasických TGF- β receptorov boli objavené aj betaglykán a endoglin (TGF- β RIII) (Velasco et al., 2008).

TGF- β sa produkuje a vylučuje ako latentný vo forme diméru (Clark a Coker, 1998; Kaminska et al., 2005). Tento latentný stav bráni cytokínu vyvolať špecifickú odpoveď až kým nenastanú určité podmienky aktivácie. Aktivovaný môže byť enzymaticky, kedy sa uvoľní zrelý cytokín. Aktivácia latentného TGF- β je viacstupňový proces. Väzba TGF- β s receptorom typu II (TGF- β RII) umožní zabudovanie receptoru typu I (TGF- β RI). Táto väzba vyvolá správnu konformáciu, fosforyláciu a aktiváciu receptora typu I. Po naviazaní ligandu sa fosforylujú a aktivujú Smad proteíny, ktoré sú základné intracelulárne componenty signalizácie TGF- β . Aktivované sú Smad2 a Smad3 pomocou TGF- β RI a následne spojené so Smad4 (Kaminska et al., 2005). Smad2 a Smad3 sú indukované ALK-5 (Nassiri et al., 2011). Tento komplex sa následne premiestňuje do jadra, kde reguluje génovú transkripciu (Kaminska et al., 2005).

Existuje ešte druhá kaskáda fosforylácie cez Smad1 a Smad5 proteíny, ktoré indukuje ALK-1 (Nassiri et al., 2011). Transkripčná odpoveď závisí od Smad proteínov, ktoré regulujú rôzne signálne dráhy. Smad7 inhibuje asociáciu s TGF- β RI, Smad6 súťaží s Smad1 o väzbu na Smad4 proteín. Negatívne regulujú signálnu dráhu (Kaminska et al., 2005). ALK-5 inhibuje bunkové odpovede na TGF- β , zatiaľ čo ALK-1 ich zvyšuje (Nassiri et al., 2011). Signály TGF- β sú tiež prenášané do jadra cestami nezávislými na Smad proteínoch a zahŕňajú aktiváciu rôznych kináz (napr. renín-angiotenzín-

aldosteron systému, kináza regulovaná mimobunkovým signálom) (Obr. 5) (Kaminska et al., 2005).



Obr. 5. Signálna dráha TGF- β , ktorá funguje cez TGF- β RII a TGF- β RI receptory a Smad proteíny alebo Smad nezávislú dráhu, ovplyvňuje génovú transkripciu („Gene Transcription“) a rast a prežitie bunky („Cell Growth and Survival“). Prevzaté z (Anonymous, 2016).

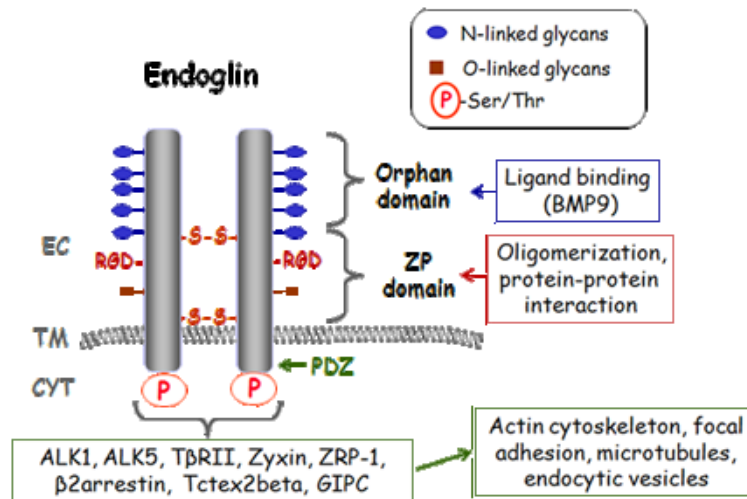
1.6 Endoglin

Endoglin je homodimérny transmembránový glykoproteín exprimovaný v endotelových bunkách. Skladá sa z 633 aminokyselín a je receptorom pre transformujúci rastový faktor (TGF- β) (Nassiri et al., 2011). Prvýkrát bol endoglin zistený monoklonálnou protilátkou 44G4, neskôr bol nájdený v cievach a klasifikovaný ako endotelový marker CD105 (Gregory et al., 2014). Endoglin sa nachádza okrem endotelových buniek aj vo fibroblastoch, makrofágoch, perivaskulárnych stromálnych

bunkách, bunkách hladkých svalov, mezenchymálnych kmeňových bunkách a placentе (Gregory et al., 2014; Kapur et al., 2013; Rius et al. 1998). Hraje úlohu vo vaskulárnej homeostáze, angiogenéze a je používaný ako marker angiogenézy (Gregory et al., 2014).

Endoglin obsahuje tri časti a to, veľkú extracelulárnu doménu, hydrofóbnu transmembránovú doménu a krátku intracelulárnu doménu (Nassiri et al., 2011). Extracelulárna doména obsahuje 561 zvyškov s niekoľkými O- a N-glykánmi a pozostáva z domény *zona pellucida* (ZP) a sirotčej domény („orphan domain“) (Alt et al., 2012; Pérez-Gómez et al., 2010). Sirotčia doména sa nachádza najďalej na N-koncovej extracelulárnej oblasti a toto pomenovanie dostala, pretože nevykazuje žiadnu homológiu s iným proteínom, resp. doménou. Sirotčia doména zodpovedá za rozpoznanie a väzbu ligandu (napr. BMP9). Endoglin patrí do rodiny extracelulárnych proteínov obsahujúcich ZP, ktorá pozostáva z 260 aminokyselín s ôsmimi konzervovanými cysteínovými zvyškami. Tieto cysteínové zvyšky sa nachádzajú pri transmembránovej oblasti (Alt et al., 2012). Endoglin, tak ako aj ostatní členovia tejto rodiny, je membránový proteín s hydrofóbnou časťou na C-konci, vylúčený na vytvorenie rozpustnej formy, silne glykozylovaný a vysoko exprimovaný v zodpovedajúcich tkanivách (Meurer et al., 2014). *Zona pellucida* obsahuje aj tripeptid arginín-glycín-kyselina asparágová (RGD), ktorý bol detekovaný v ľudskom proteíne, v myšacom či potkaňom proteíne chýba. RGD tak predstavuje väzbové miesta pre integríny u ľudí. Doména ZP je rozdelená na subdomény koncov ZP-N a ZP-C (Fonsatti et al., 2010; Meurer et al., 2014). Tri konzervované endoglinové cysteíny v ZP-N a sirotčej doméne sú vysoko náchylné na mutácie. Cysteíny sa v tejto extracelulárnej oblasti tiež podieľajú na disulfidovej väzbe a na sprostredkovaní dimerizácie receptorov. Sirotčia doména, ZP-N a ZP-C sú v trojrozmernom usporiadaní (Meurer et al., 2014).

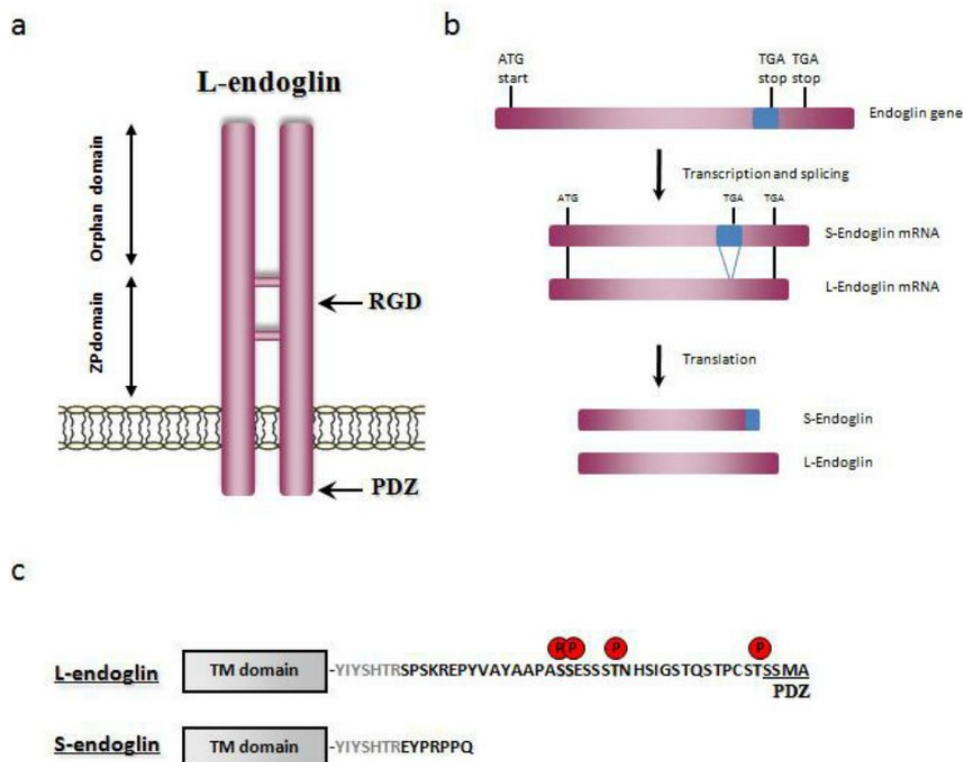
Krátka intracelulárna doména obsahuje mnoho serínových a treonínových zvyškov, z ktorých niektoré môžu byť fosforylované TGF- β kinázami (Nassiri et al., 2011; Pérez-Gómez et al., 2010). Nemá žiadnu enzymatickú funkciu, no obsahuje na C-konci PZD-väzbový motív (Ser-Ser-Met-Ala), ktorý moduluje fosforyláciu týchto zvyškov. Endoglin poznáme v dvoch izoformách (L-/E-endoglin), a práve v intracelulárnej doméne sa líšia (Obr. 6) (Pérez-Gómez et al., 2010).



Obr. 6. Štruktúra endoglínu pozostávajúca zo *zona pellucida* domény („ZP domain“) s tripeptidom RGD („Arginylglycylaspartic acid“) a sirotčej domény („Orphan domain“) patriace do EC („Extracellular“) domény, TM („Transmembrane“) domény a CYT („Cytoplasmic“) domény. Endoglin je fosforylovaný („P“) koncovou časťou PDZ („Post-synaptic density 95 / Drosophila disk large / Zonula occludens-1“) motívom (Ser-Ser-Met-Ala). Prevzaté z (Lopez-Novoa a Bernabeu, 2012).

