

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki

Ewelina Żuk

**Ocena wpływu fitoestrogenów sojowych na regulację
endogennej syntezy cholicy i gromadzenia lipidów
w wątrobie**

Praca doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Agata
Chmurzyńska

Poznań, 2024

Składam serdeczne podziękowania

**Pani prof. dr hab. n. med. i n. o zdr.
Agacie Chmurzyńskiej**

*za wskazanie kierunku badań stanowiących
temat niniejszej pracy doktorskiej,
nieocenioną pomoc i wsparcie na każdym
etapie jej powstawania oraz poświęcony
czas i życzliwość.*

Spis treści

Streszczenie.....	9
Summary	11
1. Wstęp	13
2. Część literaturowa.....	16
2.1. Charakterystyka choliny.....	16
2.1.1. Krótki rys historyczny i właściwości chemiczne	16
2.1.2. Źródła pokarmowe choliny oraz jej spożycie wraz z dietą.....	17
2.1.3. Czynniki wpływające na zapotrzebowanie na cholinę	20
2.1.4. Funkcje biologiczne, metabolizm i endogenna synteza choliny.....	22
2.2. Proces gromadzenia lipidów w wątrobie	27
2.2.1. Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby	27
2.2.2. Patomechanizm stłuszczenia wątroby.....	29
2.2.3. Metabolizm grup jednowęglowych a NAFLD	33
2.3. Charakterystyka fitoestrogenów.....	35
2.3.1. Klasyfikacja, budowa chemiczna, funkcje biologiczne	35
2.3.2. Źródła fitoestrogenów w żywności.....	38
2.3.3. Izoflawony sojowe – metabolizm i aktywność estrogenowa.....	40
2.4. Soja a niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby	44
3. Cele i zakres pracy	49
4. Materiał i metody badań	52
4.1. Opis eksperymentu na modelu zwierzęcym oraz zastosowanych diet.....	52
4.2. Ocena spożycia diet, analiza masy i składu ciała.....	55
4.3. Procedura pobrania próbek krwi i tkanek	55
4.4. Badanie histologiczne wątroby szczurów	56
4.5. Analiza stężenia wybranych parametrów biochemicznych	57
4.6. Oznaczenie zawartości tłuszczu w próbkach kału	58
4.7. Analiza ekspresji wybranych genów na poziomie transkrypcji	59
4.8. Oznaczenie białek metodą Western Blot	61
4.9. Oznaczenie białek metodą ELISA	63
4.10. Analiza statystyczna.....	63
5. Wyniki.....	65

5.1.	Parametry ogólnożywieniowe i wzrostowe zwierząt	65
5.2.	Analiza składu ciała zwierząt	69
5.3.	Analiza histologiczna wątroby szczurów	71
5.4.	Analiza wybranych parametrów biochemicznych	74
5.5.	Oznaczenie zawartości tłuszczu w próbkach kału	81
5.6.	Analiza ekspresji wybranych genów na poziomie transkrypcji oraz translacji ..	82
5.6.1.	Transkrypcja	82
5.6.2.	Translacja	86
6.	Dyskusja.....	91
7.	Wnioski	105
8.	Piśmiennictwo.....	107
9.	Spis tabel.....	123
10.	Spis rycin.....	123

Wykaz skrótów

acetylo-CoA – acetylokoenzym A

ACTB – beta aktyna

AI (ang. *adequate intake*) – wystarczające spożycie

ALAT (ang. *alanine aminotransferase*) – aminotransferaza alaninowa

AMP – adenozyno-5'-monofosforan

AMPK – kinaza białkowa aktywowana adenozynomonofosforanem

AspAT (ang. *aspartate aminotransferase*) – aminotransferaza asparaginianowa

CD – grupy spożywające karmę AIN-93M z prawidłową zawartością choliny

cDNA (ang. *complementary DNA*) – komplementarny DNA

CDP-cholina (ang. *cytidine diphosphate-choline*) – związek pośredni w czasie syntezy fosfatydylocholiny z choliny

CHDH (ang. *choline dehydrogenase*) – dehydrogenaza choliny

CholDD – grupy spożywające karmę AIN-93M z deficytem choliny

ChREBP (ang. *carbohydrate-responsive element-binding protein*) – białko wiążące element odpowiedzi na węglowodany

CHT (ang. *high-affinity choline transporter*) – grupa białek transportujących cholinę

CTL (ang. *choline transporter-like*) – grupa białek transportujących cholinę

DAI – daidzeina

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

EAR (ang. *estimated average requirement*) – średnie zapotrzebowanie dla grupy

EFSA (ang. *European Food Safety Authority*) – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności

ER (ang. *estrogen receptor*) – receptory estrogenowe

ERE (ang. *estrogen response element*) – element odpowiedzi na estrogen

FABP (ang. *fatty-acid-binding protein*) – białko wiążące kwasy tłuszczowe

FAS (ang. *fatty acid synthase*) – syntaza kwasów tłuszczowych

FATP (ang. *fatty acid transporter protein*) – białko transportujące kwasy tłuszczowe

FXR (ang. *farnesoid X receptor*) – receptor farnesoidu X

GEN – genisteina

HDL (ang. *high-density lipoprotein*) – lipoproteiny o wysokiej gęstości

HPRT (ang. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) – fosforybozylotransferaza hipoksantynowa

IL-6 – interleukina 6

ISO – ekstrakt izoflawonów sojowych

LDL (ang. *low-density lipoprotein*) – lipoproteiny o niskiej gęstości

MCD (ang. *methionine and choline deficient*) – dieta z niedoborem choliny i metioniny

MTHFD1 – dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa

NAFLD (ang. *nonalcoholic fatty liver disease*) – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby

NASH (ang. *non-alcoholic steatohepatitis*) – niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby

OCM (ang. *one-carbon metabolism*) – metabolizm grup jednowęglowych

OCT (ang. *organic cation transporter*) – transportery kationów organicznych

PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

PEMT (ang. *phosphatidylethanolamine N-methyltransferase*) – metylotransferaza fosfatydyloetanolaminy

PLA2 – fosfolipaza A2

PLC – fosfolipaza C

PLD – fosfolipaza D

PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) – receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów

RNA (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy

SAM – S-adenozylometionina

SCD-1 (ang. *stearoyl-CoA desaturase*) – desaturaza stearylo-CoA

SCFA (ang. *short-chain fatty acids*) – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SREBP-1c (ang. *sterol regulatory element-binding protein 1*) – białko wiążące sterolowy element regulatorowy

TBST (ang. *tris-buffered saline with Tween-20*) – buforowany roztwór soli fizjologicznej Tris z dodatkiem Tween 20

TG – triacyloglicerole

TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworów α

VLDL (ang. *very-low-density lipoprotein*) – lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości

Streszczenie

Stłuszczenie wątroby jest najczęściej występującym zaburzeniem funkcjonowania tego narządu. Jednym z kluczowych składników odżywczych, który przyczynia się do prawidłowej pracy wątroby jest cholina. Fosfatydylocholina, czyli jedna z postaci choliny, odgrywa istotną rolę w metabolizmie lipidów i zapobieganiu ich akumulacji w wątrobie. Efektywność endogennej syntezy fosfatydylocholiny zależy m.in. od enzymu PEMT kodowanego przez gen *PEMT*, którego aktywność jest zależna od poziomu estrogenów. Jak dotąd nie zbadano wpływu fitoestrogenów, które są zbliżone strukturalnie do estrogenów, na endogenną produkcję fosfatydylocholiny i funkcjonowanie wątroby. Sugeruje się jednak, że spożycie soi może pozytywnie wpływać na metabolizm lipidów w wątrobie.

Celem niniejszej dysertacji była ocena wpływu wybranych fitoestrogenów, tj. izoflawonów sojowych, na endogenną syntezę choliny i metabolizm lipidów u szczurów, zarówno w stanie niedoboru choliny w diecie, jak i prawidłowej jej podaży.

Przeprowadzono doświadczenie na modelu *in vivo* obejmujące 80 samców szczurów stada niekrewniaczego Wistar w wieku 8 tygodni. W pierwszym etapie badania zwierzęta zostały przydzielone do dwóch równolicznych grup po 40 osobników. W tej części eksperymentu, trwającej 4 tygodnie, jedna grupa spożywała karmę AIN-93M z prawidłową zawartością choliny (CD), a druga dietę z jej deficytem (CholDD). W kolejnym etapie każdą z tych grup podzielono na 4 podgrupy po 10 zwierząt, którym podawano tę samą dietę co w pierwszym etapie, ale z dodatkami izoflawonów sojowych, tj. genisteiną (CD-GEN lub CholDD-GEN), daidzeiną (CD-DAI lub CholDD-DAI) w dawce 0,5 g/kg diety lub gotowym ekstraktem izoflawonów z ziaren soi (CD-ISO lub CholDD-ISO) w dawce 2 g/kg diety. W trakcie trwania doświadczenia wykonano cotygodniowe pomiary masy ciała. Trzykrotnie przeprowadzono również analizę składu ciała z wykorzystaniem jądrowego rezonansu magnetycznego. W materiale biologicznym pozyskanym od zwierząt na koniec eksperymentu oznaczono z wykorzystaniem testów kolorymetrycznych lub immunoenzymatycznych, stężenia wybranych parametrów biochemicznych krwi, tj. glukozy, cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL, HDL i VLDL, triacylogliceroli, enzymów wątrobowych, a w pobranym fragmencie wątroby stężenie fosfatydylocholiny. Dokonano również oceny morfologicznej skrawków wątroby oraz oznaczono wg metody Soxhleta zawartość tłuszczu w kale zebranym w ostatnim tygodniu doświadczenia. Analizę ekspresji wybranych genów (*Pemt*, *Ppar γ* ,

Srebp-1c, *Fasn*) w wątrobie szczurów na poziomie transkrypcji przeprowadzono z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym, natomiast oznaczenia białek PEMT, PPAR γ , SREBP-1c oraz FAS dokonano stosując metodę Western Blot lub ELISA.

Spożycie izoflawonów sojowych nie wpłynęło na ekspresję genu *Pemt*, a także na zawartości fosfatydylocholiny w wątrobie szczurów bowiem różnice istotne statystycznie między grupami zaobserwowano wyłącznie w odniesieniu do różnej zawartości choliny w diecie. Wykazano natomiast, że między grupami przyjmującymi różne fitoestrogeny sojowe występują różnice w poziomie ekspresji genów *Srebp-1c* i *Fasn* związanych z metabolizmem lipidów. Jednak ze względu na rozbieżności w wynikach na poziomie transkrypcji i translacji efekt ten wydaje się niejednoznaczny. Różnice w poziomie ekspresji genów *Pemt*, *Ppar γ* , *Srebp-1c*, *Fasn* zaobserwowano natomiast porównując ze sobą grupy spożywające prawidłowe ilości choliny w diecie i grupy przyjmujące karmę z deficytem tego składnika. Deficyt choliny w diecie istotnie zwiększył ekspresję genu *Pemt* na poziomie transkrypcji. Efekt ten nie przekładał się na ilość białka PEMT. Niedobór choliny w diecie wpływał również na zmiany w parametrach biochemicznych krwi. Zauważono bowiem różnice między grupami w stężeniu cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji LDL i VLDL w surowicy krwi. Wśród grup spożywających dietę z deficytem choliny zauważono również łagodne zmiany morfologiczne w hepatocytach, tzn. akumulację drobnych kropeł lipidowych i powiększenie obwodu komórek. Nie wykazano zmian w zawartości tłuszczu w kale między poszczególnymi grupami bez względu na zawartość w dietach choliny i izoflawonów sojowych.

Podsumowując, fitoestrogeny sojowe mimo strukturalnego podobieństwa do estrogenów nie wpływają na zwiększenie endogennej syntezy choliny. Ich oddziaływanie na szlaki związane z metabolizmem lipidów wymaga dalszych badań. Potwierdzono natomiast negatywny wpływ niedoboru choliny w diecie na funkcjonowanie wątroby - 12-tygodniowy okres niedoboru spowodował widoczne w obrazie mikroskopowym zmiany w morfologii wątroby, a także wpłynął na niektóre parametry profilu lipidowego. Uzyskane wyniki stanowią potwierdzenie wcześniejszych badań i kolejną przesłankę do stworzenia zaleceń żywieniowych zwracających uwagę na odpowiednie spożycie choliny z dietą.

Słowa kluczowe: endogenna synteza choliny, izoflawony sojowe, stłuszczenie wątroby, ekspresja genów, metabolizm lipidów

Summary

Fatty liver is the most common disorder of this organ. One of the key nutrients that contributes to the proper functioning of the liver is choline. Phosphatidylcholine, one of the forms of choline, plays an important role in lipid metabolism and prevents accumulation of lipids in the liver. The effectiveness of endogenous phosphatidylcholine synthesis is dependent on among others on the PEMT enzyme coded by the *PEMT* gene, whose activity depends on estrogen levels. So far, the effects of phytoestrogens, which are structurally similar to estrogens, on endogenous phosphatidylcholine production and liver function have not been investigated. However, it has been suggested that soybean intake can have a positive effect on lipid metabolism in the liver.

The aim of this dissertation was to assess effects of selected phytoestrogens, i.e. soy isoflavones on endogenous choline synthesis and lipid metabolism in rats, both in a state of choline deficiency in the diet and proper supply.

An in vivo experiment was conducted on 80 male outbred Wistar rats aged 8 weeks. In the first stage of the study, the animals were assigned to two equal groups of 40 animals each. In this part of the experiment, which lasted 4 weeks, one group was fed with an AIN-93M diet with normal choline content (CD), and the other was fed with a choline-deficient diet (CholDD). In the next stage, both groups were divided into 4 subgroups of 10 animals each, which were fed the same diet as in the first stage, but with the addition of soy isoflavones, i.e. genistein (CD-GEN or CholDD-GEN), daidzein (CD-DAI or CholDD-DAI) at a dose of 0.5 g/kg of diet or ready extract of isoflavones from soybeans (CD-ISO or CholDD-ISO) at a dose of 2 g/kg of diet. During the experiment, weekly body weight measurements were performed and also body composition analysis using nuclear magnetic resonance was performed three times. At the end of the experiment, in the biological material obtained from the animals the concentrations of selected biochemical blood parameters were measured using colorimetric or enzyme-linked immunosorbent tests, i.e. glucose, total cholesterol, LDL, HDL and VLDL cholesterol, triacylglycerols, liver enzymes, and the level of phosphatidylcholine in the collected liver fragment. Morphological assessment of liver sections was also performed and the fat content in feces collected in the last week of the experiment was analyzed according to the Soxhlet method. The analysis of the expression of selected genes (*Pemt*, *Ppar γ* , *Srebp-1c*, *Fasn*) in the liver at the transcription level was performed using the *real-time* PCR method, while

the PEMT, PPAR γ , SREBP-1c and FAS proteins were analyzed using the Western Blot or ELISA method.