L-endoglin má doménu zloženú z 47 zvyškov, S-endoglin obsahuje len 14 zvyškov. Prvých sedem zvyškov majú rovnakých, no S-endoglin neobsahuje PZD-väzbový motív. L-endoglin je prevládajúca izoforma v tkanivách, aj keď expresia S-endoglínu je významná napr. v pľúcach a pečeni (Obr. 7) (Pérez-Gómez et al., 2010).

Obe izoformy endoglínu sa líšia aj vo funkcii. L-endoglin má proangiogénne účinky, zatiaľ čo S-endoglin má antiangiogénne účinky a znižuje expresiu eNOS (endotelovej NO-syntázy) (Pfaffl, 2001).



Obr. 7. Izoformy L- a S-endoglínu s podrobným zobrazením dĺžky transmembránovej domény („TM domain“). L-endoglín sa skladá zo sirotčej domény („Orphan domain“) a domény *zona pellucida* („ZP domain“) s tripeptidom RGD („Arginylglycylaspartic acid“). Endoglín sa viaže pomocou PDZ („Post-synaptic density 95 / Drosophila disk large / Zonula occludens-1“) motívu, ktorý sa skladá z Ser-Ser-Met-Ala. Prevzaté a upravené z (López-Novoa a Bernabeu, 2010).

TGF- β receptorový komplex obsahuje pomocné receptory typu III (TGF- β RIII) endoglín a betaglykán. Viažu rôznych členov TGF- β rodiny a sú homológne v transmembránových a cytoplazmatických doménach. Endoglín viaže TGF- β 1, TGF- β 3, ale aj aktivín-A, BMP2, BMP7 na TGF- β RI a TGF- β RII. TGF- β 1 a TGF- β 3 sa viažu, no TGF- β 2 nie (Pérez-Gómez et al., 2010). Signalizácia TGF- β funguje cez TGF- β RII a TGF- β RI serín/treonínkinázové receptory a Smad proteíny alebo Smad nezávislú dráhu (Obr. 5). Pomocou receptora TGF- β RII a ALK5 indukuje signál fosforyláciu Smad2 a Smad3 vo väčšine buniek. Aktivácia pomocou receptora TGF- β RI indukuje fosforyláciu Smad2/3 sprostredkovanú ALK5 a taktiež fosforyláciu Smad1/5 indukovanú ALK1 v endotelových bunkách. Aktivácia ALK1 stimuluje proliferáciu a migráciu

buniek, ALK5 má presne opačný účinok. Endogln sa viaže len na ligand spojený s receptorom TGF- β RII a okrem toho sa môže viazať na receptory typu I a II aj bez ligandu (Lebrin et al., 2004; López-Novoa a Bernabeu, 2010).

Aktivované ALK5 a TGF- β RII sa viažu s extracelulárnymi a intracelulárnymi doménami endoglnu, ale nefosforylovaný ALK5 interaguje len s endoglnovou intracelulárnou doménou. Po väzbe ALK5 a TGF- β RII fosforylujú serín/treonínové zvyšky intracelulárnej domény endoglnu a následne sa ALK5 disociuje. TGF- β RII pritom ostáva na receptorovom komplexe (Pérez-Gómez et al., 2010).

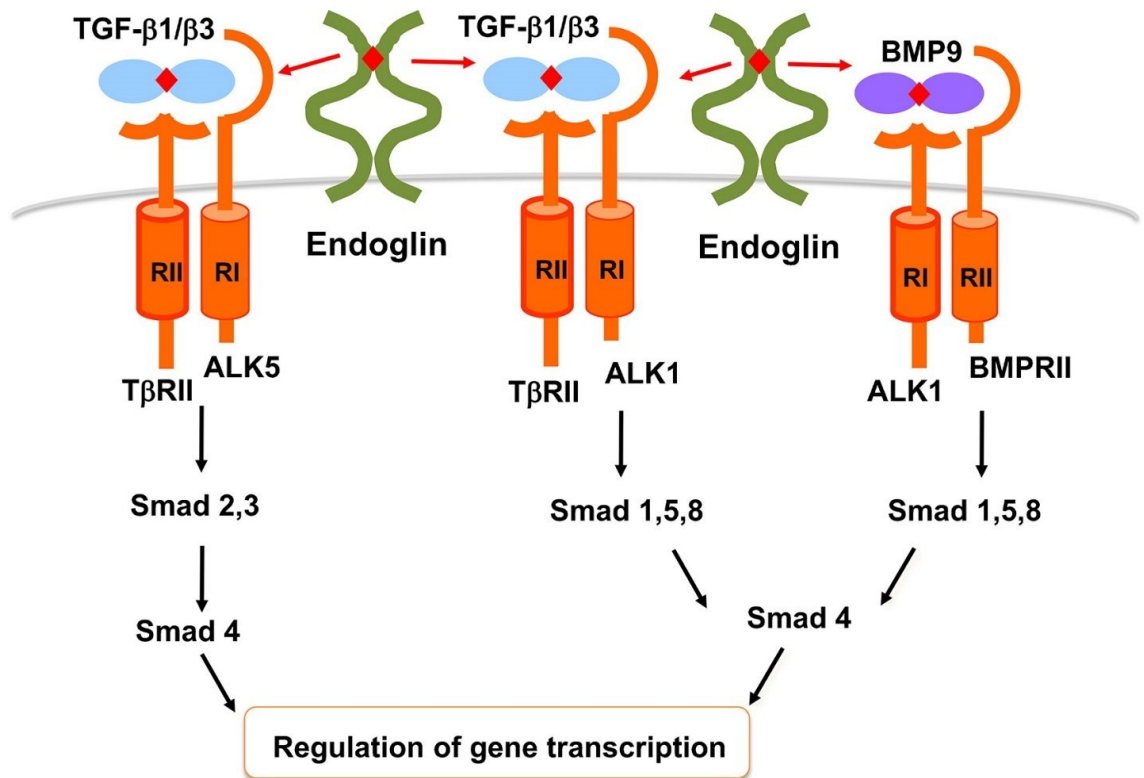
Endogln je aj priamy substrát ALK1 endotelových buniek špecifický pre TGF- β RI a reguluje ALK1 dependentnú rast a adhéziu buniek (Pérez-Gómez et al., 2010). Signál spúšťaný cestou ALK1 s endoglnom je závislý aj od BMP9 a sprostredkováva cestou Smad 1/5/8 expresiu mnohých génov (napr. gén pre inhibitor diferenciácie 1, negatívny transkripčný regulátor). ALK1 a endogln sú tiež schopné inhibovať odpovede vyvolané TGF- β 1 a Smad3 (Alt et al., 2012). Endogln je potrebný pri signalizácii dráhy TGF- β /ALK1, ktorá nepriamo inhibuje dráhu TGF- β /ALK5. Endotelové bunky nerastú ak im chýba endogln. Je to spôsobené znížením signalizácie TGF- β /ALK1 a zvýšením TGF- β /ALK5. Tieto bunky sa potom prispôbujú nerovnováhe spôsobenej chýbajúcim endoglnom (Obr. 8) (Lebrin et al., 2004).

Endogln pomocou signalizácie ALK5 reguluje permeabilitu buniek a podporuje ich rast v angiogenéze. Výrazne exprimovaný je endogln behom angiogenézy v krvných cievach počas hojenia. Štúdie ukázali, že prerušenie TGF- β 1/endogln vedie k defektom diferenciácie buniek, kardiovaskulárnemu zlyhaniu až embryonálnej letalite. Myši nevytvárajú krvné cievy v žltkovom vaku a zomierajú. Endogln teda hraje dôležitú úlohu v angiogenéze a cievnej náprave (Valluru et al., 2011). Mutácia v endogline a ALK1, receptoru TGF- β RI, je schopná vyvolať dedičnú hemoragickú telangiectáziu typu 1 (HHT-1) a angiogézu (Lebrin et al., 2004; Valluru et al., 2011). HHT-1 je vaskulárna porucha doprevádzaná epistaxiou, gastrointestinálnym krvácaním, telangiectázami a arteriovenóznymi malformáciami v mozgu, pľúcach a pečeni (Romero et al., 2010).

V PC3-M, metastatických rakovinových bunkách prostaty („metastatic prostate cancer cells“), je endogln down-regulovaný a po obnovení expresie znižuje migráciu

a tumorigenicitu nádorových buniek u myši. Mechanizmus tejto regulácie nie je zatiaľ známy (Romero et al., 2010).

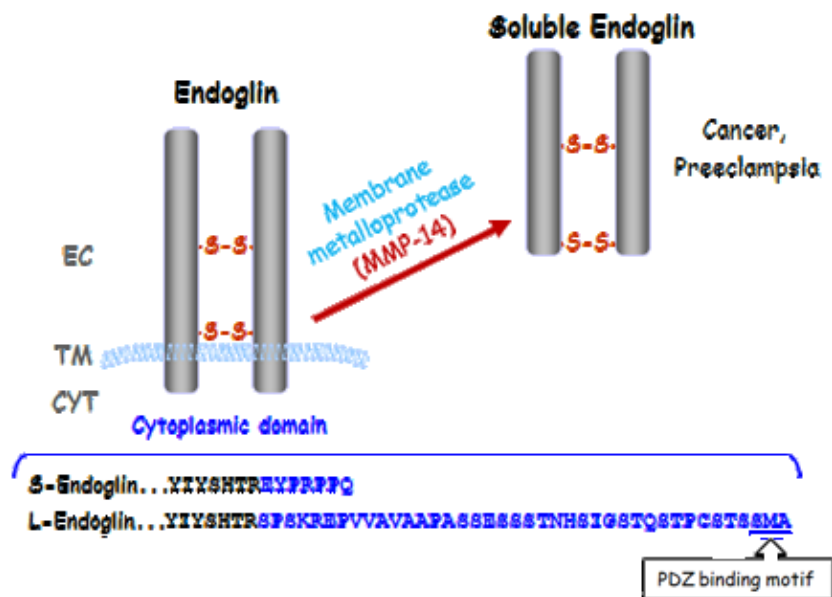
Endoglin je v hepatických stelátových bunkách (HSC, „hepatic stellate cells“) up-regulovaný počas bunkovej aktivácie. Nadmerná expresia aktivuje ALK1 signalizáciu v HSC, proliferáciu a migráciu (Meurer et al., 2014).