The consumption of soy isoflavones did not affect the expression of the *Pemt* gene or phosphatidylcholine content in the liver of rats, as statistically significant differences between groups were observed only in relation to the different choline content in the diet. However, there were differences in the expression of levels of *Srebp-1c* and *Fasn* genes related to lipid metabolism between groups taking different soy phytoestrogens. However, due to discrepancies in the transcript and protein abundance, this effect seems to be ambiguous. Differences in the expression of levels of the *Pemt*, *Ppar γ* , *Srebp-1c*, and *Fasn* genes were observed when comparing groups consuming proper amounts of choline in the diet compared to the group consuming food with a deficit of this nutrient. Dietary choline deficiency significantly increased *Pemt* gene expression at the transcriptional level. Nevertheless, this effect was not detectable at the PEMT protein level. Choline deficiency in a diet also led to changes in the blood biochemical parameters. Differences were noticed between the rat groups in the concentrations of total cholesterol and LDL and VLDL cholesterol in blood serum. Among the groups consuming the choline-deficient diet, mild morphological changes were also observed in hepatocytes, including the accumulation of small lipid droplets and enlargement of cell circumference. No changes in fecal fat content were observed between the groups, regardless of the content of choline and soy isoflavones in diets.

To sum up, the soy phytoestrogens, despite their structural similarity to estrogens, do not increase endogenous choline synthesis. Their impact on pathways related to lipid metabolism requires further research. However, the negative relationship between dietary choline deficiency and liver function was confirmed - the 12-week period of deficiency caused changes in liver morphology visible in the microscopic image and also influenced some parameters of the lipid profile. The obtained results confirm previous research and are another reason to create dietary recommendations focusing on the appropriate choline intake in a diet.

Key words: endogenous choline synthesis, soy isoflavones, fatty liver, gene expression, lipid metabolism

1. Wstęp

Dieta określana jako zachodnia, charakteryzująca się wysokim poziomem spożycia tłuszczów nasyconych, cukrów prostych i przetworzonej żywności, jest istotnym czynnikiem przyczyniającym się do wzrostu częstości występowania chorób przewlekłych niezakaźnych. Otyłość, cukrzyca typu 2, choroby układu sercowo-naczyniowego i nowotwory to tylko niektóre z poważnych schorzeń powiązanych z tym sposobem żywienia. W odpowiedzi na rosnącą świadomość zdrowotną i ekologiczną, w ostatnich latach coraz więcej osób wybiera diety wegetariańskie i wegańskie. Kluczowym aspektem takiej diety jest odpowiedni dobór produktów, gwarantujący jej prawidłowe zbilansowanie, a tym samym uniknięcie wystąpienia niedoborów pokarmowych. Często jednym z podstawowych elementów diet wegetariańskich są produkty sojowe bogate w białko, witaminy, składniki mineralne, jak i w szereg związków bioaktywnych, wykazujących pozytywne działanie na ludzki organizm. Ze względu na zawartość tych składników upatruje się wielu korzyści w spożyciu soi w umiarkowanych ilościach. Potwierdzeniem tego są wyniki licznych badań naukowych. Potencjalne zagrożenia np. w kwestii wpływu soi na gospodarkę hormonalną mogą wystąpić, ale przy jej nadmiernym spożyciu, znacznie różniącym się od raportowanego jako zwyczajowe.

Do zaburzeń bezpośrednio związanych ze sposobem żywienia zalicza się również stłuszczenie wątroby, czyli nadmierne gromadzenie się tłuszczu w komórkach wątroby. Jest ono coraz częstszym problemem zarówno w populacji europejskiej, jak i na całym świecie. Szacuje się, że nawet 25-30% dorosłych w krajach rozwiniętych może mieć stłuszczenie wątroby. Stan ten może prowadzić do niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (ang. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD), która stanowi poważne zagrożenie zdrowotne i jest związana z ryzykiem rozwoju marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego. Fakt ten podkreśla znaczenie wczesnej diagnozy i prewencji dietetycznej. W etiologii NAFLD szczególną rolę odgrywa m.in. cholina, niezbędny składnik odżywczy, wspierający prawidłowe funkcjonowanie wątroby. Cholina jest bowiem kluczowa dla transportu i metabolizmu tłuszczów w wątrobie. Jej niedobór stanowi jeden z czynników prowadzących do nadmiernego gromadzenia się kropeł lipidowych w komórkach hepatocytów. Składnik ten może być dostarczany z pożywieniem, głównie pochodzenia zwierzęcego. Pojawia się zatem pytanie w jaki sposób zaplanować żywienie, aby umożliwić dostarczenie odpowiedniej ilości choliny w przypadku diety wegetariańskiej. Zgłębiając ten temat należy wspomnieć,

że wraz z rozwojem technik molekularnych odkryto, że organizm jest w stanie przeprowadzać także endogenną syntezę choliny, jednak zazwyczaj jest ona niewystarczająca do pokrycia zapotrzebowania na ten składnik odżywczy. Wykazano, że u mężczyzn oraz kobiet po menopauzie, endogenna synteza choliny jest szczególnie niska. Wynika to z faktu, iż jest ona regulowana poprzez estrogeny, a te grupy ludności charakteryzują się ich niskim stężeniem. Taka sytuacja, przy dodatkowo źle skomponowanej diecie zwiększa ryzyko wystąpienia niedoborów i tym samym rozwoju NAFLD. Jeśli występuje problem z dostarczeniem wraz z dietą odpowiedniej ilości tego składnika odżywczego pojawia się pytanie, czy i w jaki sposób można byłoby zwiększyć jego endogenną produkcję oraz zadbać o prawidłową pracę wątroby w inny sposób.

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia naukowe mówiące o pozytywnym wpływie produktów sojowych na funkcjonowanie wątroby. Szczególnego znaczenia upatruje się w białku sojowym, które może wpływać na obniżenie poziomu cholesterolu frakcji LDL (ang. *low-density lipoprotein*), ale także w składnikach bioaktywnych obecnych w ziarnach soi, tj. izoflawonach sojowych, które mogą redukować stan zapalny w wątrobie oraz prowadzić do zmniejszenia akumulacji tłuszczu. Jak dotąd opisano tylko kilka potencjalnych mechanizmów działania izoflawonów sojowych w zapobieganiu stłuszczeniu wątroby. W badaniach skupiono się głównie na ocenie ich właściwości antyoksydacyjnych, wpływie na poprawę wrażliwości komórek na insulinę oraz na metabolizm lipidów w zakresie hamowania lipogenezy. Procesy te są jednocześnie wymieniane jako kluczowe w etiologii NAFLD. Należy jednak zaznaczyć, że mimo uzyskania obiecujących wyników dotyczących wpływu izoflawonów sojowych na przemiany lipidów, to mnogość czynników powiązanych z tymi procesami, jak i niewielka liczba badań dotyczących tego tematu uniemożliwia wysnucie jasnych wniosków. Potencjał drzemiący w tym zagadnieniu skłania więc do jego zgłębiania i oceny wpływu izoflawonów sojowych na metabolizm tłuszczów. Warto również zaznaczyć, że jak dotąd nie scharakteryzowano działania izoflawonów sojowych na szlaki metaboliczne, w których kluczową rolę odgrywa cholina. Co szczególnie interesujące izoflawony należące do grupy fitoestrogenów są związkami o podobnej budowie chemicznej do estrogenów krążących w ludzkim organizmie. Jak wspomniano wcześniej, endogenna synteza choliny zależna jest od stężenia estrogenów. Można więc podejrzewać, że izoflawony również mogą wpływać na ten proces powodując produkcję większej ilości choliny. Potwierdzenie tego umożliwiłoby stworzenie nowych strategii żywieniowych, które poprzez zapobieganie niedoborom pozytywnie wpływałyby na funkcjonowanie organizmu, czy w tym

konkretnym temacie - pracę wątroby. Zagadnienie to wymaga jednak dokładnego przeanalizowania poprzez zaprojektowanie badań umożliwiających ocenę potencjalnych zależności między izoflawonami sojowymi, a endogenną syntezą choliny i wpływem tych związków na proces biosyntezy lipidów na poziomie molekularnym.

2. Część literaturowa

2.1. Charakterystyka choliney

2.1.1. Krótki rys historyczny i właściwości chemiczne

Pierwsze wzmianki na temat choliney pojawiły się w 1850 r. kiedy to Theodore Gobley członek *Académie Nationale de Pharmacie* w Paryżu wyizolował substancję z tkanki mózgowej i ikry karpia, którą opisał jako „lecytyna” na cześć greckiego słowa *lekithos* oznaczającego żółtko jajka. Adolph Strecker w 1862 przeprowadził eksperyment, podczas którego podgrzewał lecytynę otrzymaną z żółci i zauważył, że następstwem tego jest powstanie nowej substancji chemicznej, którą nazwał „cholina”. W kolejnych latach Oscar Liebreich, badając tkankę pobraną z mózgu zidentyfikował nową substancję „neurynę”. Zauważono, że neuryna i cholina mają bardzo zbliżoną budowę chemiczną. Po okresie nieścisłości w dokładnym opisie stwierdzono, że te dwa związki to ta sama substancja. Wraz z rozwojem metod badawczych lecytyna została chemicznie scharakteryzowana jako fosfatydylocholina (Zeisel, 2012). W 1956 roku Eugene P. Kennedy opisał „szlak CDP-choliney” (ang. *CDP-choline pathway*), w którym cholina jest wykorzystywana do syntezy fosfatydylocholiney (Eugene, 1954). Drugą ścieżką produkcji fosfatydylocholiney w organizmie jest „szlak PEMT” (ang. *PEMT pathway*), który został zidentyfikowany przez Jona Bremera i Davida Greenberga w 1960 roku (Bremer & Greenberg, 1960). Rola choliney jako prekursora acetylocholiney została opisana przez naukowców Otto Loewiego i Henry'ego Dale'a (Zeisel, 2012).

Wraz z rozwojem metod badawczych gromadzono kolejne informacje na temat roli choliney w organizmie człowieka. Mimo tego stosunkowo szybkiego postępu naukowego jeszcze do niedawna utrzymywano, że niedobór choliney nie jest czynnikiem letalnym, przez co sądzono, że cholina nie jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania ustroju. Jednak w roku 1998 amerykański Instytut Medycyny wskazał, że cholina spełnia szereg istotnych funkcji w organizmie, co spowodowało opracowanie normy spożycia na poziomie wystarczającego spożycia (ang. *adequate intake, AI*) (Institute of Medicine, 1998). Jednym z głównych powodów zmiany były doniesienia naukowe mówiące o ograniczonych możliwościach syntezy choliney przez organizm. Niektórzy badacze zaliczali ów związek do grupy witamin, co ostatecznie odrzucono ze względu na występowanie go w dość dużych ilościach w ustroju, m.in. w fosfolipidach (Institute of Medicine, 1998; Z. Li & Vance, 2008). W ostatnich latach szczególnie intensywnie bada

się zagadnienia związane z różnicami w zapotrzebowaniu na cholinę w diecie wynikającymi z specyficznych uwarunkowań genetycznych.

Cholina to organiczny związek chemiczny, zaliczany do grupy alkoholi amonowych czwartorzędowych. Strukturalnie klasyfikowany jest jako kation o wzorze sumarycznym $C_5H_{14}NO^+$, stanowiący macierz całej grupy związków. Posiada grupę hydroksylową (-OH) oraz trzy grupy metylowe (-CH₃) przyłączone do atomu azotu, co nadaje mu charakter polarny. Właściwości hydrofilowe ze względu na obecność grupy hydroksylowej, umożliwiają cholinie interakcje z innymi cząsteczkami poprzez tworzenie wiązań wodorowych. Taka budowa przekłada się na dobrą rozpuszczalność w wodzie, natomiast jest ona nierozpuszczalna w chloroformie i eterze. Cholina może podlegać różnym reakcjom chemicznym, w tym fosforylacji, estryfikacji i metylacji. Reakcje te są kluczowe dla pełnionych przez nią funkcji, stanowi bowiem prekursor acetylocholiny i fosfatydylocholiny, natomiast po utlenieniu do betainy staje się także donorem grup metylowych. Cholina może reagować z kwasami tworząc różne sole, np. powszechnie znany i wykorzystywany w przemyśle paszowym chlorek choliny (Phillips, 2012; Tayebati i in., 2015; Wiedeman i in., 2018).

2.1.2. Źródła pokarmowe choliny oraz jej spożycie wraz z dietą

Cholina występuje w żywności w różnych formach chemicznych. Często jako kryterium podziału przyjmuje się zdolność do rozpuszczania w danym środowisku. Wyróżnia się formy choliny rozpuszczalne w wodzie (wolna cholina, fosfocholina, glicerofosfocholina) oraz te rozpuszczalne w tłuszczach (fosfatydylocholina, sfingomielina) (Patterson i in., 2008). Wszystkie formy choliny poza wolną choliną należą do postaci zestryfikowanych. Przyjmuje się, że fosfatydylocholina stanowi około 95% całkowitej ilości choliny, jaka występuje w tkankach zwierzęcych (Li & Vance, 2008). Co istotne wykazano, że w zależności od formy, różnie będzie przebiegał proces wchłaniania i metabolizmu tych związków. Po wchłonięciu, formy rozpuszczalne w wodzie docierają do wątroby poprzez krążenie wrotne, natomiast formy rozpuszczalne w tłuszczach po upakowaniu w chylomikrony transportowane są przez układ limfatyczny (Zeisel, 1981). Zwraca się również uwagę na fakt, że formy choliny spożywane w okresie niemowlęcym różnią się od tych spożywanych w okresie dorosłości. Jest to związane z różnicami w spożyciu pokarmów będących głównymi źródłami choliny - cholina zawarta w mleku matki występuje głównie w formie rozpuszczalnej w wodzie, natomiast w późniejszym okresie dominują formy rozpuszczalne w tłuszczach (Lewis i in.,

2015). Warto także wspomnieć, że wykazano iż mieszanki mleka modyfikowanego dla niemowląt na bazie soi charakteryzują się mniejszą zawartością choliny niż mleko kobiece, czy mieszanki na bazie mleka krowiego (Holmes-McNary i in., 1996).

Do najważniejszych źródeł choliny w diecie zalicza się jaja, mięso, ryby oraz pełnoziarniste produkty zbożowe. W 2008 r. Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych stworzył bazę danych zawartości choliny w różnych produktach spożywczych. Całkowita zawartość choliny w produktach pochodzenia zwierzęcego w przeliczeniu na jednostkę masy jest większa niż w przypadku produktów roślinnych. Dla przykładu wątroba wołowa - 330 mg/100 g, jaja - 251 mg/100 g, wieprzowina - 69 mg/100 g, będą zawierać kilkukrotnie więcej choliny niż awokado - 14,18 mg/100 g, pomidory - 6,70 mg/100 g czy cebula - 6,10 mg/100 g. Do ważnych źródeł choliny w diecie roślinnej należy jednak zaliczyć kielki pszenicy - 152 mg/100 g czy soję - ziarna 120 mg/100 g, które zawierają cholinę w ilościach zbliżonych do mięsa (Patterson i in., 2008). Opisując źródła choliny w diecie uwagę zwraca fakt braku takiej bazy danych dla produktów dostępnych na rynku europejskim. Szczególnie, że w ostatnich latach w Europie odnotowuje się wzrost popularności diet opartych na produktach pochodzenia roślinnego (Alcorta i in., 2021). Pomimo wspomnianych trendów badacze opisujący spożycie choliny w różnych populacjach odnotowują, że produkty odzwierzęce nadal stanowią ważne źródło choliny w diecie (Vennemann i in., 2015).