Obr. 8. Signalizácia TGF-β kaskády a BMP („Bone morphogenetic protein“) s endoglinom. Prevzaté z (Gregory et al., 2014).

1.7 Solubilný endoglin

Solubilný endoglin (sEng) je endoglin odštiepený z povrchu buniek pomocou MMP-14 (Matrixová membránová metaloproteináza 14) za uvoľnenia rozpustnej extracelulárnej domény (Obr. 9) (Meurer et al., 2014). sEng je označovaný tiež ako cirkulujúca forma endoglinu („circulating form of endoglin“) a môže byť uvoľnený zápalom, tumor nekrotizujúcim faktorom α (TNF- α), poškodením endotelu alebo protilátkami proti endoglinu (Gallardo-Vara et al., 2018).



Obr. 9. Endoglin a jeho rozpustná forma odštiepená MMP-14 („Matrix membrane metaloproteinase 14“). Prevzaté z (Lopez-Novoa a Bernabeu, 2012).

Solubilný endoglin (sEng) je antiangiogénny proteín, ktorý sa účastní na viacerých mechanizmoch v organizme ako napr. dysfunkcia endotelu, zvýšenie krvného tlaku, proteinúria, ateroskleróza (Levine et al., 2006; Nachtigal et al., 2012). Niektoré štúdie zistili, že antiangiogénnym pôsobením antagonizuje aktivitu TGF- β 1 a TGF- β 3 a znižuje signalizáciu endotelového oxidu dusnatého (Meurer et al., 2014; Masuyama et al., 2007). Iná štúdia zistila, že hypoxia indukuje uvoľňovanie sEng oxidačným stresom a tvorbou oxysterolov, čím dochádza k zvýšeniu endoglinu a MMP-14 (Perez-Roque a Lopez-Novoa, 2014). Metaloproteináza následne odštiepi sEng väzbou glycín-leucín v juxtamembránovej polohe 586 endoglinu a uvoľnením extracelulárnej domény do plazmy (Perez-Roque a Lopez-Novoa, 2014; Oujó et al., 2013). V plazme môže sEng viazať niekoľko ligandov ako TGF- β 1 a BMP cez sirotčiu doménu, a tým je dostupnosť pre interakcie cytokínu znížená, pretože sEng nemôže priamo interagovať s extracelulárnou oblasťou TGF- β receptorov typu I a II. Táto nerovnováha inhibuje aktiváciu endotelovej NO-syntázy (eNOS), ktorá znižuje produkciu oxidu dusnatého (NO) a bráni vazodilatácii a angiogenéze. BMP9 a BMP10 sú hlavné ligandy v angiogénnej dráhe ALK1, ktoré sa viažu vysokou afinitou k sEng.

Preto by sa antiangiogénny účinok mohol spájať s inhibíciou signalizácie cez BMP9 a BMP10 (Oujo et al., 2013).

Vysoká plazmatická hladina sEng bola zistená u endoteliálnej dysfunkcii a taktiež k tejto dysfunkcii prispieva. U tehotných žien s preeklampsiou prejavujúcou sa hypertenziou a proteínúriou spojenou s endoteliálnou dysfunkciou sú významne zvýšené hladiny sEng. Ak sa tento stav nelieči, môže viesť k úmrtiu plodu i matky. sEng má tiež prozápalovú aktivitu, ktorá je sprostredkovaná nukleárnym faktorom kappa B (NFκB) a interleukínom 6 (IL-6). Cez NFκB a IL-6 môže modulovať adhéziu a transmigráciu leukocytov (Gallardo-Vara et al., 2018).

Endoglin hraje rolu v angiogenéze aj fibrogenéze. Hraje tiež úlohu v signalizačnej dráhe TGF-β a jeho úloha sa zvyšuje v hypoxických podmienkach, ako napr. v nádoroch. V rakovinových bunkách je dôležitý pre rast, prežitie a metastázovanie buniek. Štúdie na nádorových bunkách naznačujú, že vylučovanie endoglinu môže viesť k zvýšeným hladinám sEng (Gallardo-Vara et al., 2018; Kwon et al., 2017; Pérez-Gómez et al., 2010). Hepatocelulárny karcinóm je typický hypervaskulárny nádor pečene, väčšinou spojený s cirhózou, kde je exprimovaný endoglin. Väčšina zhubných nádorov si vyvinie spôsob dodania živín a kyslíka rastom krvných ciev. Angiogenéza je proces pretínajúci dráhy vaskulárneho endotelového rastového faktoru (VEGF, „Vascular endothelial growth factor“), TGF-β a endoglinu, angiopoetínov a integrínov. Takto ovplyvňuje endoglin angiogenézu a je marker pri rakovine prsníka, nemalobunkovom karcinóme pľúc, zhubnom melanóme, kolorektálnom karcinóme ale aj hepatocelulárnom karcinóme. V patogenéze fibrózy pečene je TGF-β najsilnejší fibrogénny cytokín, ktorý vyvoláva fibrózu viacerými mechanizmami napr. priamou aktiváciou hepatických stelátových buniek (HSC) (Kwon et al., 2017).

sEng bol nájdený u pacientov s rôznymi nádorovými ochoreniami, u žien s preeklampsiou, u pacientov s ochorením pečene súvisiacím s cystickou fibrózou CFLD („Cystic fibrosis associated liver disease“), HCV („Hepatitis C Virus“), hepatocelulárnym karcinómom v kombinácii s cirhózou a hypercholesterolémiou (Kwon et al., 2017; Nachtigal et al., 2012; Meurer et al., 2014; Pérez-Gómez et al., 2010).

Úloha sEng je však stále kontroverzná v signalizácii TGF-β1 a momentálne nie sú dostupné informácie zamerané na funkčné aspekty solubilného endoglinu v pečeni

(Meurer et al., 2014). Molekulárne mechanizmy pôsobenia sEng však stále nie sú dostatočne vysvetlené a pochopenie týchto mechanizmov by mohlo priniesť nové terapeutické postupy pre ochorenia pečene (Gallardo-Vara et al., 2018; Kwon et al., 2017).

2. Cieľ diplomovej práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť pôsobenie solubilného endoglinu (sEng) na tok žlče, koncentráciu cholesterolu v plazme a pečeni a expresiu vybraných transportných proteínov zodpovedných za metabolizmus a transport cholesterolu a žlčových kyselín v pečeni u myších samíc s vysokou plazmatickou koncentráciou sEng.

3. Experimentálna časť

3.1 Metodika

3.1.1 Chemikálie

Spotrebný materiál a chemikálie použité v diplomovej práci boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a Bio-Rad Laboratories (Herkules, CA, USA).

3.1.2 Pokusné zvieratá

Pri experimente boli geneticky modifikované myši s nadmernou expresiou ľudského sEng na CBAxC57BL/6J podklade generované na Oddelení geneticky modifikovaných organizmov (Univerzita v Salamnke, Španielsko). V experimente boli použité šesťmesačné sEng samice s vysokou hladinou sEng v plazme (skupina sEng; plazmatická koncentrácia ≥ 1500 ng/ml) a kontrolné myši s nízkou hladinou sEng v plazme (kontrola; plazmatická koncentrácia sEng ≤ 100 ng/ml) ($n = 8$, v každej skupine). Laboratórne myši boli kŕmené tri mesiace štandardnou laboratórnou diétou a chované vo viváriu Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové za štandardných podmienok (striedavý režim 12 hodín svetlo, 12 hodín tma, teplota ovzdušia 22 ± 2 °C, dostatočný príjem potravy aj vody). Všetky experimenty boli schválené etickou komisiou Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové, a následne uskutočnené v súlade s pokynmi uvedenými vo vyhláske č. 207/2004 Sb. o ochrane, chove a využití pokusných zvierat.

3.1.3 *In vivo* štúdia

V priebehu štúdie boli zvieratám pod celkovou anestéziou (pentobarbital, 50 mg/kg, i.p.) zbierané vzorky žlče po dobu 45 min. Následne boli myši usmrtené exsanguináciou z dolnej dutej žily. Centrifugáciou vzoriek krvi pri 3000 g po dobu 5 min boli získané vzorky plazmy, ktoré boli ihneď zmrazené pri teplote -80 °C. Pečeň bola odoberaná, zchladená tekutým dusíkom a uchovávaná pri teplote -80 °C až do doby analýzy.

3.1.4 Biochemická analýza

Koncentrácia celkového cholesterolu v plazme a koncentrácia cholesterolu v pečeni boli namerané komerčne dostupnými kitmi podľa inštrukcií výrobcu (Erba Lachema, Brno, Česká Republika). Údaje boli získané z laboratória MUDr. Radomíra Hyšplera, Ph.D. z Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové.

3.1.5 qRT-PCR

Pomocou qRT-PCR na systéme Applied Biosystem 7500 HT Fast Real-Time PCR systému (ThermoFisher Scientific, Praha, ČR) bola stanovená expresia vybraných génov zapojených do transportu a metabolizmu cholesterolu a žlčových kyselín.

mRNA bola izolovaná z myšacích pečeni pomocou homogenizácie tkaniva v TRI-reagente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Koncentrácia mRNA bola stanovená meraním absorbancie pri 260 nm na spektrofotometri NanoDrop ND-1000 (BioTech a.s., ČR). Meranie pomeru absorbancie pri 260 nm a 280 nm umožnilo stanovenie čistoty RNA. RNA bola prepísaná do cDNA použitím „High Capacity cDNA Reverse Transcription KITu“ (ThermoFisher Scientific, Praha, ČR). Bolo získaných 1000 ng cDNA, po nariadení v 80 µl aqua pro injectione, čo odpovedá koncentrácii cDNA 12,5 ng/µl. Vzorky boli amplifikované v triplikátoroch pomocou „TaqMan® Fast Univerzal PCR Master Mixu“ a „Taq-Man® Gene Expression Assay mixu“ (ThermoFisher Scientific, Praha, ČR) pre jednotlivé gény. Použitý „fast“ mód bol: 95 °C po dobu 20 s; 40 cyklov: 95 °C po dobu 3 s, 60 °C po dobu 30 s. Pomer relatívnej expresie bol vypočítaný podľa vzorca:

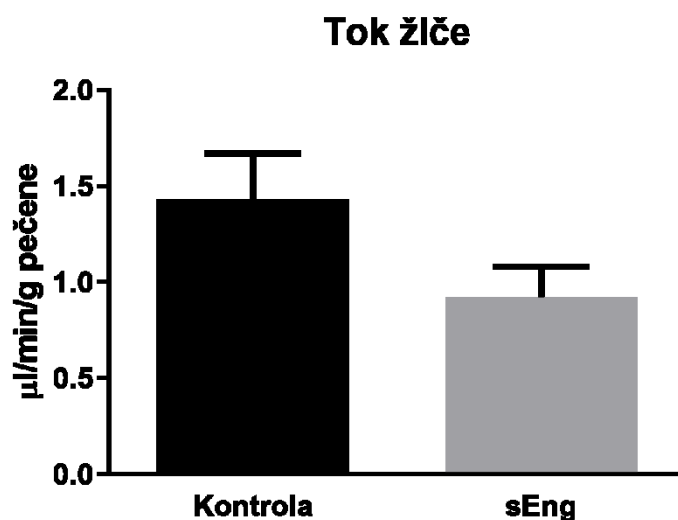
$$R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_{\text{target}}(\text{kontrola-vzorek})}}{E_{\text{housekeeping}}^{\Delta C_{\text{housekeeping}}(\text{kontrola-vzorek})}}$$

kde, E_{target} a $E_{\text{housekeeping}}$ sú hodnoty cieľového génu a referenčného génu určené zo sklonu kalibračnej krivky, $\Delta C_{t_{\text{target}}}$ a $\Delta C_{t_{\text{housekeeping}}}$ sú hodnoty rozdielu kontrolných a sEng vzoriek génov (Pfaffl, 2001).

3.2 Výsledky

3.2.1 *In vivo* štúdia

V experimentálnej skupine zvierat nebola zaznamenaná štatisticky významná zmena toku žlče v porovnaní s kontrolnou skupinou.

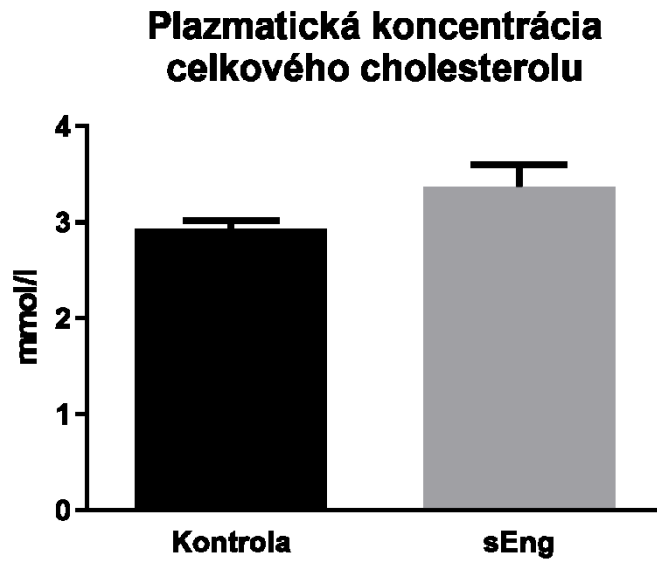


Obr. 10. Tok žlče v kontrolnej a experimentálnej skupine zvierat s vysokou hladinou sEng (sEng). Hodnoty vyjadrené ako priemery \pm SEM ($n = 8$, v každej skupine).

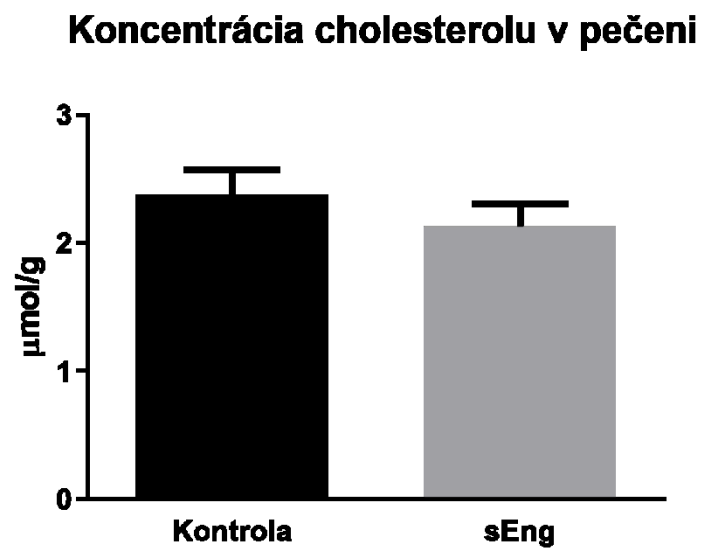
3.2.2 Biochemická analýza

Hodnoty plazmatickej koncentrácie cholesterolu (Obr. 11) a koncentrácie cholesterolu v pečeni (Obr. 12) u kontrolných zvierat a zvierat s vysokou hladinou solubilného endoglínu (sEng) neboli signifikantne zmenené.

V obrázkoch sú hodnoty vyjadrené ako priemery \pm SEM ($n = 8$, v každej skupine).



Obr. 11. Plazmatická koncentrácia celkového cholesterolu.



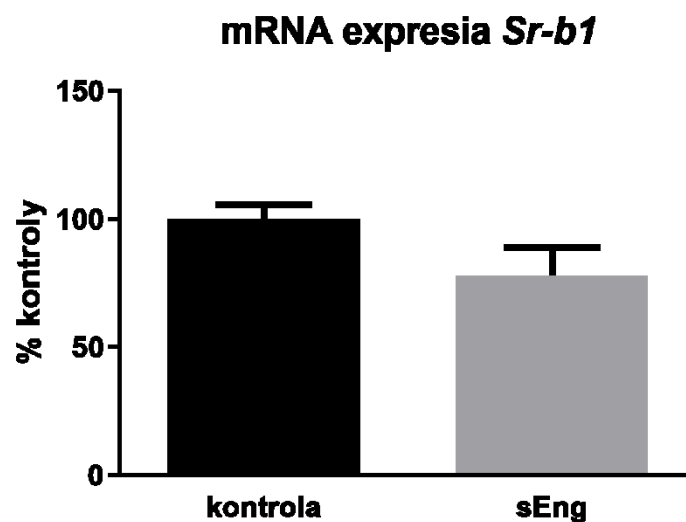
Obr. 12. Koncentrácia celkového cholesterolu v pečeni.

3.2.3 qRT-PCR

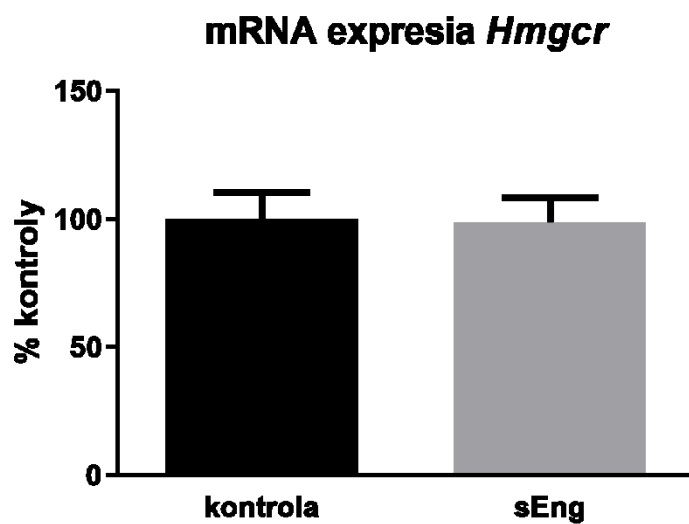
Pre objasnenie vplyvu sEng na metabolizmus a transport cholesterolu a žlčových kyselín boli analyzované hladiny mRNA expresie *Sr-b1*, *Hmgcr*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Acat2*, *Abcb4*, *Cyp7a1*, *Abcb11*, *Abcc2* génov.

V skupine myši s vysokou plazmatickou koncentráciou sEng nedošlo k signifikantným zmenám mRNA expresie u *Sr-b1*, *Hmgcr*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Acat2*, *Abcb4*, *Abcb11*, *Abcc2*. Zaznamenané zmeny boli u *Cyp7a1*, kde došlo k signifikantnému zníženiu mRNA expresie.

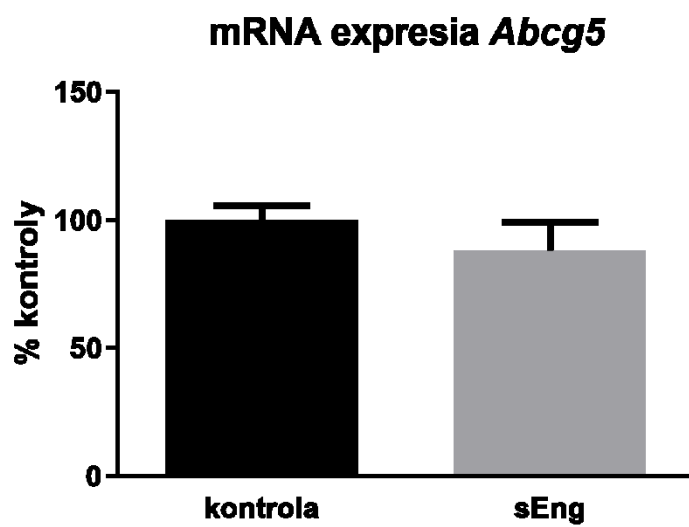
Hodnoty sú vyjadrené ako priemery \pm S.E.M. (n = 8, v každej skupine). mRNA expresia v kontrolnej skupine zvierat je 100 %. Myši s vysokou hladinou sEng sú označené ako sEng. Signifikantné zmeny oproti kontrolnej skupine: ** p < 0.01.