Opisując spożycie choliny z dietą należy zaznaczyć, że ze względu na niewystarczającą ilość danych jedyną wyznaczoną normą dla choliny jest norma na poziomie wystarczającego spożycia. Instytut Medycyny w Stanach Zjednoczonych wyznaczył normę AI dla choliny na poziomie 550 mg/d dla mężczyzn i 425 mg/d dla kobiet oraz 450 mg/d dla kobiet ciężarnych i 550 mg/d dla kobiet w trakcie laktacji (Institute of Medicine, 1998). Natomiast Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) w 2016 roku ustalił jako wystarczający poziom spożycia wartość 400 mg/d dla dorosłych (European Food Safety Authority, 2016). Obowiązujące w Polsce normy dla choliny opierają się i są zbieżne z danymi przedstawionymi przez amerykański Instytut Medycyny (Jarosz i in., 2020). Warto zaznaczyć, że zalecenia te zostały stworzone na podstawie jednego badania randomizowanego, w którym analizowano związek między spożyciem choliny, a stężeniem aminotransferazy alaninowej w osoczu (Zeisel & Da Costa, 2009). Fakt ten, jak i brak wyznaczonej normy na poziomie średniego zapotrzebowania (ang. *estimated average requirement*, EAR) są poważnymi ograniczeniami w badaniach opisujących pobranie choliny z dietą.

Pierwsze badanie dotyczące spożycia choliny z dietą wśród osób dorosłych opublikowano w 2005 roku w Stanach Zjednoczonych. Fisher i współpracownicy przeanalizowali spożycie choliny wśród 16 mężczyzn i 16 kobiet. Wynik wskazywał na pobranie tego składnika pokarmowego w ilości bliskiej wartościom ustalonym w ramach normy AI. Jednak badanie było przeprowadzone w ściśle kontrolowanych warunkach i nie odzwierciedlało w pełni zwyczajowego pobrania produktów będących źródłem choliny (Fischer i in., 2005). W kolejnych latach badanie *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) przeprowadzone w 2007 i 2008 roku na reprezentatywnej próbie populacji w USA wykazało, że średnie spożycie choliny wynosiło 396 mg/dzień w przypadku mężczyzn i 260 mg/dzień w przypadku kobiet. Zbliżone wartości dla średniego spożycia choliny odnotowywano w kolejnych edycjach badania NHANES (między 2009 a 2014 rokiem) (Wiedeman i in., 2018). Najnowsze dane dotyczą głównie Stanów Zjednoczonych i w krajów europejskich. W Europie w latach 2000-2012 średnie spożycie choliny wśród mężczyzn wahało się od 309 do 444 mg/dzień w różnych grupach wiekowych, podczas gdy wśród kobiet średnia spożycia mieściła się w zakresie od 244 do 404 mg/dzień (Vennemann i in., 2015). Po roku 2015 oceny spożycia choliny z dietą dokonano wśród wybranych grup populacji w Polsce (Malinowska i in., 2017; Młodzik-Czyżewska i in., 2022; Muzsik-Kazimierska i in., 2022), Norwegii (Van Parys i in., 2021, 2022), Niemczech (Roeren i in., 2022), Hiszpani (Redruello-Requejo i in., 2021), Rumunii (Prelicz & Lotrean, 2017), Belgii (Pauwels i in., 2017) i Wielkiej Brytanii (Moore i in., 2020), dla których to badań średnia spożycia wśród osób dorosłych wynosi 304 mg/dzień. W zdecydowanej większości tych badań spożycie choliny u osób dorosłych jest mniejsze niż 80% wartości normy AI przyjętej przez EFSA. Stosunkowo wysokie pobranie choliny w z dietą stwierdzono u zdrowych mężczyzn w Polsce, tj. 519 ± 280 mg/dzień (Młodzik-Czyżewska i in., 2022). W Stanach Zjednoczonych w ostatnich latach średnie spożycie choliny kształtuje się na poziomie 250-390 mg/dzień, przy czym wyższe wartości uzyskuje się w grupie mężczyzn (Wallace & Fulgoni, 2016, 2017; Zhang i in., 2024; Zhou i in., 2023). Biorąc pod uwagę różnice we wzorach żywienia podobne średnie wartości spożycia choliny z dietą opisano również w badaniach przeprowadzonych w Tajwanie (230mg/dzień dla kobiet i 284 mg/dzień dla mężczyzn) i Iranie (226mg/dzień dla osób dorosłych) (Cheng i in., 2017; Golzarand i in., 2022). W badaniu przeprowadzonym w Polsce i opublikowanym w 2022 roku wykazano nieodpowiednie spożycie choliny także wśród kobiet po menopauzie (Muzsik-Kazimierska i in., 2022). Badania obejmujące kobiety w ciąży także przedstawiają niskie poziomy spożycia choliny, raportowane są zakresy od

260 do 380 mg/dzień (Moore i in., 2020; Pauwels i in., 2017; Roeren i in., 2022; Staskova i in., 2023; Wiedeman i in., 2024). Ciekawe wyniki uzyskali niemieccy naukowcy, którzy ocenili spożycie choliny z dietą wśród kobiet w ciąży, które były na diecie wegetariańskiej lub wegańskiej, w porównaniu do kobiet ciężarnych spożywających również produkty odzwierzęce. Te pierwsze spożywały stosunkowo mniej choliny bo średnio 205 mg/dzień, natomiast druga grupa kobiet spożywała średnio 269 mg/dzień tego składnika pokarmowego (Roeren i in., 2022). Analizując spożycie choliny wśród najmłodszych, tj. niemowląt i dzieci w wieku 2-6 lat stwierdza się, że średnie wyniki są zbliżone lub przekraczają wartości normy AI w tych kategoriach wiekowych (Jafari i in., 2021; Prelicz & Lotrean, 2017; Probst i in., 2019; Wallace & Fulgoni, 2016, 2017).

2.1.3. Czynniki wpływające na zapotrzebowanie na cholinę

Podobnie jak w przypadku wszystkich składników odżywczych zapotrzebowanie na cholinę jest zależne od wieku, płci, stanu zdrowia i stylu życia. Wyższe wartości zalecanego spożycia przypisuje się mężczyznom niż kobietom, a także osobom dorosłym niż dzieciom, co jest związane z większą masą ciała, a tym samym większą intensywnością procesów metabolicznych zachodzących w organizmie. Wykazano jednak, że kobiety w ciąży i karmiące piersią powinny spożywać więcej tego składnika ze względu na fakt, iż cholina spożywana przez matkę jest wykorzystywana przez płód, a następnie niemowlę do prawidłowego rozwoju mózgu i układu nerwowego. Wpływ na zapotrzebowanie na cholinę ma również zwiększona aktywność fizyczna. Podczas wysiłku intensyfikacji ulegają procesy związane z funkcjonowaniem mięśni i metabolizmem energetycznym, w który cholina również jest zaangażowana. Zmienione zapotrzebowanie mają także osoby z chorobami wątroby, nerek lub zaburzeniami metabolicznymi. Ponadto wykazano, że wysoki poziom stresu może zwiększać zapotrzebowanie na cholinę ze względu na jej rolę w funkcjonowaniu układu nerwowego. Natomiast nadmierne spożycie alkoholu negatywnie wpływa na metabolizm choliny, również zwiększając zapotrzebowanie na nią (Institute of Medicine, 1998; Jarosz i in., 2020).

Poza wyżej wymienionymi wyżej czynnikami wykazano, że na zapotrzebowanie może wpływać także polimorfizm DNA. Jak dotąd udało się scharakteryzować polimorfizmy typu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) kilku genów odpowiedzialnych za metabolizm choliny. Zgodnie z definicją polimorfizm SNP to zjawisko zróżnicowania sekwencji DNA, polegające na zmianie jednego nukleotydu na inny w określonym miejscu w genomie (Zeisel & da Costa, 2009). W kontekście

metabolizmu choliny dobrze opisanym jest polimorfizm rs12325817 genu *PEMT* (ang. *phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase*), który odpowiedzialny jest za modyfikację miejsca w promotorze będącego elementem odpowiedzi na estrogeny, co wpływa na endogenną syntezę fosfatydylocholiny. Rezultatem tego jest sytuacja, w której kobiety z rzadziej występującym allelem C mają większe zapotrzebowanie na cholinę, na poziomie równym zapotrzebowaniu u mężczyzn (da Costa i in., 2006). Potwierdzeniem tego jest m.in. badanie przeprowadzone przez Fisher i współpracowników, którzy wykazali, że polimorfizm rs12325817 w genie *PEMT* wpływa na ryzyko wystąpienia dysfunkcji w obrębie wątroby i mięśni. Eksperyment polegał na sprawdzeniu czy kobiety w okresie prekonceptyjnym stosujące dietę o niskiej zawartości choliny w zależności od posiadanego genotypu *PEMT* będą wykazywać różnice w rozwoju potencjalnych zaburzeń pracy wątroby lub mięśni. Dodatkowo przeanalizowano wpływ diety o niskiej zawartości choliny w grupie kobiet po menopauzie otrzymujących estrogeny lub placebo. Badanie wykazało, że genotyp młodych kobiet w okresie prekonceptyjnym podczas niskiej podaży choliny powoduje różnice w ryzyku rozwinięcia się dysfunkcji wątroby i mięśni. Zaburzenia rozwinęły się bowiem u 80% kobiet z dwoma allelami C, 43% z jednym allelem C i u 13% kobiet nieposiadających tego allelu. Natomiast w grupie kobiet po menopauzie stosujących dietę o niskiej zawartości choliny, zaburzenia czynności badanych narządów wystąpiły u 73% tych, które przyjmowały placebo, natomiast tylko u 18% w grupie otrzymującej estrogeny. Wyniki te ukazują, że wpływ na zapotrzebowanie na cholinę z dietą ma również ilość estrogenów w organizmie (Fischer i in., 2010). Kolejnym polimorfizmem wpływającym na zapotrzebowanie na cholinę jest polimorfizm rs7946 w regionie kodującym genu *PEMT*. U osób z allelem T powoduje on istotne obniżenie aktywności enzymatycznej białka *PEMT*, co przekłada się na zmniejszenie poziomu endogennej syntezy fosfatydylocholiny (Song i in., 2005). Wpływ na zwiększenie zapotrzebowania na cholinę odnotowuje się także w przypadku polimorfizmu genów *MTHFD1*, tj. dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianu, rs2236225 oraz *CHDH* tj. dehydrogenazy choliny, w szczególności rs9001 i rs12676 (da Costa K. i in., 2006; Kohlmeier i in., 2005). Naukowcy zwracają uwagę na fakt, że częstość występowania poszczególnych wariantów allelicznych genów, również tych związanych z metabolizmem i wykorzystaniem składników odżywczych, jest różna w różnych populacjach. Jak wiadomo czynniki środowiskowe, tj. żywienie, wpływają na to jaki fenotyp (a przez to genotyp), jest najkorzystniejszy w określonych warunkach środowiskowych, co stanowi presję selekcyjną i wpływa na pulę alleli w populacji. Z tego względu sugeruje się,

że zapotrzebowanie na cholinę może różnić się między populacjami. W związku z tym zapotrzebowanie na cholinę jest kształtowane przez szereg interakcji między genotypem a środowiskiem (da Costa i in., 2014; Silver i in., 2015).

2.1.4. Funkcje biologiczne, metabolizm i endogenna synteza choliny

Rola choliny w ustroju została dobrze udokumentowana. W zależności od tego w jakiej postaci chemicznej występuje, pełni ona różne funkcje. Co najistotniejsze jest ona składnikiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek bowiem zapewnia integralność struktury błon komórkowych, wpływając tym samym na proces sygnalizacji komórkowej. U większości ssaków długotrwałe spożywanie diety z deficytem choliny, rozumiane jako okres od kilku tygodni do miesięcy, ma konsekwencje obejmujące zaburzenia pracy wątroby, trzustki, nerek, zdolności poznawczych i wzrostu (Zeisel & Blusztajn, 1994). Efekt ten jest większy, jeśli dieta zawiera dodatkowo niewielkie ilości folianów i metioniny (Zeisel, 2006).

Cholina jest podstawowym elementem układu cholinergicznego, jako prekursor acetylocholiny. Powstanie acetylocholiny polega na przyłączeniu acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) do choliny przy udziale enzymu acetylotransferazy cholinowej (Brown, 2019). Blusztajn i Wurtman już w 1983 roku spisali, że dostępność choliny i acetylo-CoA wpływa acetylo-CoA na aktywność acetylotransferazy cholinowej tym samym determinując szybkość syntezy acetylocholiny (Zeisel, 2006). Związek ten jest neuroprzekaźnikiem w przedzwojowych zakończeniach cholinergicznym i adrenergicznym, zakończeniach ruchowych oraz strukturach mózgowia, który odpowiada za prawidłowe działanie wielu tkanek i narządów, m.in. powoduje skurcze mięśni gładkich, wpływa na rozszerzenie naczyń krwionośnych czy pobudzenie mięśni szkieletowych, ale także oddziałuje na funkcje wydzielnicze gruczołów (Picciotto i in., 2012).

Po utlenieniu do betainy, cholina staje się także donorem grup metylowych, wykorzystywanych do metylacji wielu związków chemicznych, w tym DNA. Proces utleniania jest dwuetapowy z udziałem enzymu dehydrogenazy cholinowej, zachodzi głównie w wątrobie i nerkach oraz - co istotne - jest reakcją nieodwracalną. Z tego względu reakcja utleniania choliny zmniejsza jej dostępność w tkankach. W tym miejscu warto wspomnieć też, że metabolizm choliny jest ściśle związany z cyklem przemian witamin z grupy B oraz metioniny, które zalicza się do szlaków metabolizmu grup jednowęglowych (ang. *one-carbon metabolism*, OCM). Drogi te krzyżują się bowiem w momencie metylacji homocysteiny i syntezy metioniny, w których udział bierze grupa metylowa oddana przez

betainę. W związku z tym ryzyko niedoboru choliny wzrasta w przypadku niedostatecznej podaży folianów lub metioniny. Dlatego badacze przyjmują, że zapotrzebowanie na cholinę wraz z dietą należy rozpatrywać w połączeniu z wspomnianymi wcześniej składnikami odżywczymi (Ueland, 2011; Ueland i in., 2005).