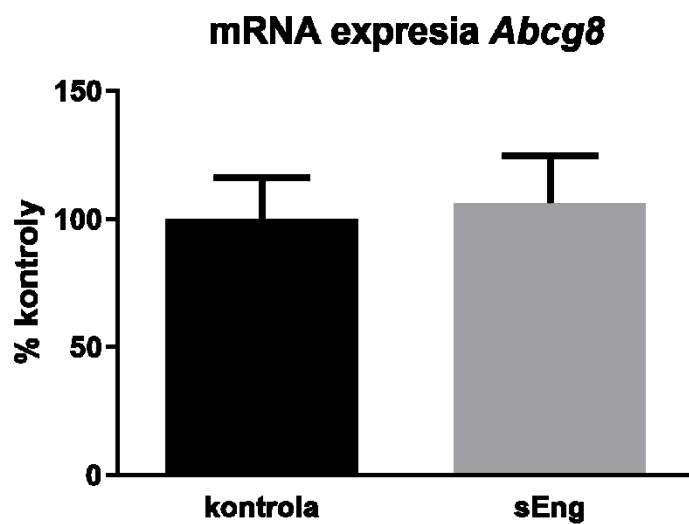
Obr. 13. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Sr-b1*.



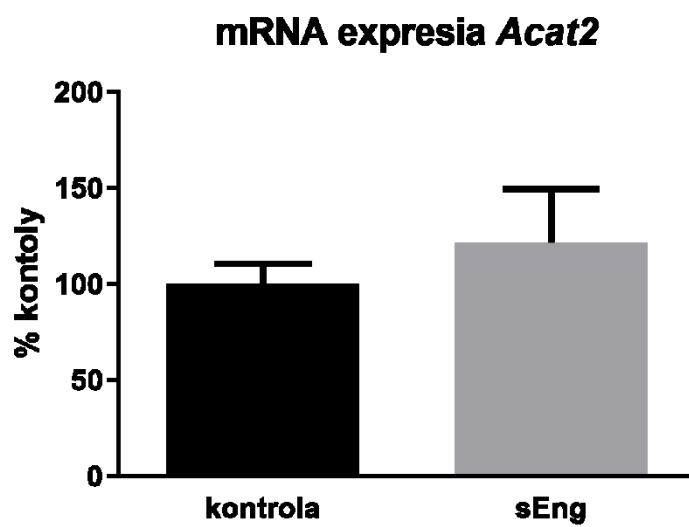
Obr. 14. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Hmgcr*.



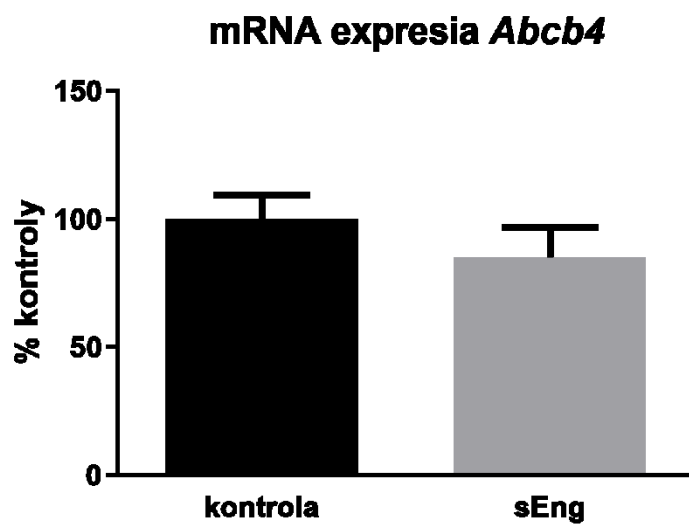
Obr. 15. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Abcg5*.



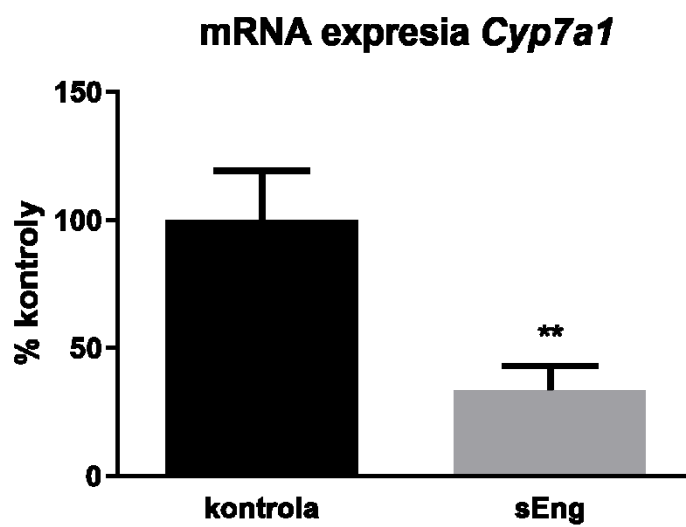
Obr. 16. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Abcg8*.



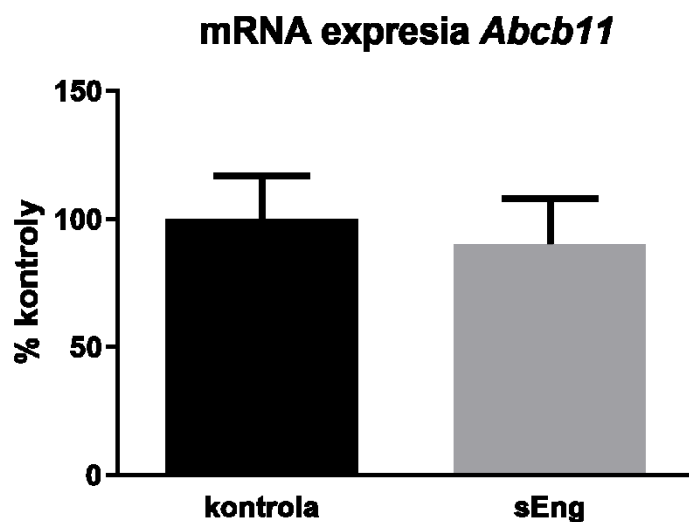
Obr. 17. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Acat2*.



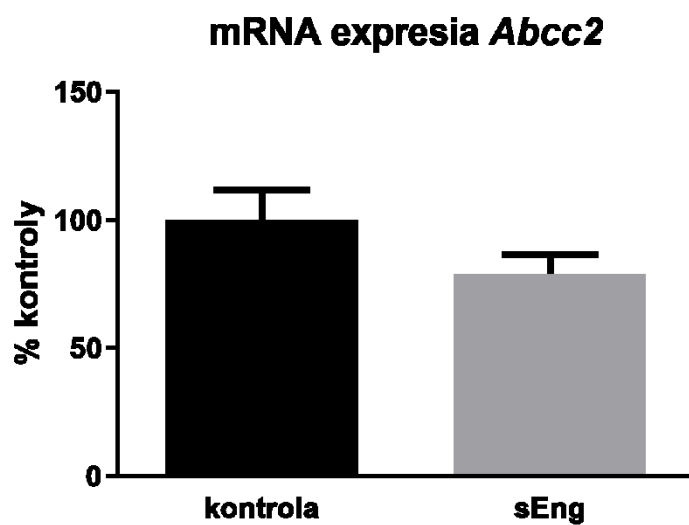
Obr. 18. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Abcb4*.



Obr. 19. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Cyp7a1*.



Obr. 20. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Abcb11*.



Obr. 21. Grafické znázornenie výsledku qRT-PCR analýzy expresie *Abcc2*.

4. Diskusia

CD 150, TGF- β receptor III či endoglin (Eng), je homodimérny transportný glykoproteín exprimovaný v endotelových bunkách, monocytoch, makrofágoch, fibroblastoch, HSC bunkách a bunkách hladkého svalstva ciev. Endoglin sa skladá z L- a S- izoformy. L-izoforma má proangiogénne účinky, S-izoforma antiangiogénne účinky. Endoglin spolu s TGF- β RI a TGF- β RII viaže TGF- β 1 a TGF- β 3, ktoré tvoria receptorový komplex (Alt et al., 2012; Kasprzak a Adamek, 2018; Nachtigal et al., 2012; Letamendia et al., 1998; Rossi et al., 2016). TGF- β RII zprostredkováva väzbu TGF- β 1 a ten fosforyluje receptor typu I a signál sa šíri do dvoch rôznych podrodín Smad proteínov. ALK5 fosforyluje Smad2/Smad3, pričom ALK1 je zameraná na fosforyláciu Smad1/Smad5. Interakcia s týmito receptormi zahŕňa špecifické N- a C-terminálne domény endoglinu a vedie k fosforylácii cytoplazmatickej domény endoglinu. Fosforylácia cytoplazmatickej domény endoglinu s ALK1 a ALK5 ovplyvňuje aj iné signálne interakcie. Serínové zvyšky v endogline fosforyluje TGF- β receptor II, pričom ALK5 a ALK1 serínové a treonínové zvyšky. Aktivácia Smad proteínov vedie na väzbu k spoločnému Smad4, dochádza k translokácii do jadra bunky a reguluje transkripciu cieľových génov (Alt et al., 2012; Meurer et al., 2011).

Eng bol pred 25 rokmi nový marker aktivity endoteliálnych buniek. Postupne sa zistilo, že mutácia génu v endogline spôsobuje hemoragickú hereditárnu teleangiektáziu typu 1 (HHT1), ktorá sa prejavuje ako epistaxia, vaskulárna dysplázia a arteriovenózne malformácie v mozgu, pľúcach, pečeni a gastrointestinálnom trakte. Pomocou MMP-14 je z endoglinu oddelený solubilný endoglin (sEng). sEng ovplyvňuje patogenézu preeklampsie, ktorá je spojená s hypertenziou, proteinúriou, hemolýzou, abnormalitami pečene, trombocytopéniou, predčasným pôrodom, no aj záchvatmi a nevysvetliteľnou smrťou plodu (Alt et al., 2012; Sabaá et al., 2007). Jeho zvýšené hladiny boli pozorované aj u pacientov s aterosklerózou, diabetom mellitom typu 2, karcinómom pľúc, rakovinou prsníkov a prostaty, biliárnou atréziou, ochorením spojeným s cystickou fibrózou, aktívnou familiárnou hypercholesterolémiou a mnohými ďalšími ochoreniami (Alt et al., 2012; Blaha et al., 2008). Vzhľadom k tomu, že sa sEng podieľa v rade procesov a ochorení, ktoré ovplyvňujú aj funkciu pečene, je možné predpokladať jeho vplyv na transport cholesterolu a žlčových kyselín v pečeni. Preto bolo predmetom tejto

diplomovej práce zistiť ako pôsobí sEng na tok žlče, koncentráciu cholesterolu v plazme a pečeni a transport cholesterolu a žlčových kyselín.

V experimente boli použité šesťmesačné transgénne samice myši s vysokou hladinou ľudského sEng, kŕmené tri mesiace štandardnou diétou.

Z výsledkov tejto diplomovej práce vyplýva, že sEng nevedol k zmene koncentrácie cholesterolu v plazme ani v pečeni ani ku zmene toku žlče. qRT-PCR analýza neodhalila žiadne zmeny v mRNA expresii transportných proteínov zodpovedných za transport cholesterolu - *Sr-b1*, *Hmgcr*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Acat2*, *Abcb4*, ani žlčových kyselín - *Abcb11*, *Abcc2* v pečeni. Bola pozorovaná znížená mRNA expresia *Cyp7a1*, génu kódujúceho enzým cholesterol 7 α -hydroxylázu. Jedná sa o špecifický hepatálny člen rodiny CYP450, ktorý iniciuje hlavnú cestu katabolizmu cholesterolu a syntézu žlčových kyselín. Tento systém je primárnou cestou premeny cholesterolu (Pullinger et al., 2002).

Žlčové kyseliny sú syntetizované dvoma cestami. Primárnou cestou, neutrálnou, cholesterol 7 α -hydroxyláza (CYP7A1) priamo konvertuje cholesterol na 7-hydroxycholesterol. CYP7A1 je teda primárna cesta premeny, dôležitý regulátor homeostázy cholesterolu a žlčových kyselín (Gälman et al., 2003).

V tomto experimente neboli pozorované žiadne funkčné zmeny pečene a preto je možné predpokladať, že sEng nebude ovplyvňovať metabolizmus cholesterolu a žlčových kyselín.

5. Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť vplyv solubilného endoglinu (sEng) na transport cholesterolu a žlčových kyselín v pečeni u myších samíc s vysokou hladinou sEng.

Bola uskutočnená *in vivo* štúdia pre analýzu toku žlče. Koncentrácia celkového cholesterolu v plazme a pečeni bola meraná v laboratóriu MUDr. Radomíra Hyšplera, Ph.D. z Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové. Metódou qRT-PCR boli analyzované hladiny mRNA expresie vybraných génov transportných proteínov, ktoré sú zodpovedné za transport a/alebo metabolizmus cholesterolu a žlčových kyselín v pečeni. V experimente boli použité šesťmesačné transgénne samice myši s vysokou hladinou ľudského sEng, kŕmené tri mesiace štandardnou diétou.

Úloha sEng stále nie je dostatočne známa. sEng je uvoľnený zápalom alebo poškodením endotelu a jeho zvýšená hladina bola zistená v rade ochorení. Vysoké plazmatické hladiny sEng sú preukázané u pacientiek s preeklampsiou, pacientov s aterosklerózou, diabetom mellitom typu 2, karcinómom pľúc, biliárnou atréziou a rakovinou prsníkov a prostaty. Jeho zvýšené hladiny boli zistené aj u ochorení spojených s cystickou fibrózou, aktívnou familiárnou hypercholesterolémiou a mnohými ďalšími ochoreniami. V súčasnosti nie sú dostupné dostačujúce informácie zamerané na funkčné aspekty sEng v pečeni. Molekulárne mechanizmy pôsobenia sEng nie sú dostatočne vysvetlené a pochopenie týchto mechanizmov môže priniesť nové terapeutické postupy pre ochorenia pečene. Vzhľadom k tomu, že nie sú objasnené dáta s vplyvom sEng na transport cholesterolu a žlčových kyselín, bolo zámerom tejto diplomovej práce popísať tento mechanizmus.

sEng nevedol ku zmene toku žlče ani ku zmene koncentrácie cholesterolu v plazme a v pečeni. qRT-PCR analýza neodhalila žiadne zmeny v mRNA expresii transportných proteínov zodpovedných za transport cholesterolu v pečeni - *Sr-b1*, *Hmgcr*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Acat2*, *Abcb4*. Ani mRNA expresia transportných proteínov zodpovedných za transport žlčových kyselín, *Abcb11* a *Abcc2*, nezaznamenala žiadne zmeny. Bola pozorovaná znížená mRNA expresia *Cyp7a1*, tzv. „rate limiting“ enzýmu pre syntézu žlčových kyselín *de novo* z cholesterolu. I napriek tejto zmene, z funkčného

hládiska sEng neovplyvnil tok žlče. Z výsledkov tejto štúdie vyplýva, že sEng nevedie k žiadnym funkčným zmenám na úrovni metabolizmu a transportu cholesterolu a žlčových kyselín v pečeni. Súčasne neboli pozorované ani významné zmeny v mRNA expresii hlavných transportných proteínov zodpovedných za transport cholesterolu a žlčových kyselín v pečeni.

Z výsledkov tejto experimentálnej práce sa dá predpokladať, že sEng nebude ovplyvňovať metabolizmus cholesterolu a žlčových kyselín vo vybranom experimentálnom modeli.

6. Zoznam použitých skratiek

ABC	„ATP binding cassette“
Acat2	„Acetyl-CoA acetyltransferase 2“
ALK1/5	„Activine receptor-like kinase 1/5“
ATP	adenosíntrifosfát
BCRP	„Breast cancer resistance protein“
BMP	„Bone morphogenetic protein“
BSEP	„Bile salt export pump“
Cyp7a1	Cholesterol-7 α -hydroxyláza
FXR	„Farnesoid X receptor“
GLUT2	„Glukose transporter 2“
GSH	Glutatión
HCV	Vírus hepatitídy C
HDL	„High density lipoprotein“
HHT1	Hereditárna hemoragická teleangiektáza typ 1
HMG-CoA	3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzým A reductáza
Hmgcr	3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzým A reductáza
HSC	„Hepatic stellate cells“
LDL	„Low density lipoprotein“
MATE	„multidrug and toxin extrusion exchanger“
MDR	„Multidrug resistance protein“
MMP-14	„Matrix metalloproteinase 14“

MRP	„Multidrug resistance-associated proteins“
NTCP	„Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide“
OAT	„Organic anion transporter“
OATP	„Organic anion transporting polypeptide“
OCT	„Organic cation transporter“
OST α/β	„Organic solute transporter α/β “
PDZ	serín-serín-alanín sekvencia
P-gp	P-glykoproteín
PPAR- $\alpha/\delta/\gamma$	„Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha/\delta/\gamma$ “
CYP	Izoformy cytochromu P450
RXR	„Retinoid X receptor“
RT-PCR	„Reverse transcriptase-polymerase chain reaction“
sEng	Solubilný endoglín
SCAP	„SREBP cleavage activating protein“
SLC	„Solute carrier“
SR-B1	„Scavenger receptor class B type 1“
SREBP	„Sterol regulatory element-binding protein“
TGF- β	„Transforming growth factor β “, Transformujúci rastový faktor β
TNF- α	„Tumor necrosis factor α “

Poznámka

Skratky uvedených transportných proteínov a biotransformačných enzýmov sú popisované veľkými písmenami u ľudí a malými písmenami u myší.

7. Zoznam použitej literatúry

- ALT, A., MIGUEL-ROMERO, L., DONDERIS, J., ARISTORENA, M., BLANCO, F. J., ROUND, A., RUBIO, V., BERNABEU, C., MARINA, A. Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding. *PloS One*. 2012, roč. 7, č. 2, s. 1-12
- ANONYMOUS. TGF-Beta signaling. *My Cancer Genome* [online]. 2016 [cit. 2018-12-04]. Dostupné z: <https://www.mycancergenome.org/content/pathways/TGF-beta-signaling/>
- ANONYMOUS. Liver barrier. *Solvo Biotechnology* [online]. 2017 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <http://www.solvo.jp/barriers/hepatic-barrier>
- BALLATORI, N., LI, N., FANG, F., BOYER, J. L., CHRISTIAN, W. V., HAMMOND, CH. L. Ost alpha-Ost beta: A key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids. *Frontiers in Bioscience*. 2009, roč. 14, s. 2829-2844
- BLAHA, M., CERMANOVA, M., BLAHA, V., JAROLIM, P., ANDRYS, C., BLAZEK, M., MALY, J., SMOLEJ, L., ZAJIC, J., MASIN, V., ZIMOVA, R., REHACEK, V. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2008, roč. 197, č. 1, s. 264-270
- BUSH, K. T., WU, W., LUN, C., NIGAM, S. K. The drug transporter OAT3 (SLC22A8) and endogenous metabolite communication via the gut-liver-kidney axis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2017, roč. 292, č. 38, s. 15789-15803
- CAO, J., HUANG, L., LIU, Y., HOFFMAN, T., STIEGER, B., MEIER, P. J., VORE, M. Differential regulation of hepatic bile salt and organic anion transporters in pregnant and postpartum rats and the role of prolactin. *Hepatology*. 2001, roč. 33, č. 1, s. 140-147
- CLARK, D. A., COKER, R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 1998, roč. 30, č. 3, s. 293-298
- ČIHÁK, R. *Anatomie 2*. Praha: Avicenum, 1988, s. 122-139, ISBN 08-060-88
- DANCYGIER, H. Formation and Secretion of Bile and Bilirubin Metabolism. *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*. 1.vyd. Springer, 2010, s. 103-126, ISBN 978-3-540-93841-5