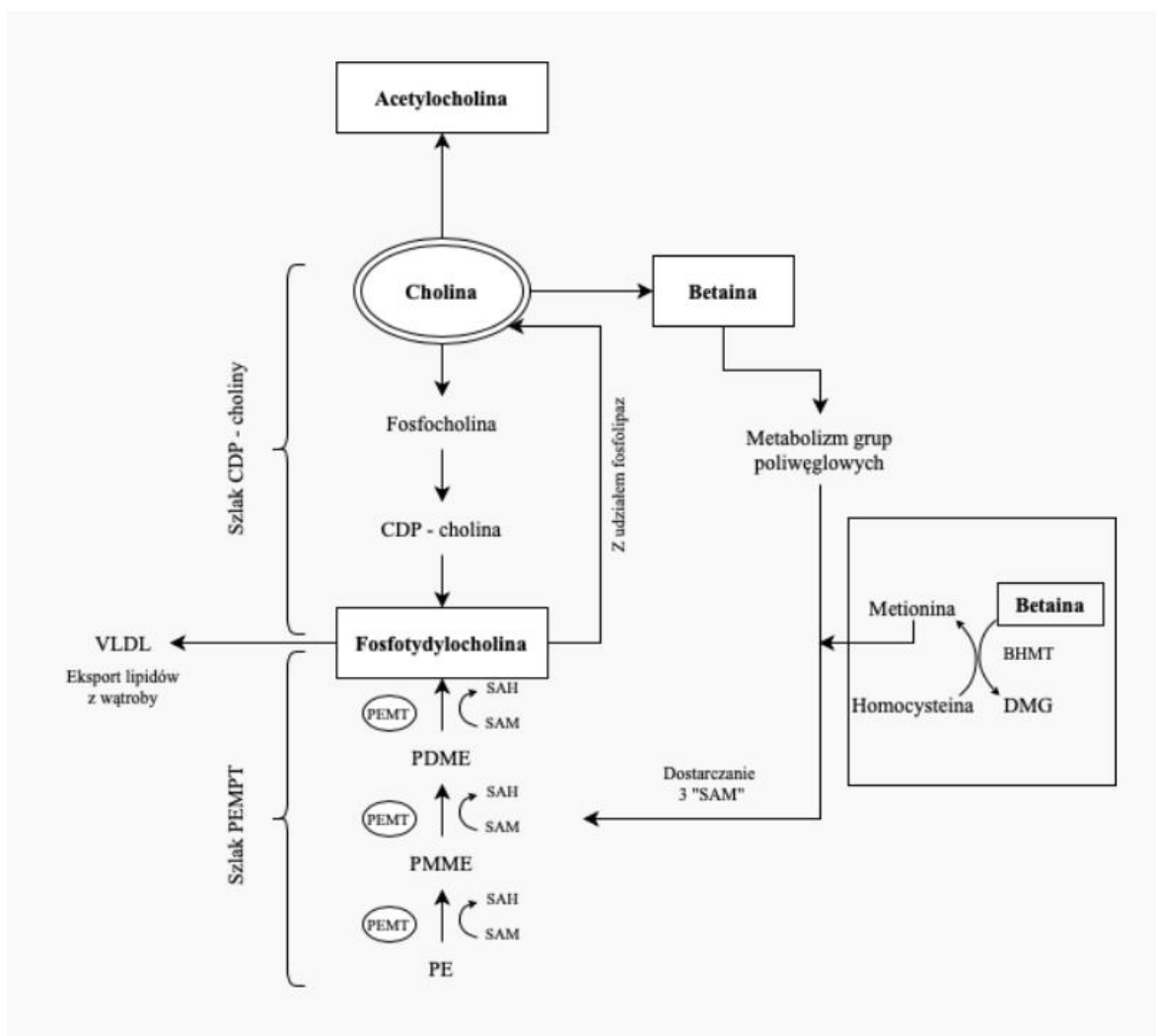
Niezwykle ważna w kontekście niniejszej pracy jest funkcja choliny związana z transportem lipidów z wątroby. Jako fosfatydylocholina jest ona niezbędna do syntezy cząsteczek lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low density lipoprotein*, VLDL), tj. stanowi kluczowy element strukturalny otoczki fosfolipidowej tej cząsteczki, tym samym stabilizując ją i umożliwiając transport w osoczu krwi. Proces syntezy VLDL odbywa się w hepatocytach i polega na upakowaniu dostępnych triacylogliceroli (TG), estrów cholesterolu i wspomnianej fosfatydylocholiny oraz apolipoproteiny w jedną cząsteczkę. Następnie są one uwalniane do krwioobiegu, gdzie w kolejnych etapach następuje hydroliza zawartych w VLDL TG do kwasów tłuszczowych i ich wychwyt przez komórki docelowe, gdzie służą jako źródło energii lub są magazynowane w tkance tłuszczowej (Janero i in., 1984; Vance & Vance, 1985). Endogenna synteza fosfatydylocholiny nie zawsze jest w stanie zapewnić odpowiednią ilość potrzebną do prawidłowego funkcjonowania organizmu, przez co niedobór choliny bezpośrednio wpływa na proces akumulacji lipidów w wątrobie (Zeisel, 2006).

Biosynteza fosfatydylocholiny zachodzi dwoma szlakami. W pierwszym z nich (szlak CDP-choliny) cholina jest poddana fosforylacji do fosfocholiny przy udziale kinazy cholinowej. Następnie jest ona przekształcana do CDP-choliny przez cytydylotransferazę fosfocholinową. W kolejnym etapie CDP-cholina jest łączona z diacyloglicerolem przez enzym syntazę fosfatydylocholiny, tworząc fosfatydylocholinę. W drugim szlaku PEMT fosfatydyloetanoloamina jest sekwencyjnie metylowana z wytworzeniem fosfatydylocholiny, przy użyciu S-adenozylometioniny jako donora metylu (Zeisel & da Costa, 2009). Szacuje się, że szlak CDP-choliny odpowiada za syntezę około 70% fosfatydylocholiny w wątrobie, podczas gdy szlak PEMT za około 30% (van der Veen i in., 2017). Przy czym w ostatnich latach wykazano, że fosfatydylocholina uzyskiwana z tych dwóch szlaków różni się co do składu kwasów tłuszczowych, przez co formy te mogą być inaczej wykorzystywane przez organizm (Wiedeman i in., 2018).

Szlak PEMT, rozpatruje się również w kontekście endogennej syntezy choliny. Jak wiadomo cholina dostarczana jest do organizmu człowieka wraz z pożywieniem, ale pewne jej ilości syntetyzowane są *de novo* właśnie w ramach tego szlaku, połączonego z procesem katabolizmu fosfatydylocholiny (Li & Vance, 2008). Szlak PEMT przebiega przede

wszystkim w wątrobie i jest regulowany przez enzym zwany metylotransferazą fosfatydyloetanoloaminy. Jest on białkiem kodowanym przez gen o tej samej nazwie. Kluczowym jest fakt, iż poziom ekspresji genu *PEMT*, a tym samym efektywność wytwarzania fosfatydylocholiny, zależy od stężenia estrogenów. Promotor tego genu zawiera bowiem element odpowiedzi na estrogen (ang. *estrogen response element*, ERE) (Li i in., 2023; Resseguie i in., 2007). Wykazano to, na podstawie obserwacji, zgodnie z którymi kobiety w wieku rozrodczym są stosunkowo mniej wrażliwe na niedobór choliny w diecie w porównaniu z kobietami po menopauzie oraz mężczyznami, u których poziom estrogenów w organizmie jest niższy (Zeisel, 2006). Drugim etapem endogennej syntezy choliny jest katabolizm powstałej fosfatydylocholiny, który odbywa się przy udziale fosfolipaz. Związki te pełniąc rolę enzymów są odpowiedzialne za hydrolizę wiązań estrowych w cząsteczce fosfatydylocholiny, prowadząc do uwolnienia choliny w formie wolnej. Jednym z tych enzymów jest fosfolipaza D (PLD), która katalizuje proces rozkładu fosfatydylocholiny na cholinę oraz kwas fosfatydowy. Znane i opisane są również fosfolipaza C (PLC) oraz fosfolipaza A2 (PLA2), które poprzez hydrolizę wspomnianej wcześniej fosfatydylocholiny doprowadzają do powstania odpowiednio fosfocholiny i lizofosfatydylocholiny. Te związki natomiast ulegają w następnym etapie specyficznym reakcjom, również doprowadzając do powstania wolnej choliny, która może zostać ponownie wykorzystana w szeregu procesach biochemicznych (van der Veen i in., 2017).

Najważniejsze opisane powyżej zagadnienia związane z metabolizmem choliny przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Główne szlaki metaboliczne związane z choliną (na podstawie Li & Vance, 2008; Radziejewska i in., 2020).

PE – fosfatydyloetanolaminy; PMME – fosfatydylomonometyloetanolamina; PDME – fosfatydylodimetyloetanolamina; SAM – S-adenozylometionina; SAH – S-adenozyl-L-homocysteina; BHMT - metylotransferaza betainowo-homocysteinowa; DMG - dimetyloglicyna

Biorąc pod uwagę różne postaci choliny i pełnione przez nie funkcje warto też wspomnieć, że cholina jest kluczowym składnikiem pokarmowym dla kobiet w ciąży. Duże ilości choliny produkowane są w łożysku, gdzie pełni ona rolę cząsteczki sygnałowej odpowiedzialnej za różnicowanie i proliferację komórek. Zwiększone zapotrzebowanie na cholinę w czasie ciąży wynika m.in. z tego, że fosfatydylocholina jest niezbędna dla

prawidłowej biogenezy błon oraz podziałów komórkowych, a acetylocholina odpowiada za prawidłową neurogenezę, formowanie synaps i rozwój mózgu. Cholina wpływa na rozwój mózgu i cewy nerwowej również poprzez regulację różnicowania, proliferacji i apoptozy komórek (Caudill, 2010; Jaiswal i in., 2023).

Opisując metabolizm choliny należy również wspomnieć o kwestiach dotyczących jej absorpcji i transportu w ustroju (Michel i in., 2006). Cholina jest wchłaniana w górnym odcinku jelita cienkiego na zasadzie dyfuzji ułatwionej, poprzez specyficzne transportery umiejscowione w enterocytach. Głównym transporterem biorącym udział w tym procesie jest białko CTL1. Co interesujące wykazano, że transporter ten nie jest specyficzny tkankowo i ulega także ekspresji w wielu innych tkankach. Wchłanianie choliny i jej dalsze losy zależą od tego w jakiej konkretnej postaci chemicznej występuje, bowiem dla form rozpuszczalnych w wodzie zachodzi ono inaczej niż w przypadku form rozpuszczalnych w tłuszczach. Przykładowo fosfatydylocholina jest prawie całkowicie wchłaniana w jelicie cienkim (90%) i szybko pojawia się w erytrocytach oraz jako składnik lipoprotein (Radziejewska & Chmurzynska, 2019). Cholina, która nie zostanie wchłonięta w świetle jelita, może zostać zmetabolizowana przez mikrobiotę jelitową do trimetyloaminy, która następnie zostaje utleniona w wątrobie do N-tlenku trimetyloaminy. Jak wiadomo podwyższone stężenia tlenu trimetyloaminy w osoczu są dodatnio skorelowane z ryzykiem wystąpienia zaburzeń sercowo naczyniowych (Tang i in., 2013; Thomas & Fernandez, 2021). Opisując transport komórkowy choliny należy przypomnieć, że jest ona cząsteczką naładowaną dodatnio, przez co do skutecznego przeniesienia przez błonę lipidową wymagany jest mechanizm białkowy. W transporcie tym uczestniczy kilka typów białek, które można podzielić na dwa rodzaje tj. białka transportowe o niskim powinowactwie, które zależne są od jonów Na^+ i Cl^- oraz białka wysokim powinowactwie przy mniejszej zależności od jonów Na^+ . Wydaje się, że istotną rolę w całym tym procesie odgrywają trzy rodziny białek tj.:

- CHT (zaangażowane w procesy regulowane przez acetylocholinę w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym),
- OCT (transportery kationów organicznych, ulegają ekspresji w jelicie cienkim, wątrobie, nerkach, sercu, łożysku, płucach i mózgu),
- CTL (w tym białko CTL1, występujące powszechnie w ustroju, w tym w okrężnicy, żołądku, tarczycy, mózgu i łożysku) (Radziejewska & Chmurzynska, 2019).

2.2. Proces gromadzenia lipidów w wątrobie

2.2.1. Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby

NAFLD to najczęściej diagnozowane przewlekłe schorzenie wątroby. Zgodnie z przyjętą definicją choroba ta wiąże się ze stłuszczeniem wątroby potwierdzonym w badaniu histologicznym lub obrazowym (Pafili & Roden, 2021). Chorobę tę stwierdza się kiedy inne czynniki wywołujące stłuszczenie zostają wykluczone, a należą do nich choroby o podłożu genetycznym, przewlekłe spożycie leków wpływających na pracę wątroby, nadużywanie alkoholu, zakażenie wirusem *hepatitis C* lub autoimmunologiczne choroby wątroby (York i in., 2009). Rozwój NAFLD jest silnie powiązany z zespołem metabolicznym, o czym świadczy fakt, że u około 90% pacjentów z NAFLD występuje więcej niż jedna cecha zespołu metabolicznego, a około 33% spełnia trzy lub więcej kryteriów (Almeda-Valdes i in., 2009). W większości przypadków chorobie tej towarzyszy dyslipidemia, cukrzyca typu 2 lub otyłość brzuszna. Niektórzy badacze określają przez to niealkoholowe stłuszczenie wątroby jako wątrobową manifestację zespołu metabolicznego (Hartleb i in., 2019).

Różne grupy ekspertów jako pojęcie „niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby” definiują szerokie spektrum nieprawidłowości stosując podział na dwie lub więcej jednostek chorobowych. Najczęściej wymienia się stłuszczenie wątroby bez współistniejącego procesu zapalnego i/lub włóknienia (NAFL – niealkoholowe stłuszczenie wątroby) oraz niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby z procesem uszkodzeniowym (ang. *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), którego powikłaniem może być postępujące włóknienie, powodujące marskość wątroby (cirrhosis-NAFLD) z potencjalnym wystąpieniem raka wątrobowokomórkowego. Badanie mikroskopowe prostego stłuszczenia jakim jest NAFL, daje obraz bez cech uszkodzenia hepatocytów, z różnym poziomem akumulacji kropeł lipidowych. W przypadku NASH oprócz cech stłuszczenia stwierdza się obecność ciałek Mallory’ego oraz różne stadia zmian zapalnych, cech zwłóknienia, czy marskości (Younossi i in., 2016).

Obecnie ocenia się, że NAFLD występuje u około 25% populacji światowej, natomiast częstość występowania jej wśród mieszkańców krajów europejskich to 20-30%. Różnice w szacunkach wynikają z faktu, że zaburzenie to ma zwykle bezobjawowy przebieg i jest rozpoznawane przypadkowo, podczas innego rodzaju badań. Pacjenci z NAFLD skarżą się niekiedy na bóle w prawym podżebrzu lub uczucie permanentnego zmęczenia. Z tego względu zdarza się, że choroba jest diagnozowana w stadium

zaawansowanym, gdy pojawiają się objawy świadczące o marskości. Należy zaznaczyć, że dostępne dane epidemiologiczne wskazują na podwyższone ryzyko wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych u chorych z NAFLD, które stanowią również główną przyczynę zgonów w tej grupie pacjentów (Mach, 2007).