- DAWSON, P.A., HUBBERT, M. L., RAO, A. Getting the most from OST: role of organic solute transporter, OST α -OST β , in bile acid and steroid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, roč. 1801, č. 9, s. 994-1004
- DYLEVSKÝ, I. Trávicí systém (Apparatus Digestorius). *Funkční anatomie*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2009, s. 307-340, ISBN 978-80-247-3240-4
- EHRMANN, J. et al. Funkce jater. *Hepatologie: 2.vyd. 2014*. Praha: Grada Publishing a.s., 2014, s. 25-36, ISBN 978-80-247-8021-4
- EHRMANN, J. et al. Choroby žlučníku a žlučových cest . *Hepatologie: 2.vyd. 2014*. Praha: Grada Publishing a.s., 2014, s. 557-606, ISBN 978-80-247-8021-4
- EHRMANN, J. et al. Makroanatomie jater. *Hepatologie: 2.vyd. 2014*. Praha: Grada Publishing a.s., 2014, s. 17-24, ISBN 978-80-247-8021-4
- FALGUIÉRES, T., AÏT-SLIMANE, T., HOUSSET, C., MAURICE, M. ABCB4: Insights from pathobiology into therapy. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2014, roč. 38, č. 5, s. 557-563
- FONSATTI, E., NICOLAY, H. J. M., ALTOMONTE, M., COVRE, A., MAIO, M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovascular Research*. 2010, roč. 86, č. 1, s. 12-19
- FONTANA, J., TRNKA, J., MAĎA, P., IVÁK, P., LAVRÍKOVÁ, P., NOVÁKOVÁ, L., PAVELKA, M., ŠAJDÍKOVÁ, M. et al. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta se cvičebnicí* [online]. 1. Praha: 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, 2014, 627 s. [cit. 2018-10-25]. Dostupné z: <http://fb.lt.cz/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>
- GALETTI, M., PETRONINI, P. G., FUMAROLA, C., CRETELLA, D., LA MONICA, S., BONELLI, M., CAVAZZONI, A., SACCANI, F., CAFFARRA, C., ANDREOLI, R., MUTTI, A., TISEO, M., ARDIZZONI, A., ALFIERI, R. R. Effect of ABCG2/BCRP Expression on Efflux and Uptake of Gefitinib in NSCLC Cell Lines. *PloS One*. 2015, roč. 10, č. 11, s. 1-18
- GALLARDO-VARA, E., TUAL-CHALOT, S., BOTELLA, L. M., ARTHUR, H. M., BERNABEU, C. Soluble endoglin regulates expression of angiogenesis-related proteins and induction of arteriovenous malformations in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Disease Models & Mechanisms*. 2018, roč. 11, č. 9, s. 1-11

- GAO, B., YANG, F. M., YU, Z. T., LI, R., XIE, F., CHEN, J., LUO, H. J., ZHANG, J. C. Relationship between the expression of MDR1 in hepatocellular cancer and its biological behaviors. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015, roč. 8, č. 6, s. 6995-7001
- GRANT, C. E., GAO, M., DEGORTER, M. K., COLE, S. P., DEELEY, R. G. Structural determinants of substrate specificity differences between human multidrug resistance protein (MRP) 1 (ABCC1) and MRP3 (ABCC3). *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, roč. 36, č. 12, s. 2571-2581
- GREGORY, A. L., XU, G., SOTOV, V., LETARTE, M. The enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta 35, Supplement A, Trophoblast Research*. 2014, roč. 28, s. 93-99
- GÄLMAN, C., ARVIDSSON, I., ANGELIN, B., RUDLING, M. Monitoring hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase activity by assay of the stable bile acid intermediate 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. *Journal of Lipid Research*. 2003, roč. 44, č. 4, s. 859-866
- HE, S. M., LI, R., KANWAR, J. R., ZHOU, S. F. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Current Medicinal Chemistry*. 2011, roč. 18, č. 3, s. 439-481
- HOLEČEK, M. Metabolizmus lipidů. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada Publishing a.s., 2006, s. 117-146, ISBN 80-247-1562-7
- CHAI, J., CAI, S. Y., LIU, X., LIAN, W., CHEN, S., ZHANG, L., FENG, X., CHENG, Y., HE, Y., CHEN, L., WANG, R., WANG, H., BOYER, J. L., CHEN, W. Canalicular membrane MRP2/ABCC2 internalization is determined by Ezrin Thr567 phosphorylation in human obstructive cholestasis. *Journal of Hepatology*. 2015, roč. 63, č. 6, s. 1440-1448
- CHAI, J., HE, Y., CAI, S. Y., JIANG, Z., WANG, H., LI, Q., CHEN, L., PENG, Z., HE, X., WU, X., XIAO, T., WANG, R., BOYER, J. L., CHEN, W. Elevated hepatic multidrug resistance-associated protein 3/ATP-binding cassette subfamily C 3 expression in human obstructive cholestasis is mediated through tumor necrosis factor alpha and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase-signaling pathway. *Hepatology*. 2012, roč. 55, č. 5, s. 1485-1494

- CHANDRA, P., BROUWER, K. L. R. The Complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharmaceutical Research*. 2004, roč. 21, č. 5, s. 719-735
- CHEN, X., WANG, Y., CHEN, X., CHENG, K., LI, J., LOU, J., KE, J., YANG, Y., GONG, Y., ZHU, Y., WANG, L., ZHONG, R. Genetic variants in the regulatory region of SLC10A1 are not associated with the risk of hepatitis B virus infection and clearance. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2016, roč. 44, s. 495-500
- INUI, N., HASEGAWA, H., SUDA, T., NAKAMURA, Y., WATANABE, H., CHIDA, K. Expression and function of multidrug resistance protein 1 and multidrug resistance-associated protein 1 in lung dendritic cells from aging mice. *The Journal of Gerontology: Series A*. 2012, roč. 67, č. 10, s. 1049-1055
- JAVELAUD, D., MAUVIEL, A. Transforming growth factor-betas: smad signaling and roles in physiopathology. *Pathologie Biologie*. 2004, roč. 52, č. 1, s. 50-54
- KACEVSKA, M., DOWNER, M. R., SHARMA, D., EVANS, R. M., CLARKE, S. J., LIDDLE, CH., ROBERTSON, G. R. Extrahepatic cancer suppresses nuclear receptor-regulated drug metabolism. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of American Association for Cancer Research*. 2011, roč. 17, č. 10, s. 3170-3180
- KALLIOKOSKI, A., NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *British Journal of Pharmacology*. 2009, roč. 158, č. 3, s. 693-705
- KAMINSKA, B., WESOŁOWSKA, A., DANILKIEWICZ, M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochimica Polonica*. 2005, roč. 52, č. 2, s. 329-337
- KAPUR, N. K., MORINE, K. J., LETARTE, M. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vascular Health and Risk Management*. 2013, roč. 9, s. 195-206
- KASPRZAK, A., ADAMEK, A. Role of Endoglin (CD105) in the Progression of Hepatocellular Carcinoma and Anti-Angiogenic Therapy. *International Journal Of Molecular Sciences*. 2018, roč. 19, č. 12, s. 3887
- KEPPLER, D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2011, roč. 201, s. 299-323
- KEPPLER, D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014, roč. 42, č. 4, s. 561-565

- KITTNAR, O. et al. Fyziologie trávení a vstřebávání. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 315-375, ISBN 978-80-247-3068-4
- KÖCK, K., BROUWER, K. L. R. A perspective on efflux transport proteins in the liver. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2012, roč. 92, č. 5, s. 599-612
- KOOLMAN, J., RÖHM, K.-H. Metabolismus lipidů. *Barevný atlas biochemie - Překlad 4. vydání*. Praha: Grada Publishing a.s., 2012, s. 144-158, ISBN 978-80-247-2977-0
- KULLAK-UBLICK, G. A., BEUERS, U., PAUMGARTNER, G. Hepatobiliary transport. *Journal of Hepatology*. 2000, roč. 32, č. 1, s. 3-18
- KUNTZ, E., KUNTZ, H.-D. Morphology of the Liver. *Hepatology: Textbook and Atlas*. 3.vyd. Springer Science & Business Media, 2009, s. 16-35, ISBN 978-3-540-76839-5
- KWON, Y. C., SASAKI, R., MEYER, K., RAY, R. Hepatitis C Virus Core Protein Modulates Endoglin (CD105) Signaling Pathway for Liver Pathogenesis. *Journal of Virology*. 2017, roč. 91, č. 21, s. 1-12
- LEBRIN, F., GOUMANS, M. J., JONKER, L., CARVALHO, R. L., VALDIMARSDOTTIR, G., THORIKAY, M., MUMMERY, C., ARTHUR, H. M., TEN DIJKE, P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *The EMBO Journal*. 2004, roč. 23, č. 20, s. 4018-4028
- LEE, W. K., WOLFF, N. A., THEVENOD, F. Organic cation transporters: physiology, toxicology and special focus on ethidium as a novel substrate. *Current Drug Metabolism*. 2009, roč. 10, č. 6, s. 617-631
- LEE, Y. M., CUI, Y., KÖNIG, J., RISCH, A., JÄGER, B., DRINGS, P., BARTSCH, H., KEPPLER, D., NIEST, A. T. Identification and functional characterization of the natural variant MRP3-Arg1297His of human multidrug resistance protein 3 (MRP3/ABCC3). *Pharmacogenetics*. 2004, roč. 14, č. 4, s. 213-223
- LETAMENDÍA, A., LASTRES, P., BOTELLA, L. M., RAAB, U., LANGA, C., VELASCO, B., ATTISANO, L., BERNABEU, C. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, roč. 273, č. 49, s. 33011-33019
- LEVINE, R. J., LAM, C., QIAN, C., YU, K. F., MAYNARD, S. E., SACHS, B.P., SIBAI, B. M., EPSTEIN, F. H., ROMERO, R., THADHANI, R., KARUMANCHI, S. A., CPEP STUDY GROUP. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*. 2006, roč. 355, č. 10, s. 992-1005

- LI, W., LI, J., WANG, R., XIE, H., JIA, Z. MDR1 will play a key role in pharmacokinetic changes under hypoxia at high altitude and its potential regulatory networks. *Drug Metabolism Reviews*. 2015, roč. 47, č. 2, s. 191-198
- LIANG, S. C., YANG, C. Y., TSENG, J. Y., WANG, H. L., TUNG, C. Y., LIU, H. W., CHEN, C. Y., YEH, Y. C., CHOU, T. Y., YANG, M. H., WHANG-PENG, J., LIN, C. H. ABCG2 localizes to the nucleus and modulates CDH1 expression in lung cancer cells. *Neoplastia*. 2015, roč. 17, č. 3, s. 265-278
- LIN, H. Y., MOUSTAKAS, A. TGF-beta receptors: structure and function. *Cellular and Molecular Biology*. 1994, roč. 40, č. 3, s. 337-349
- LÓPEZ-NOVOA, J. M., BERNABEU, C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology*. 2010, roč. 299, č. 4, s. H959-H974
- LOPEZ-NOVOA, J. M., BERNABEU, C. ENG (Endoglin). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [online]. 2012 [cit. 2017-10-05]. Dostupné z: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ENG.html
- LUKÁŠ, K. et al. Anatomie. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry*. Praha: Grada Publishing a.s., 2005, s. 19-34, ISBN 80-247-1283-0
- LUKÁŠ, K., ŽÁK, A. Onemocnění jater. *Gastroenterologie a hepatologie – učebnice*. Praha: Grada Publishing a.s., 2007, s. 165-177, ISBN 978-80-247-1787-6
- LÜLLMAN-RAUCH, R. Žlázy trávicí trubice. *Histologie*. 1. české vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2012, s. 340-356, ISBN 978-80-247-3729-4
- MASUYAMA, H., NAKATSUKASA, H., TAKAMOTO, N., HIRAMATSU, Y. Correlation between soluble endoglin, vascular endothelial growth factor receptor-1, and adipocytokines in preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007, roč. 92, č. 7, s. 2672-2679
- MERKUNOVÁ, A., OREL, M. Trávicí soustava. *Anatomie a fyziologie člověka: Pro humanitní obory*. Praha: Grada Publishing a.s., 2008, s.127-144, ISBN 978-80-247-1521-6
- MEURER, S. K., ALSAMMAN, M., SCHOLTEN, D., WEISKIRCHEN, R. Endoglin in liver fibrogenesis: Bridging basic science and clinical practice. *World Journal of Biological Chemistry*. 2014, roč. 5, č. 2, s. 180-203