Diagnostyka NAFLD opiera się na biopsji wątroby, która jest „złotym standardem” w szeregu innych badań. Dzięki niej możliwe jest określenie przyczyny i stopnia zaawansowania zaburzenia, tj. ocenia się poziom stłuszczenia i włóknienia z zastosowaniem dwóch skal, NAS (ang. *NAFLD Activity Score*) oraz SAF (ang. *Steatosis, Activity, Fibrosis*). Biorąc pod uwagę fakt, że biopsja wiąże się z naruszeniem ciągłości tkanek, w wielu przypadkach wstępne rozpoznanie choroby dokonuje się z zastosowaniem metod diagnostyki nieinwazyjnej. Należą do nich przede wszystkim ultrasonografia (USG), rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) oraz elastografia metodą fibroscan wraz z pomiarem stopnia stłuszczenia wątroby (Rajewski i in., 2020). W zaleceniach Polskiej Grupy Ekspertów NAFLD z roku 2019 opisano, że zgodnie z dostępnymi danymi i brakiem potencjalnych korzyści nie zaleca się badań przesiewowych w kierunku stłuszczenia wątroby na poziomie całej populacji. Rekomenduje się natomiast przeprowadzenie badania USG wątroby u osób z otyłością, podwyższonym stężeniem ALAT lub zdiagnozowanymi wcześniej cechami zespołu metabolicznego. Co istotne otyłości nie należy rozpatrywać jako jedynego kryterium przekładającego się na diagnostykę NAFLD, ponieważ zaburzenie to może występować też u osób z nadwagą lub o prawidłowej masie ciała (Hartleb i in., 2019).

W przypadku pacjentów ze zdiagnozowanym NAFLD, u których występuje ryzyko współistnienia np. stanów przedcukrzycowych, zwraca się uwagę i zaleca badanie poziomu glukozy na czczo i doustnego testu obciążenia glukozą. Ze względu na częste połączenie NAFLD z zespołem metabolicznym zaleca się również wykonywanie u chorych badań w kierunku miażdżycy (Hartleb i in., 2019). Jeśli chodzi o stężenia aminotransferaz wątrobowych wśród chorych na NAFLD, często obserwuje się przewlekłe lub okresowe podwyższenia. Jednakże zauważono, że poziomy tych enzymów wykazują słabą korelację z rzeczywistym obrazem histopatologicznym wątroby. Oznacza to, że prawidłowe wartości biomarkerów nie gwarantują niewystępowania NASH ani włóknienia wątroby, a u części pacjentów z podwyższoną aktywnością aminotransferaz, biopsja wątroby nie wykazuje charakterystycznych cech NASH (Fischer i in., 2010). Co więcej, istnieją sugestie, że obowiązujące normy dla ALAT mogą być zbyt wysokie (Kariv i in., 2006).

Ze względu na brak ustalonych schematów leczenia farmakologicznego tej jednostki chorobowej podstawowym zaleceniem jest wprowadzenie odpowiedniej diety, uwzględniającej potencjalną redukcję masy ciała oraz dostosowaną do możliwości aktywność fizyczna. Szczególną uwagę należy zwrócić na ograniczenie spożycia alkoholu oraz produktów będących źródłami tłuszczów nasyconych, cukrów prostych, cholesterolu. W przypadku NAFLD często polecane jest stosowanie diety śródziemnomorskiej. Prowadzi się również wiele badań w kierunku oceny wpływu różnych składników żywności na wspomaganie procesu leczenia stłuszczenia wątroby. Pozytywne działanie wykazuje spożycie m.in. kofeiny, kwasu foliowego, izoflawonów sojowych, resweratrolu i kwercetyny. Szczególną uwagę zwraca się również na podjęcie leczenia jednostek współistniejących u pacjentów z NAFLD, dzięki czemu zmniejsza się ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych, a tym samym potencjalną śmiertelność (Dongiovanni i in., 2016; Dyson i in., 2014). Mimo braku ukierunkowanego postępowania farmakologicznego pacjentom z NAFLD podaje się niekiedy witaminę E i pioglitazon, a także kwas ursodezoksycholowy. Przypisuje się im pozytywny wpływ na poziom stłuszczenia oraz stan zapalny, jednak nie odnotowuje się działania na włóknienie. Korzystne działanie tych związków nie jest jednak raportowane u wszystkich pacjentów, którym zostają wdrożone, do tego brakuje informacji na temat bezpieczeństwa dłuższego okresu stosowania (Rajewski i in., 2020).

Stosunkowo niewiele dostępnych jest danych dotyczących występowania NAFLD u dzieci. Jednak we wspomnianym wcześniej stanowisku ekspertów z 2019 r. podkreśla się potrzebę wykonywania badań przesiewowych w kierunku stłuszczenia wątroby u dzieci powyżej 9 r.ż. ze stwierdzoną otyłością, lub u młodszych w przypadku odnotowywania innych czynników ryzyka. Diagnostyka powinna opierać się na badaniu USG wątroby, oznaczeniu poziomu ALAT oraz ocenie czynników ryzyka (Hartleb i in., 2019).

2.2.2. Patomechanizm stłuszczenia wątroby

Stłuszczenie wątroby definiuje się jako nadmierne gromadzenie kropeł lipidowych (głównie TG) w hepatocytach, spowodowane zachwianiem proporcji pomiędzy ilością lipidów transportowanych do wątroby lub powstających w niej *de novo*, a ich wydzielaniem w formie lipoprotein VLDL. Organ ten nie spełnia funkcji magazynowej dla tłuszczów, dlatego obieg TG jest ciągły, a ich zawartość w komórkach niewielka. Stłuszczenie opisuje się zatem jako zaburzenie w prawidłowym funkcjonowaniu wątroby, które niesie za sobą szereg konsekwencji. W klasyfikacji medycznej stan ten charakteryzuje się szerokim

spektrum objawów, które całościowo określa się jako niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby. Za warunki fizjologiczne przyjmuje się zawartość lipidów w wątrobie na poziomie 3-5% masy wątroby. NAFLD charakteryzuje się nagromadzeniem tłuszczu na poziomie przekraczającym 5% (niektóre źródła przyjmują zakres 5-10%) masy tego narządu (Bondini i in., 2007; Puri & Sanyal, 2012). Stłuszczenie wątroby wywołuje proces zapalny, który w dalszej progresji może doprowadzić do NASH, marskości wątroby oraz nowotworu wątrobowokomórkowego (Dietrich & Hellerbrand, 2014). W początkowych stadiach zaburzenia w obrazie histologicznym pojawia się stłuszczenie drobnokropelkowe, następnie krople lipidów zwiększają się wraz z powiększeniem hepatocytów, jednak nie dochodzi do ich uszkodzenia. Zwiększenie stężeń markerów biochemicznych wskazujących na uszkodzenie komórek, do których należą do nich przykładowo stężenia aminotransferaz we krwi, pojawia się w kolejnych etapach, (Aly & Kleiner, 2011).

Patogeneza NAFLD jest wieloczynnikowa i powiązana z procesami obejmującymi nieprawidłowości w metabolizmie tkanki tłuszczowej, stan zapalny, stres oksydacyjny, dysfunkcję mitochondriów i zaburzenia równowagi mikrobioty jelitowej. Ze względu na złożoność mechanizmu tego zaburzenia przyjmuje się obecnie podejście określane jako „hipotezę wielu trafień” (ang. *multiple hits hypothesis*). (Buzzetti i in., 2016). Podstawą tej hipotezy jest wystąpienie insulinooporności, czyli zmniejszonej wrażliwości tkanek na działanie insuliny, której konsekwencją jest podwyższone stężenie glukozy we krwi obwodowej oraz zwiększona w celach kompensacyjnych produkcja insuliny. Konsekwencją takiego stanu jest hiperglikemia, stymulacja glukoneogenezy oraz hiperinsulinemia, która to jest czynnikiem pobudzającym lipogenezę wątrobową i tym samym zwiększenie ilości kwasów tłuszczowych w wątrobie, przy równoczesnym spowolnieniu β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Nie bez znaczenia jest również dieta i spożycie nadmiaru kalorii pod postacią tłuszczów i węglowodanów prostych (Bugianesi i in., 2010). Insulinooporność wpływa także na wytwarzanie cytokin prozapalnych w tkance tłuszczowej oraz intensyfikację w niej lipolizy, co prowadzi do uwolnienia wolnych kwasów tłuszczowych dostępnych do późniejszego wychwytu przez wątrobę (Guilherme i in., 2008). Wszystkie te procesy odpowiadają za odkładanie się TG w komórkach wątroby, a to skutkuje dysfunkcją mitochondriów oraz retikulum endoplazmatycznego. Następstwem uszkodzeń komórkowych jest podwyższenie stężenia reaktywnych form tlenu, tym samym wystąpienie stresu oksydacyjnego (Cusi, 2009).

Badacze wśród istotnych przyczyn stłuszczenia wymieniają wzmożony wychwyt kwasów tłuszczowych przez komórki wątroby. Wykazano, że pacjenci z NAFLD

charakteryzują się wyższym stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu, co stanowi potwierdzenie hipotezy o nasilonej lipolizie w tkance tłuszczowej. Donnelly i in. prowadząc badanie na grupie osób z NAFLD wykazali, że około 60% TG zmagazynowanych w wątrobie pochodzi z krążących na obwodzie wolnych kwasów tłuszczowych (Donnelly i in., 2005). Istotnym w tej kwestii jest także fakt, iż na tempo wchłaniania kwasów tłuszczowych do komórek wpływa stężenie tych związków w osoczu oraz zdolność absorpcyjna hepatocytów (Bradbury, 2006). Mechanizm wchłaniania wolnych kwasów tłuszczowych opiera się na białkach transportujących obecnych w błonach komórkowych, spełniających rolę receptorów. Należą do nich: translokaza kwasów tłuszczowych (FAT/CD36), białko transportujące kwasy tłuszczowe (FATP) oraz białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABP). Najlepiej scharakteryzowanym mechanizmem regulacji ekspresji wspomnianych białek jest szlak opisany dla białka CD36. Działanie receptora uzależnione jest od stężenia insuliny, ale także czynników transkrypcyjnych PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor* - receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów) (Gimeno, 2007).

Warto również wspomnieć, że lipogeneza wątrobową regulowana jest przez czynniki transkrypcyjne, m.in. białko wiążące sterolowy element regulatorowy (SREBP-1), białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (ChREBP) oraz PPAR. SREBP-1 występuje pod postacią trzech izoform, jedna z nich - SREBP-1c reguluje aktywację lipogenezy i co istotne, wpływ na jej ekspresję ma insulina. Podobnie ChREBP zwiększa poziom lipogenezy i jest aktywowany przez insulinę. Jednak niezależnie od mechanizmu, wśród pacjentów z NAFLD obserwuje się zwiększony poziom lipogenezy w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną oraz podwyższone stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu (Buzzetti i in., 2016).

W ostatnich latach wykazano także, że dysbioza, czyli zachwianie równowagi w profilu bakteryjnym jelit przyczynia się do uszkodzenia bariery jelitowej i zwiększonej przepuszczalności jelita cienkiego. Konsekwencją tego stanu jest przenikanie do krążenia wrotnego endotoksyn bakteryjnych, tj. lipopolisacharydy. W wątrobie składniki te aktywują komórki biorące udział w reakcjach immunologicznych, m.in. komórki Kupffera-Browicza co prowadzi do uwolnienia cytokin prozapalnych tj. IL-6 oraz TNF- α (Miele i in., 2009). Mikrobiota jelitowa bierze również udział w fermentacji błonnika pokarmowego, co prowadzi do produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), tj. kwas masłowy, propionowy i octowy. Choć wykazuje się korzystne działanie SCFA na organizm, dysbioza może prowadzić do zmienionej produkcji tych kwasów

i powodować zwiększenie poziomów propionianu i octanu, podczas gdy poziom maślanu, który wykazuje działanie przeciwzapalne i jest głównym źródłem energii dla komórek jelitowych, może się zmniejszać (Topping & Clifton, 2001). Innym mechanizmem, poprzez który upatruje się wpływu mikrobioty jelitowej na występowanie NAFLD jest jej oddziaływanie na metabolizm kwasów żółciowych, skutkujące zmianą aktywności receptora farnesoidu X (FXR), który bierze udział w procesie lipogenezy wątrobowej i eksportu VLDL (Tremaroli & Bäckhed, 2012).

Predyspozycje do rozwoju NAFLD zależą też od czynników genetycznych, konkretnie polimorfizmu genów związanych z metabolizmem wolnych kwasów tłuszczowych oraz produkcją cytokin prozapalnych i aktywacją stresu oksydacyjnego. Analizy genomu osób ze zdiagnozowanym stłuszczeniem wątroby wskazują, że istotne znaczenie w progresji zaburzenia pełnią geny *PNPLA3* oraz *TM6SF2*. Pierwszy z nich koduje białko, które odpowiada m.in. za hydrolizę TG w komórkach hepatocytów oraz remodelowanie fosfolipidów w kroplach lipidowych, co jest istotne dla prawidłowego metabolizmu lipidów w wątrobie. Polimorfizm rs738409 tego genu powoduje upośledzenie tych aktywności i gromadzenie kropli lipidowych w komórkach wątroby, tym samym zwiększając poziom stłuszczenia oraz przyspieszając proces włóknienia narządu (Anstee & Day, 2013; Dongiovanni i in., 2015; Pessayre & Fromenty, 2005). Natomiast polimorfizm rs58542926 genu *TM6SF2* odpowiada za podwyższone stężenie ALAT oraz zmniejszone wydzielanie VLDL z wątroby (Kozlitina i in., 2014).

Mnogość szlaków metabolicznych biorących udział w powstawaniu stłuszczenia wątroby powoduje, że patomechanizm tego zaburzenia pozostaje niejasny. Poszczególne ścieżki sygnalizacyjne oddziałując wzajemnie na siebie bywają powodem nieścisłości w uzyskiwanych wynikach różnych doświadczeń, uwidaczniając potencjalne nowe drogi w prowadzeniu kolejnych badań. Warte podkreślenia jest to, że stworzona wcześniej „hipoteza dwóch trafień” (ang. *two-hits hypothesis*) jest obecnie uznawana za przestarzałą, gdyż nie uwzględnia wszystkich manifestacji metabolicznych oraz zmian na poziomie molekularnym, jakie obserwuje się u pacjentów z NAFLD. Do tego należy wspomnieć, że dotychczas panujące przekonanie, iż wystąpienie stłuszczenia zawsze poprzedza zapalenie wątroby jest dyskutowane. Analizując coraz dokładniej szersze grono pacjentów dowiedziono, że NASH może wystąpić bez wcześniejszego stłuszczenia jako efekt czynników epigenetycznych i zdarzeń wewnątrzkomórkowych (Buzzetti i in., 2016).

2.2.3. Metabolizm grup jednowęglowych a NAFLD

Wspomniany już w pracy metabolizm grup jednowęglowych jest terminem opisującym szlaki metaboliczne, obejmujące cykle metioniny i folianów, w których następuje przenoszenie jednostek jednowęglowych tj. grupy metylowe, metylenowe, formylowe i wykorzystywanie ich do różnych procesów komórkowych, w tym syntezy aminokwasów, DNA czy fosfolipidów (Mentch & Locasale, 2016). Metionina dostarczana jest do organizmu wraz z dietą, ale jej dostępność zależy także od katabolizmu białek oraz wydajności remetylacji homocysteiny, która uzależniona od ilości 5-metylotetrahydrofolianu (powiązanie cyklu metioniny z cyklem kwasu foliowego) lub betainy pochodzącej z choliny. Dostępna metionina może zostać przekształcona w S-adenozylometioninę (SAM), która stanowi uniwersalny donor metylowy do wspomnianych powyżej reakcji (Radziejewska i in., 2020).

Pierwszym i najważniejszym połączeniem OCM i NAFLD jest synteza VLDL i eksport lipidów z wątroby, w których pośredniczy cholina i S-adenozylometionina (SAM) – rycina 1. Jak wspomniano już w niniejszej pracy, do produkcji cząsteczek VLDL niezbędna jest fosfatydylocholina. Może ona pochodzić ze szlaku CDP-choliny, w których substratem jest cholina, ale także może być syntetyzowana poprzez szlak PEMT, który wykorzystuje w przemianie fosfatydyloetanolaminy do fosfatydylocholiny trzy grupy metylowe pochodzące z SAM, a więc dostarczane do procesu dzięki OCM (Fernández-Ramos i in., 2022).

W badaniach na modelach zwierzęcych, zarówno genetycznych jak i indukowanych dietą wykazano, że zmiany w OCM są powiązane z metabolizmem lipidów i procesami zachodzącymi w wątrobie. Zauważono bowiem, że duże spożycie tłuszczu z dietą wywołuje NAFLD i negatywnie wpływa na parametry związane z OCM, ale także deficyt w diecie substratów wykorzystywanych w OCM indukuje stłuszczenie wątroby. Wynika to z faktu, iż w przypadku niedoboru folianów lub metioniny zmniejsza się dostępność grup metylowych wykorzystywanych w opisanej wcześniej metylacji fosfatydyloetanolaminy do fosfatydylocholiny. To z kolei prowadzi do upośledzenia produkcji VLDL, a tym samym gromadzenia lipidów w komórkach wątroby. W odwrotnej sytuacji, tj. przy zwiększonym spożyciu tłuszczów konieczne jest zwiększenie wytwarzania VLDL, w syntezie których pośrednio udział biorą grupy metylowe. Ich intensywne wykorzystanie w tych celach zmniejsza pulę konieczną do cyklu metioninowego, a tym samym zaburza produkcję np. cysteiny lub remetylacji homocysteiny, podnosząc poziom homocysteiny

w ustroju. Pogribny i in. w swoich badaniach wykazali, że myszy genetycznie modyfikowane w kierunku zmniejszenia ekspresji enzymów biorących udział w OCM są bardziej podatne na stłuszczenie. Całość stanowi potwierdzenie, że w opisywanych procesach istotną rolę spełniają nie tylko czynniki genetyczne, ale również środowiskowe, tj. dieta (da Silva i in., 2020; Pogribny i in., 2013).

Jednym z modeli *in vivo*, które wykorzystuje się w badaniach dotyczących związku między OCM, a NAFLD jest zastosowanie u zwierząt diety z niedoborem metioniny i choliny (ang. *methionine and choline deficient*, MCD). Mimo pojawiających się krytycznych uwag co do stosowania takiego schematu (ze względu na niewystępowanie otyłości u zwierząt karmionych taką dietą, a wręcz pojawiającą się utratę masy ciała oraz niewykazywanie insulinooporności), wskazuje się, że cechy fenotypowe oraz aktywowane szlaki metaboliczne są bardzo zbliżone do tych obserwowanych u pacjentów z NAFLD (Machado i in., 2015; Rinella & Green, 2004). W badaniu przeprowadzonym przez Rizki i in. myszy karmione dietą z niedoborem metioniny wykazywały mniejszą aktywność enzymu SCD-1, zaangażowanego w metabolizm TG. Jak wiadomo ich nieprawidłowa synteza również jest przyczyną akumulacji tłuszczu w hepatocytach (Rizki i in., 2006). W innym badaniu szczury spożywające dietę deficytową w metioninę i cholinę rozwinęły wyższy poziom stłuszczenia wątroby z elementami świadczącymi o procesie zapalnym w porównaniu z grupą przyjmującą karmę niedoborową wyłącznie w cholinę, u których stłuszczenie było mniejsze, a proces zapalny nie był obserwowany (Veteläinen i in., 2007). Walkey i in. wykazali, że u myszy z genetyczną inaktywacją (ang. *knockout*) genu *Pemt* (-/-), które spożywały dietę z niedoborem choliny już po 3-4 dniach obserwowano zaburzenia pracy wątroby. Wynikało to ze znacznego zmniejszenia ilości fosfatydylocholiny w wątrobie i osoczu oraz wzrostu stężenia TG (Walkey i in., 1998). Podobne wyniki uzyskiwane są także w badaniach z udziałem ludzi. Zeisel i in. już w 1991 r. opisali, że spożywanie diety z deficytem choliny przez zdrowych ochotników już po 3 tygodniach powodowało znaczne obniżenie poziomów choliny w ustroju oraz pojawienie się początkowych oznak stłuszczenia wątroby (Zeisel i in., 1991).

Jak wspomniano OCM i NAFLD wzajemnie na siebie wpływają, o czym świadczą też badania oceniające te powiązania od drugiej strony, tj. u zwierząt, które karmiono dietą o wysokiej zawartości tłuszczu w celu indukcji stłuszczenia obserwuje się niższe stężenie SAM niż w grupie spożywającej dietę o prawidłowej zawartości tłuszczu. Poziomy SAM mogą być normalizowane poprzez suplementację choliną lub betainą (Deminice i in., 2011). W doświadczeniu wykonanym przez Kathirvel i in. myszy szczepu BALB/c

otrzymywały dietę wysokotłuszczową z lub bez dodatku betainy. Grupy, które otrzymywały karmę z dodatkiem betainy charakteryzowały się statystycznie niższym stężeniem glukozy na czczo, insuliny oraz TG w osoczu, a także niższą zawartością tłuszczu w wątrobie (Kathirvel i in., 2010).

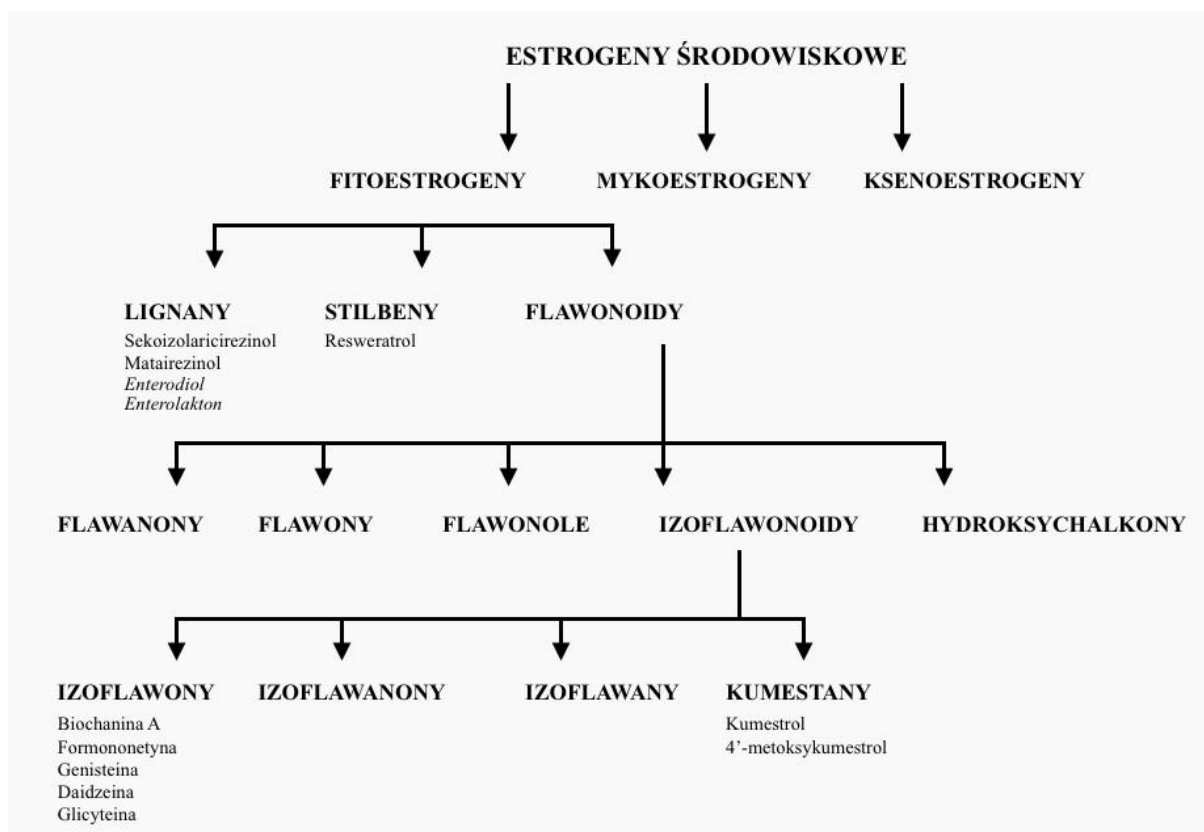
Biorąc pod uwagę znaczenie folianów w OCM podjęto działania w kierunku oceny wpływu niedoboru również tego składnika w diecie na występowanie stłuszczenia wątroby. Potwierdzono, że deficyt folianów przyczynia się do akumulacji lipidów w hepatocytach oraz zmniejszeniu poziomów fosfatydylocholiny i choliny w ustroju. Istnieje jednak ograniczona liczba prac podejmujących ten temat, a w porównywaniu wyników pojawiają się pewne nieścisłości, przez co istnieje konieczność podejmowania tego tematu (Christensen i in., 2010; Kim i in., 2002).

Warto wspomnieć, iż różnice w wynikach badań *in vivo* dotyczących udziału poszczególnych składowych OCM w patogenezie NAFLD wynikają z zastosowania w nich różnych modeli, które mogą charakteryzować się odmiennym profilem metabolicznym, co przekłada się na różne poziomy stłuszczenia wątroby, oporności na insulinę czy występowania ognisk zapalnych.

2.3. Charakterystyka fitoestrogenów

2.3.1. Klasyfikacja, budowa chemiczna, funkcje biologiczne

Zgodnie z definicją fitoestrogeny to organiczne związki niestteroidowe (polifenolowe) pochodzenia roślinnego, które w organizmie ludzkim działają na podobieństwo estrogenów, żeńskich hormonów płciowych. Ich struktura chemiczna jest bowiem zbliżona do występującego w organizmie człowieka 17- β -estradiolu. Z tego względu ich działanie opisuje się jako antagonistyczne wobec estrogenu. Przyjmuje się, że wraz z ksenoestrogenami i mykoestrogenami tworzą grupę tzw. estrogenów środowiskowych. Substancje te pełnią w roślinach określone funkcje, należą do nich np. ochrona przed promieniowaniem UV, działanie grzybobójcze i przeciwutleniające, czy też udział w reakcjach stresowych (Kraszewska i in., 2007). Do fitoestrogenów zalicza się trzy grupy związków: flawonoidy, lignany i stilbeny. Dokładny podział przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Podział fitoestrogenów (na podstawie Kraszewska i in., 2007).

Cechą budowy przestrzennej i strukturalnej łączącą różne fitoestrogeny jest to, że głównym ich budulcem i źródłem masy cząsteczkowej są pierścienie aromatyczne typu A i B, zwane arenami. Poza bazą, którą stanowi pierścień fenolowy, fitoestrogeny posiadają różne grupy funkcyjne, które wpływają na ich właściwości biologiczne i aktywność. Mogą to być dodatkowe pierścienie benzenowe, mostki tlenowe, grupy metoksyłowe (-OCH₃) oraz inne podstawniki, które modyfikują ich działanie (Kraszewska i in., 2007). Ze względu na swoją budowę chemiczną oraz obecność grup funkcyjnych związki te mają zdolność wiązania się z receptorami estrogenowymi, co przekłada się na ich zakres działania. Wykazano, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i na modelu zwierzęcym pozytywny wpływ fitoestrogenów na osteoporozę, dolegliwości menopauzalne, metabolizm lipidów i węglowodanów oraz szlaki związane z układem immunologicznym, a tym samym obniżenie ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i cukrzycy typu 2. Upatruje się też ich właściwości przeciwutleniających, przeciwnowotworowych i wspomagających regulację hormonalną.

Spełniane funkcje biologiczne będą różniły się w zależności od tkanki docelowej, rodzaju związku, dawki, biodostępności, rasy, poziomu hormonów endogennych oraz ogólnego stanu zdrowia. Z tego samego powodu wyniki badań dotyczących wpływu

fitoestrogenów na organizm są niejednoznaczne. Jednocześnie uwzględniając podobieństwo do estrogenów analizuje się potencjalne działania niepożądane tych związków, zwłaszcza w kontekście zaburzeń hormonalnych (Canivenc-Lavier & Bennetau-Pelissero, 2023; Rietjens i in., 2017). W kilku metaanalizach oceniających wpływ fitoestrogenów (najczęściej izoflawonów sojowych w suplementach) na objawy menopauzy opisano, że związki te zmniejszały częstotliwość uderzeń gorąca tylko u części kobiet w okresie okołomenopauzalnym. W badaniach oceniających oddziaływanie tych związków na gęstość mineralną kości otrzymano wyniki zarówno potwierdzające pozytywny wpływ ich spożycia, jak i przedstawiające brak efektu, w tym brak wpływu na zmniejszenie ryzyka złamań kości. EFSA w 2012 r. przeanalizował dostępne dowody naukowe oceniając szczególnie badania z udziałem ludzi i stwierdził, że na ich podstawie nie można jednoznacznie ustalić czy spożycie izoflawonów sojowych zmniejsza występowanie zmian w śródbłonku naczyń krwionośnych oraz poprawia utrzymanie prawidłowej gęstości kości u kobiet w okresie okołomenopauzalnym (European Food Safety Authority, 2012).

Badania dotyczące wpływu fitoestrogenów na ryzyko występowania nowotworów również nie dają jasnych wyników. Fritz i in. w metaanalizie oceniającej potencjalne działanie przeciwnowotworowe spożycia fitoestrogenów (głównie z soi oraz koniczynej czerwonej) opisali, że pobranie tych związków z dietą może być związane ze zmniejszonym ryzykiem występowania raka piersi, nawrotem choroby i wynikającą z niej śmiertelnością (Fritz i in., 2013). W 2015 r. EFSA wydawała raport, w którym przeanalizował możliwy związek między spożyciem izoflawonów z suplementów diety a ich oddziaływaniem na gruczoł sutkowy, macicę i tarczycę u kobiet w okresie okołomenopauzalnym. Eksperti oceniając szereg badań stwierdzili, że nie ma obecnie dowodów świadczących o szkodliwym wpływie tych związków na wspomniane narządy. Wyniki badań nie wskazują na zwiększone ryzyko raka piersi u kobiet po menopauzie, które spożywają fitoestrogeny, niemniej nie można odnosić tego do kobiet ze zdiagnozowanym estrogenozależnym nowotworem piersi (European Food Safety Authority, 2015).