MEURER, S. K., TIHAA, L., BORKHAM-KAMPHORST, E., WEISKIRCHEN, R. Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cellular Signalling*. 2011, roč. 23, č. 4, s. 683-699

MIHALJEVIČ, I., POPOVIČ, M., ŽAJA, R., MARAKOVIČ, N., ŠINKO, G., SMITAL, T. Interaction between the zebrafish (*Danio rerio*) organic cation transporter 1 (Oct1) and endo- and xenobiotics. *Aquatic Toxicology*. 2017, roč. 187, s. 18-28

MILOJKOVIC, M., MILACIC, N., RADOVIC, J., LJUBISAVLJEVIC, S. MDR1 gene polymorphisms and P-glycoprotein expression in respiratory diseases. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Univerzity Palacky, Olomouc, Czech Republic*. 2015, roč. 159, č. 3, s. 341-346

MO, W., ZHANG, J. T. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2012, roč. 3, č. 1, s. 1-27

MODRIC, J. Liver. *eHealthStar: Evidence Based Health Articles* [online]. 2016 [cit. 2018-10-25]. Dostupné z: <https://www.ehealthstar.com/anatomy/liver>

MORITA, S. Y., TERADA, T. Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *BioMed Research International*. 2014, roč. 2014, s. 1-11

MYINT, K., LI, Y., PAXTON, J., MCKEAGE, M. Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2) Mediated Transport of Oxaliplatin-Derived Platinum in Membrane Vesicles. *PloS One*. 2015, roč. 10, č. 7, s. 1-15

NACHTIGAL, P., ZEMANKOVA VECEROVA, L., RATHOUSKA, J., STRASKY, Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012, roč. 224, č. 1, s. 4-11

NASSIRI, F., CUSIMANO, M. D., SCHEITHAUER, B. W., ROTONDO, F., FAZIO, A., YOUSEF, G. M., SYRO, L. V., KOVACS, K., LLOYD, R. V. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Research*. 2011, roč. 31, č. 6, s. 2283-2290

NIGAM, S. K., BUSH, K. T., MARTOVETSKY, G., AHN, S. Y., LIU, H. C., RICHARD, E., BHATNAGAR, V., WU, W. The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiological Reviews*. 2015, roč. 95, č. 1, s. 83-123

- OUJO, B., PEREZ-BARRIOCANAL, F., BERNABEU, C., LOPEZ-NOVOA, J. M. Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. *Current Molecular Medicine*. 2013, roč. 13, č. 8, s. 1345-1357
- PÉREZ-GÓMEZ, E., DEL CASTILLO, G., SANTIBÁNEZ, J. F., LÓPEZ-NOVOA, J. M., BERNABÉU, C., QUINTANILLA, M. The role of the TGF- β coreceptor endoglin in cancer. *The Scientific World Journal*. 2010, roč. 10, s. 2367-2384
- PEREZ-ROQUE, L., LOPEZ-NOVOA, J. M. Soluble endoglin: a biomarker or a protagonist in the pathogenesis of preeclampsia?. *Portuguese Journal of Nephrology and Hypertension*. 2014, roč. 28, č. 3, s. 185-192
- PFAFFL, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001, roč. 29, č. 9, s. 45-45
- PISCITELLI, S. C., RODVOLD, K. A. Mechanism of Drug Interaction II. *Drug Interactions in Infectious Diseases*. 2. vyd. Springer Science & Business Media, 2007, s. 41-82, ISBN 1-59259-924-9
- PULLINGER, C. R., ENG, C., SALEN, G., SHEFER, S., BATTA, A. K., ERICKSON, S. K., VERHANGEN, A., RIVERA, C. R., MULVIHILL, S. J., MALLOY, M. J., KANE, J. P. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002, roč. 110, č. 1, s. 109-117
- RÍUS, C., SMITH, J. D., ALMENDRO, N., LANGA, C., BOTELLA, L. M., MARCHUK, D. A., VARY, C. P., BERNABÉU, C. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagictelangiectasia type 1. *Blood*. 1998, roč. 92, č. 12, s. 4677-4690
- ROKYTA, R. et al. Fyziologie trávení a vstřebávání. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: ISV Nakladatelství, 2000, s. 145-147, ISBN 80-85866-45-5
- ROMERO, D., TERZIC, A., CONLEY, B. A., CRAFT, C. S., JOVANOVIC, B., BERGAN, R. C., VARY, C. P. Endoglin phosphorylation by ALK2 contributes to the regulation of prostate cancer cell migration. *Carcinogenesis*. 2010, roč. 31, č. 3, s. 359-366
- ROSSI, E. et. al. Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016, roč. 73, č. 8, s. 1715-1739

ROTH, M., OBAIDAT, A., HAGENBUCH, B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the *SLCO* and *SLC22A* gene superfamilies. *British Journal of Pharmacology*. 2012, roč. 165, č. 5, s. 1260-1287

SABAÁ, C., PASCULLI, G., LENATO, G. M., SUPPRESSA, P., LASTELLA, P., MEMEO, M., DICUONZO, F., GUANT, G. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical features in ENG and ALK1 mutation carriers. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007, roč. 5, č. 6, s. 1149-1157

SHERLOCK, S., DOOLEY J. Cholestasis. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 11vyd. John Wiley & Sons, 2008, s. 219-240, ISBN 9780470986813

SCHUURHUIS, G. J., BROXTERMAN, H. J., OSSENKOPPELE, G. J., BAAK, J. P., EEKMAN, C. A., KUIPER, C. M., FELLER, N., VAN HEIJNINGEN, T. H., KLUMPER, E., PIETERS, R. et al. Functional multidrug resistance phenotype associated with combined overexpression of Pgp/MDR1 and MRP together with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine sensitivity may predict clinical response in acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*. 1995, roč. 1, č. 1, s. 81-93

SUCHY, F. J., ANANTHANARAYANAN, M. Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2006, roč. 43, č. 1, s. S10-S16

SUZUKI, H. Analysis of xenobiotic detoxification system mediated by efflux transporters. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 1999, roč. 119, č. 11, s. 822-834

TAZUMA, S., TAKIKAWA, H. Hepatobiliary Transport of Bile Acids. *Bile Acids in Gastroenterology: Basic and Clinical*. Springer, 2017, s. 9-25, ISBN 978-4-431-56060-9

TRAUNER, M., BOYER, J. L. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological Reviews*. 2003, roč. 83, č. 2, s. 633-671

TRIGATTI, B. L., KRIEGER, M., RIGOTTI, A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2003, roč. 23, č. 10, s. 1732-1738

TROJAN, S. et al. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 1999. s. 263-266, ISBN 80-247-0512-5

- VALLURU, M., STATON, C. A., REED, M. W., BROWN, N. J. Transforming growth factor- β and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Frontiers in Physiology*. 2011, roč. 2, s. 89
- VAN BERGE HENEGOUWEN, G. P., KEPPEL, D., LEUSCHNER, U., PAUMGARTNER, G., STIEHL A. Bile acid uptake by microperfused rat intrahepatic bile ducts. *Biology of Bile Acids in Health and Disease*. Springer Science & Business Media, 2001, s. 128-135, ISBN 0-7923-8768-6
- VELASCO, S., ALVAREZ-MUNOZ, P., PERICACHO, M., DIJKE, P. T., BERNABÉU, C., LÓPEZ-NOVOA, J. M., RODRÍGUES-BARBERO, A. L- and S-endoglin differentially modulate TGF β 1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *Journal of Cell Science*. 2008, roč. 121, č. 6, s. 913-919
- WANG, L., WANG, J., ZHOU, X., LI, J., SHI, Y., HAN, Z., WANG, X., LI, S., YANG, Z., WANG, R., FAN, D., HAN, Y. CM2 antigen, a potential novel molecule participating in glucuronide transport on rat hepatocyte canalicular membrane. *European Journal of Histochemistry*. 2012, roč. 56, č. 3, s. 164-169
- WESSLER, J. D., GRIP, L. T., MENDELL, J., GIUGLIANO, R. P. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013, roč. 61, č. 25, s. 2495-2502
- WIEL, C., GRAS, B., VINDRIEUX, D., WARNIER, M., GITENAY, D., LE CALVÉ, B., FERRAND, M., AUGERT, A., BERNARD, D. Multidrug resistance protein 3 loss promotes tumor formation by inducing senescence escape. *Oncogene*. 2016, roč. 35, č. 12, s. 1596-1601
- WIESE, M. BCRP/ABCG2 inhibitors: a patent review (2009-present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2015, roč. 25, č. 11, s. 1229-1237
- YIN, J., ZHANG, J. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: from discovery to clinical application. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban*. 2011, roč. 36, č. 10, s. 927-938
- YOU, G., MORRIS, M. E. Drug transport in the liver. *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. John Wiley & Sons, 2007, s. 359-410, ISBN 978-0-471-78491-3
- ŽÁK, A. et al. Homeostáza cholesterolu, léčba dyslipidémie a riziko cholelitiázy. *Ateroskleróza: Nové pohledy*. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 123-162, ISBN 978-80-247-3052-3