Sugeruje się również, że fitoestrogeny mogą wywierać korzystne działanie w przypadku zespołu metabolicznego czy cukrzycy typu 2. W badaniu przeprowadzonym w Tajwanie wśród kobiet po menopauzie oceniono efekt 6-miesięcznego przyjmowania suplementu izoflawonów sojowych w dawce 100 mg/dzień w porównaniu do otrzymywania niskich dawek estrogenów w ramach hormonalnej terapii zastępczej.

Interwencja ta spowodowała, że w obu grupach nastąpiło obniżenie poziomu glukozy i insuliny na czczo, dodatkowo efekt ten był na podobnym poziomie zarówno wśród kobiet przyjmujących izoflawony jak i estrogeny (Cheng i in., 2004). Również wyniki metaanalizy przeprowadzonej przez Fang i in. pokazują, że izoflawony sojowe, szczególnie genisteina, mogą wpływać na metabolizm glukozy, w tym zmniejszenie stężenia insuliny w krwi oraz obniżenie oporności na insulinę u kobiet po menopauzie (Fang i in., 2016). Podstawą takiego działania może być powinowactwo fitoestrogenów do receptorów jądrowych PPAR w tym PPAR γ , który reguluje ekspresję genów związanych z metabolizmem lipidów i przemianami energetycznymi w komórkach (Jungbauer & Medjakovic, 2014). Zagadnienie wymaga jednak dalszych badań, zwłaszcza w kwestii poszukiwania potencjalnych szlaków metabolicznych odpowiadających za ten efekt.

2.3.2. Źródła fitoestrogenów w żywności

Wraz ze wzrostem popularności diet roślinnych, zwiększyło się spożycie roślin bogatych w fitoestrogeny. Ich głównymi źródłami są rośliny strączkowe, owoce, warzywa, zboża oraz nasiona i orzechy. Zgodnie z opisanym wcześniej podziałem, do fitoestrogenów zalicza się lignany, których źródłem są nasiona lnu, sezamu, słonecznika, pełnoziarniste produkty zbożowe, ziarna kawy, warzywa (cebula) i owoce (żurawina, truskawki, wiśnie, jabłka, maliny). W przypadku siemienia lnianego są to ilości rzędu 257 mg/100g nasion. Głównymi lignanami są sekoizolarycirezynol i matairezynol, które stanowią związki prekursorowe dla powstających z nich w przewodzie pokarmowym enterolaktonu i enterodiolu. (Rodríguez-García i in., 2019). Następną grupą związków są stilbeny. Ich głównym przedstawicielem jest resweratrol, którego głównym źródłem są skórki winogron, czerwone wino, owoce jagodowe i orzechy. Czerwone wino może zawierać od 0,9 do 1,37 mg/ml resweratrolu, w zależności od rodzaju trunku i techniki produkcji (Wu i in., 2001).

Najpowszechniej występującymi fitoestrogenami są jednak flawonoidy, a dokładniej należące do nich izoflawonoidy, wśród których wyróżnia się: izoflawony, izoflawany, izoflawanony oraz kumestany. Te ostatnie występują w kielkach soi, lucernie, koźczyńce fasolach mungo i pinto, a niewielkie ilości również w roślinach strączkowych. Najczęściej analizowanymi związkami z grupy flawonoidów pod względem działania i spożycia są izoflawony, do których należą: genisteina, daidzeina, glicyteina, formonetyna i biochanina A. Wynika to z faktu, iż głównym źródłem tych związków jest soja oraz produkty sojowe, których powszechność spożycia stale wzrasta i nie obejmuje już

wyłącznie krajów azjatyckich. Pewne ilości izoflawonów występują również w koniczyńce czerwonej, która jest obecnie składnikiem wielu suplementów diety (Canivenc-Lavier & Bennetau-Pelissero, 2023). Zawartość izoflawonów w ziarnach soi różni się w zależności od odmiany i miejsca uprawy, średnio przyjmuje się zakres od 1,5 – 5,5 mg/g ziaren (da Silva i in., 2021) w tym odpowiednio 50%, 40% i 10% stanowią genisteina, daidzeina i glicyteina (Vitale i in., 2013).

Warto wspomnieć, że źródłem fitoestrogenów mogą być też produkty pochodzenia zwierzęcego, w przypadku gdy zwierzęta karmione były paszą zawierającą soję. Pierwszych oznaczeń zawartości tych związków w produktach odzwierzęcych dokonał Kuhnle i in. Poddali oni analizie 115 artykułów, w których średnia zawartość fitoestrogenów wynosiła 20 µg/100 g mokrej masy. Badanie to stanowi uzupełnienie informacji na temat zawartości fitoestrogenów w produktach spożywczych, przyczyniając się tym samym do bardziej precyzyjnego oszacowania ich spożycia z dietą (Kuhnle i in., 2008).

Dane opisujące spożycie izoflawonów z dietą różnią się między poszczególnymi badaniami, jednak są do siebie zbliżone. Desmawati i in. przedstawiają, że średnie spożycie tych związków w krajach azjatyckich wynosi od 15-50 mg/dzień, podczas gdy w krajach europejskich i USA kształtuje się poziomie 2 mg/dzień (Desmawati & Sulastri, 2019). Viggiani i in. zaprezentowali, że najniższym poziomem spożycia izoflawonów odznaczali się mieszkańcy krajów śródziemnomorskich - 0,46 mg/dzień, w krajach nadbałtyckich wynosiło ono 0,76 mg/dzień, natomiast w Wielkiej Brytanii 2,34 mg/dzień. Najwyższe wartości obserwowano w krajach azjatyckich, tj. 36-40 mg/dzień. (Viggiani i in., 2019). Według innego badania szacuje się, że dzienne spożycie izoflawonów wynosi od 0,5 do 3 mg/dzień w USA, 0,37 – 4,5 mg/dzień w Europie i 3,2 – 30 mg/dzień u wegetarian (Rizzo & Baroni, 2018). W niedawno przeprowadzonym badaniu z udziałem dużej grupy mieszkańców Chin oceniono, że pobranie izoflawonów z soi z dietą wynosiło od 0,8 do 78 mg/dzień (Zhu i in., 2021). Ze względu na różne wzory żywienia populacje azjatyckie odznaczają się wyższym poziomem spożycia fitoestrogenów niż mieszkańcy krajów zachodnich. Wyjątek stanowią kobiety w okresie okołomenopauzalnym, które stosunkowo często przyjmują preparaty soi jako alternatywę dla hormonalnej terapii zastępczej (European Food Safety Authority, 2015).

2.3.3. Izoflawony sojowe – metabolizm i aktywność estrogenowa

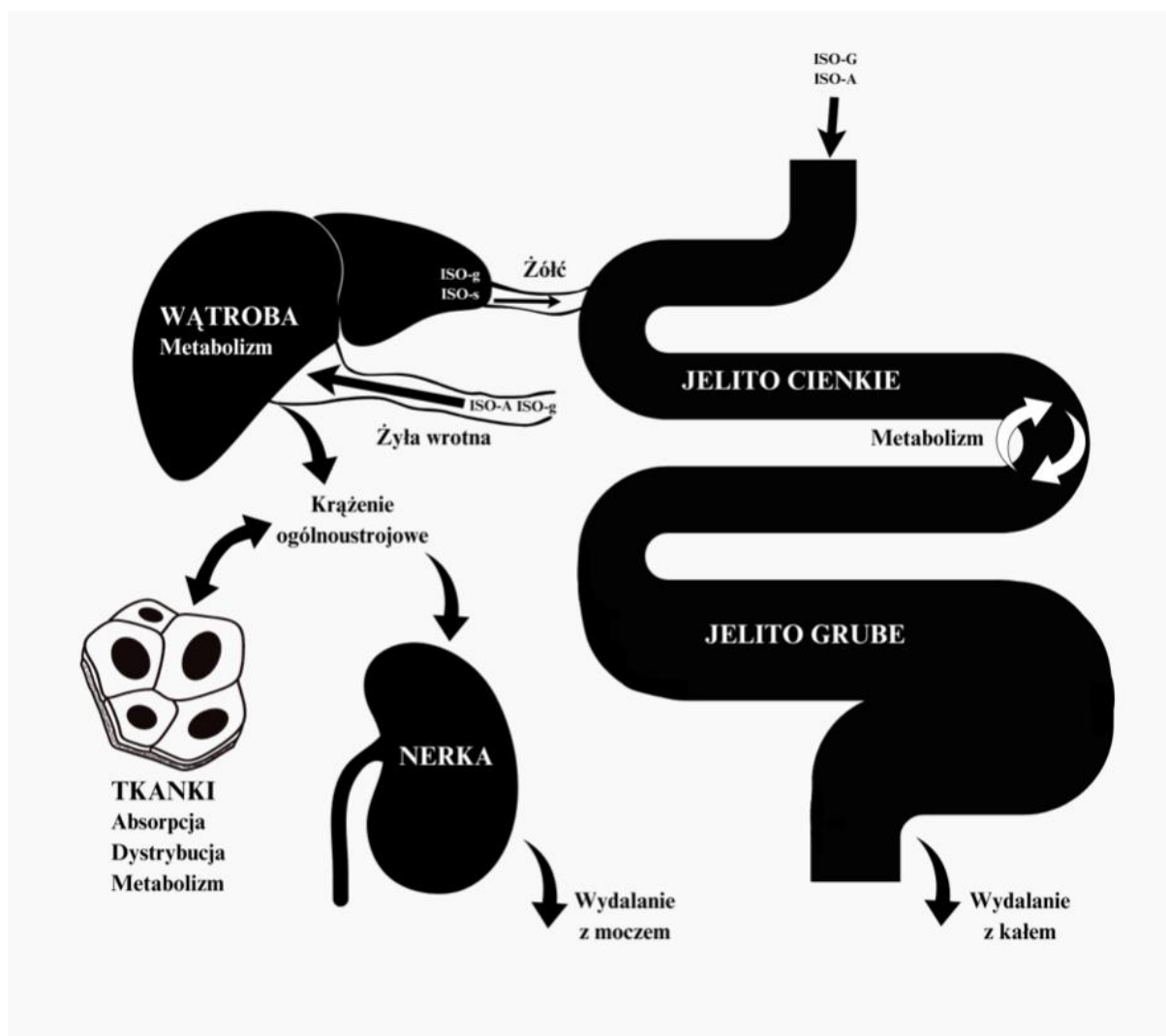
Istotnym zagadnieniem jaki należy uwzględnić podczas analizowania wpływu fitoestrogenów na organizm jest ich metabolizm. Jak wykazano w szeregu różnych doświadczeń cykl przemian tych związków różni się w zależności od gatunku ssaków. Odmienne efekty biologiczne stwierdza się w odniesieniu do form wyjściowych niniejszych związków, jak i ich poszczególnych metabolitów.

Izoflawony występują w roślinach głównie pod postacią nieaktywnych glikozydów - dla precyzji opisu formy te określa się jako genistina, daidzina czy glicytina; aglikony stanowią w roślinach niewielki procent (Miksicek, 1995). Po spożyciu soi lub produktów zawierających soję, izoflawony w formie glikozydów są słabo wchłaniane w jelicie cienkim, co wynika z ich dużej masy cząsteczkowej oraz właściwości hydrofilowych. Kluczowe znaczenie ma zainicjowanie hydrolizy, która powoduje odłączenie części cukrowej i wyodrębnienie wolnych aglikonów (genisteiny, daidzeiny, glicyteiny). W tej formie są one szybko wchłaniane przez rąbek szczoteczki jelita na zasadach dyfuzji pasywnej. Dużą rolę w całym procesie odgrywa mikrobiota jelitowa. Udział w hydrolizie glikozydów bierze kwas solny, ale również β -glukozydazy pochodzące z błony śluzowej jelit lub bakterii jelitowych. Cząsteczki, które nie zostały wchłonięte w jelicie cienkim, trafiają do okrężnicy, gdzie podobnie jak we wcześniejszym odcinku przewodu pokarmowego mogą być hydrolizowane przez enzymy bakteryjne (Larkin i in., 2008).

Po fazie absorpcji następuje dalszy szereg przemian. Metabolizm izoflawonów jest dość złożony. Genisteina może być dalej metabolizowana do 6-hydroksy-O-desmetylangolenzyny, a następnie do niewykazującego aktywności biologicznej *p*-etylofenolu, natomiast daidzeina może ulegać przekształceniu do O-demetyangolenzyny i ekwolu (Cederroth & Nef, 2009). W ramach doświadczeń *in vitro* i *in vivo* zidentyfikowano również kilka metabolitów glicyteiny zaznaczając przy tym, że tylko niewielka jej część ulega przekształceniu do daidzieny (Kraszevska i in., 2007). W ramach reakcji II fazy metabolizmu grupy hydroksylowe w cząsteczkach izoflawonów umożliwiają sprzęganie z kwasem siarkowym lub glukuronowym. Reakcje te są katalizowane przez transferazy glukuronozytowe oraz sulfotransferazy i zachodzą w wątrobie i/lub jelicie cienkim. Powstałe koniugaty transportują izoflawony z krwią do tkanek docelowych, gdzie związki te wykazują działanie biologiczne. Następnie część z nich zostaje wydalona przez nerki, pozostała część jest wydalana z żółcią, z którą poprzez krążenie wątrobowo-jelitowe i zostaje zawrócona do jelita. Po dekonjugacji przez bakterie

jelitowe aglikony izoflawonów mogą zostać ponownie wchłonięte i na zasadzie recyklingu zostać poddane opisanym wcześniej reakcjom (Larkin i in., 2008). Część badaczy opisuje, że powtórna absorpcja może odgrywać ważniejszą rolę w metabolizmie i biodostępności tych związków niż pierwotnie sądzono (Chen i in., 2003). Najważniejsze przemiany tych związków i losy w organizmie zobrazowano na rycinie 3.

Na podstawie szeregu oznaczeń opisuje się, że we krwi dominującymi metabolitami izoflawonów są koniugaty glukuronowe i siarczanowe, dochodzi również do ich wiązania z białkami osocza (Larkin i in., 2008). Natomiast wykazano, że wolne aglikony stanowią jedynie niewielką część wszystkich izoflawonów obecnych w krwi i należą do nich genisteina, daidzeina, ekwol i O-demetyangolenzyna (Cederroth & Nef, 2009). Po spożyciu produktów sojowych izoflawony były wykrywalne w osoczu już po 30 minutach. Jednak w zależności od rodzaju związku różny będzie czas osiągnięcia maksymalnego stężenia, a także czas eliminacji z ustroju (King & Bursill, 1998). Opisane wcześniej różnice w spożyciu tych związków wraz z dietą wśród poszczególnych populacjach przekładają się na poziomy ich koncentracji we krwi. W populacji azjatyckiej ze względu na zwyczaje żywieniowe i wysoki poziom konsumpcji produktów sojowych stężenie izoflawonów może osiągać nawet 1000 nM. W krajach zachodnich jest ono znacznie niższe - rzędu 60-70 nM, choć niektóre źródła podają jeszcze niższe wartości, nieprzekraczające 40 nM. Co warto odnotowania wyższymi stężeniami izoflawonów w krwi w krajach europejskich charakteryzują się osoby na dietach wegetariańskich (Cederroth & Nef, 2009; Kraszewska i in., 2007).



Ryc. 3. Uproszczony schemat przemian izoflawonów w ustroju (na podstawie Larkin i in., 2008).

ISO-G – glikozydy; ISO-A - aglikony; ISO-g – formy glukuronowe; ISO-s formy siarczanowe.

Analizując aktywność biologiczną podkreśla się, że aglikony zarówno w doświadczeniach *in vitro* jak i *in vivo* wykazują silniejsze działanie estrogenowe niż formy sprzężone (Islam i in., 2015). W ostatnich latach szczególnie intensywnie analizuje się konwersję daidzeiny do ekwolu. Zachodzi ona na drodze transformacji przy udziale specyficznej mikrobioty jelitowej. Sam ekwol uznaje się za metabolit o najwyższej aktywności estrogenowej (wg różnych źródeł od 10 do 100-krotnie wyższa niż daidzeina) i przeciwutleniającej. Występuje on w dwóch formach chemicznych, tj. R-ekwolu oraz S-ekwolu, które różnią się powinowactwem do receptorów estrogenowych. Ważny odnotowania jest fakt, iż zauważono że nie wszyscy ludzie mają zdolność do konwersji

daidzeiny do ekwolu. Średnio przyjmuje się, że taką możliwość ma 30% populacji krajów zachodnich i około 50-60% wśród osób z krajów azjatyckich lub stosujących dietę wegetariańską. Powodów tego stanu jest kilka, najczęściej zalicza się do nich obecność specyficznej mikrobioty jelitowej, rodzaj i częstotliwość spożywanych produktów sojowych, a także płeć i wiek (Hod i in., 2021; Ortiz & Manta, 2024). Różnic tego typu nie obserwuje się u gryzoni, u których proces ten zachodzi naturalnie. Przekłada się to na zdecydowanie wyższe stężenia ekwolu obserwowane w osoczu szczurów lub myszy (Atkinson i in., 2005).

Jak już wspomniano izoflawony sojowe, jako przedstawiciele grupy fitoestrogenów, mogą w komórkach docelowych wywierać efekt analogiczny do endogennych estrogenów lub działać jako ich antagoniści. Mechanizmy działania fitoestrogenów można podzielić na drogę genomową i niegenomową. Pierwsza z nich została lepiej opisana i bazuje na powinowactwie fitoestrogenów do receptorów estrogenowych (ang. *estrogen receptor*, ER), poprzez które wpływają one na regulację transkrypcji. Odbywa się to na takich samych zasadach jak działanie estrogenów naturalnie występujących w organizmie, które po przyłączeniu do ER, ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie receptor ulega dimeryzacji i oddziałuje na swoiste sekwencje DNA, tzw. elementy odpowiedzi na estrogen (ERE). Kompleks ten wpływa na poziom ekspresji genów zależnych od estrogenów (obejmuje on zarówno zwiększanie jak i hamowanie ekspresji) (Nynca i in., 2007).

W organizmie występują dwa rodzaje receptorów estrogenowych, tj. ER- α , ER- β . Receptory ER- α zlokalizowano w męskich narządach rozrodczych, gruczole sutkowym, jajnikach, macicy, wątrobie, nerkach oraz pewne ilości w tkance tłuszczowej, natomiast receptory ER- β m.in. w jajnikach, śródbłonku prostaty, tkance tłuszczowej, układzie immunologicznym, jelitach i płucach. Ich obecność odnotowuje się również w ośrodkowym układzie nerwowym (Islam i in., 2015; Paterni i in., 2014). W wielu tkankach receptory te występują wspólnie, ale w różnych ilościach (ze względu na różne poziomy ekspresji genów kodujących te białka). W badaniach przeprowadzonych na myszach z *knock out'em* genu kodującego ER- α lub ER- β wykazano, że białka te charakteryzują się różną aktywnością biologiczną (Barone i in., 2008). Przykładem mogą być doświadczenia, w których wykazano, że aktywacja receptorów ER- α w gruczole sutkowym skutkuje proliferacją komórek, natomiast aktywacja ER- β działa przeciwnie, hamuje ten proces i inicjuje apoptozę (Covaleda i in., 2008; Ström i in., 2004). Hwang i in. opisali natomiast, że w doświadczeniach *in vitro* na różnych liniach komórkowych, w których zastosowano w pożywce dodatek estradiolu w stężeniu zbliżonym do

fizjologicznego, genisteina wykazywała działanie antyestrogenowe, natomiast przy zastosowaniu niższych poziomów estradiolu (które stwierdza się u kobiet po menopauzie), działanie genisteiny miało charakter agonistyczny wobec estradiolu (Hwang i in., 2006).

Szereg doświadczeń potwierdził zdolność fitoestrogenów do wiązania się z receptorami ER- α i ER- β . Wykazano, że mogą one zwiększać aktywację genów poprzez ERE bardziej efektywnie w receptorach ER- β niż receptorach ER- α , co przekłada się na większe powinowactwo wiązania z ER β niż z ER α (Barone i in., 2008; Rietjens i in., 2017). To czy izoflawony będą wywierać efekt agonistyczny czy antagonistyczny względem estrogenów zależy więc od poziomów estrogenów endogennych i dostarczonej dawki fitoestrogenów, a także miejsca ich działania (Cederroth & Nef, 2009). Wyniki różnych doświadczeń nie są jednoznaczne w kwestii tego jak silne jest to oddziaływanie, co powoduje trudności w późniejszym wnioskowaniu. Przyjmuje się jednak, że fitoestrogeny wywołują efekt słabszy od naturalnie syntetyzowanego w organizmie estradiolu, w zależności od układu badań wskazuje się, że jest on od 100 do 10 000 razy słabszy od powinowactwa prezentowanego przez 17- β -estradiol (Viggiani i in., 2019).

Droga niegenomowego działania izoflawonów w organizmie opiera się na zaangażowaniu w procesy zachodzące w komórce, które ze względu na intensywne tempo przebiegu są niezależne od transkrypcji czy biosyntezy białek. Wymienia się tutaj oddziaływanie m.in. na enzymy wewnątrzkomórkowe biorące udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych czy syntezę białek wiążących hormony steroidowe (Kraszewska i in., 2007).

2.4. Soja a niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby

Częstość występowania NAFLD na całym świecie gwałtownie rośnie i staje się problemem zdrowia publicznego, a mimo to jak dotąd nie udało się opracować celowanego leczenia farmakologicznego. W związku z tym, że bezpośredni wpływ na występowanie tego zaburzenia ma styl życia w tym sposób żywienia, poszukuje się wśród całej gamy dostępnych składników odżywczych, związków wspomagających jego zapobieganie i leczenie. Szczególną uwagę zwraca się na soję, a konkretnie zawarte w niej białko sojowe i izoflawony sojowe. Zainteresowanie to wynika z faktu, iż w badaniach obserwacyjnych opisujących populacje azjatyckie, gdzie soja stanowi jeden z głównych składników diety wykazano niską częstotliwość występowania otyłości. Zaczęto poszukiwania powiązań między tymi dwoma zagadnieniami (Mu i in., 2019).

Wykazano, że białko sojowe oraz izoflawony zawarte w soi wpływają na szlaki związane z metabolizmem węglowodanów i tłuszczów. Włączenie tych składników do diety powodowało poprawę parametrów lipidowych, tj. zmniejszenie poziomu TG oraz cholesterolu frakcji LDL, czy korzystną zmianę proporcji pomiędzy cholesterolem frakcji HDL i LDL. Wykazano również, że spożycie soi miało pozytywne skutki u pacjentów z NAFLD poprzez zmniejszenie tworzenia kropeł lipidowych w komórkach wątroby. Wskazuje się również wpływ soi na proces wydzielania insuliny oraz odpowiedzi tkankowej na ten hormon, a także na zmiany poszczególnych populacji mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobioty (Xiao & Hendry, 2022).

Badania na modelu zwierzęcym dotyczące tego tematu obejmowały ocenę wpływu diety zawierającej białko sojowe i/lub izoflawony sojowy na parametry związane z metabolizmem lipidów u zwierząt z otyłością indukowaną dietą wysokotłuszczową (szczury Sprague-Dawley, Wistar) lub z genotypem predysponującym do otyłości i dietą o podwyższonej zawartości tłuszczów (szczury Otsuka Long-Evans Tokushima (OLETF), Zucker). W badaniu przeprowadzonym przez Badger i in. szczury Sprague-Dawley podzielono na dwie grupy i karmiono je dietą wysokotłuszczową w celu indukcji NASH. Grupy te różniły się między sobą źródłem białka w diecie, którym była albo kazeina albo izolat białka sojowego w takiej samej ilości. U zwierząt spożywających dietę zawierającą białko sojowe wykazano zmniejszoną akumulację tłuszczu w organizmie, a tym samym zmniejszony stan zapalny wątroby (Badger i in., 2008). Podobne wyniki uzyskali Yang i in., którzy w badaniu na modelu zwierzęcym wykazali, że szczury Sprague-Dawley karmione dietą wysokotłuszczową zawierającą białko sojowe charakteryzowały się niższym stężeniem cholesterolu w osoczu, niższym stężeniem nadtlenków lipidów w wątrobie oraz niższą zawartością tkanki tłuszczowej w porównaniu do grupy, która nie otrzymywała z dietą białka sojowego (Yang i in., 2011). W innym doświadczeniu, w którym szczury OLETF karmiono dietą zawierającą izolowane białko sojowe również zaobserwowano, że spożycie tego składnika powoduje zmniejszenie poziomu stłuszczenia wątroby, obniżenie poziomu diacylogliceroli w wątrobie oraz zmiany w mikrobiocie jelitowej (Panasevich i in., 2017). Natomiast w badaniach na otyłych szczurach Zucker dieta zawierająca koncentrat białka sojowego wzbogacony izoflawonami skutkowała zmniejszeniem stłuszczenia wątroby, obniżeniem poziomów ALAT, AspAT i TG w osoczu, zwiększeniem poziomu substratów biorących udział w procesie β -oksydacji oraz zwiększeniem aktywności enzymów związanych z metabolizmem lipidów, takich jak,

karboksylaza acetylo-CoA czy acylotransferaza glicerolo-3-fosforanowa w wątrobie (Gudbrandsen i in., 2006; Hakkak i in., 2018).

W doświadczeniu na samicach szczura stada niekrewniaczego Wistar poddanych owariektomii (chirurgicznemu usunięciu jajnika bądź jajników), którym podawana była dieta wysokotłuszczowa z ekstraktem izoflawonów sojowych zaobserwowano, że zwierzęta te miały obniżone parametry świadczące o uszkodzeniu wątroby, tj. stężenie ALAT, AspAT, białka całkowitego i bilirubiny w osoczu (Panneerselvam i in., 2016). W innych badaniach na modelu zwierzęcym zaobserwowano, że podawanie w diecie genisteiny i daidzeiny wpływało na proces lipogenezy w wątrobie, poprawę wrażliwości na insulinę, a także zmniejszało akumulację lipidów w wątrobie (Kim i in., 2010). Analiza badań *in vivo* dotyczących spożycia wraz z dietą genisteiny (głównie w przypadku diety wysokotłuszczowej) wykazała, że substancja ta powoduje zmniejszenie stężenia parametrów profilu lipidowego w krwi, korzystniejsze wyniki w obrazie histologicznym wycinków wątroby, a także zwiększenie poziomu związków o działaniu przeciwutleniającym przy jednoczesnym zmniejszeniu poziomu cytokin prozapalnych jak np. IL-6, TNF- α . Podawanie z dietą genisteiny może również wpływać na masę ciała i masę wątroby, lecz nie potwierdzają tego wszystkie badania (Xin i in., 2019).

W badaniach z udziałem ludzi oceniono jakie efekty w kontekście pracy wątroby i czynników wpływających na jej stłuszczenie, daje spożycie produktów będących źródłem białka sojowego i/lub izoflawonów sojowych. Kani i in. zaobserwowali, że wprowadzenie do diety z deficytem kalorycznym u osób ze zdiagnozowanym NAFLD, 30 g ziaren soi w miejsce 30 g czerwonego mięsa, przez 8 tygodni wpływało na obniżenie biomarkerów stłuszczenia wątroby, tj. poziomu ALAT i AspAT, dialdehydu malonowego, ale i fibrynogenu w osoczu, w porównaniu do grupy niespożywającej soi. Ponadto wykazano, że w grupie spożywającej soję niższe były stężenia glukozy na czczo, białka C-reaktywnego i insuliny w surowicy krwi. Osoby, z grupy konsumującej soję charakteryzowały się także niższymi wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi (Kani i in., 2014, 2017). W innym badaniu z udziałem pacjentów ze zdiagnozowanym NAFLD zaobserwowano, że w grupie, w której włączono do diety ubogoenergetycznej 240 ml napoju sojowego, poziomy ALAT i białka C-reaktywnego w surowicy krwi były niższe w porównaniu do grupy osób, które tego napoju nie spożywały (Eslami i in., 2019). U pacjentów z NASH spożywających z dietą określone ilości białka sojowego przez 24 tygodnie obserwowano poprawę glikemii oraz zmniejszenie masy ciała, a tym samym wskaźnika masy ciała (ang. *body mass index*, BMI), zawartości tkanki

tłuszczowej, ale także stężenia ALAT i AspAT w surowicy krwi (Deibert i in., 2019). W badaniu kohortowym obejmującym ponad 24 tysiące dorosłych mieszkańców Chin wykazano, że większe spożycie produktów sojowych wiązało się z niższym prawdopodobieństwem występowania NAFLD (Zhang i in., 2020). Interesujące wyniki uzyskano również oceniając wpływ spożycia izoflawonów sojowych w dawce 100 mg/dzień u pacjentów ze zdiagnozowaną NAFLD. Po 12 tygodniach stosowania tych suplementów stężenie ALAT i AspAT było istotnie mniejsze w grupie przyjmującej izoflawony sojowe w porównaniu do uczestników spożywających placebo, jednak nie wykazano zmian w stopniu zwłóknienia wątroby u pacjentów w obu grupach (Neshatbini Tehrani i in., 2024).

Badania dotyczące wpływu izoflawonów zawartych w soi na zaburzenia pracy wątroby wywołane stłuszczeniem prowadzone były także na grupie kobiet po menopauzie ze względu na specyficzny status hormonalny i wynikające z tego większe ryzyko zaburzeń metabolicznych. Kim i in. ocenili jakie efekty przyniesie suplementacja izoflawonami sojowymi w dawce 70 mg/dzień, podawana kobietom po menopauzie przez okres 12 tygodni. W grupie spożywającej suplementy stężenie TG było istotnie niższe niż w grupie, która otrzymywała placebo. Suplementacja izoflawonami nie wpłynęła jednak na stężenia glukozy na czczo, insuliny, cholesterolu całkowitego czy cholesterolu frakcji HDL i LDL (Kim i in., 2013). Morandi i in. w metaanalizie uwzględniającej randomizowane badania kontrolowane opisali, że spożycie izoflawonów sojowych wpływa na obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego i apolipoproteiny B u kobiet po menopauzie. Korzystny działanie na stężenie biomarkerów związanych z gospodarką lipidową obserwuje się także po spożyciu izolatów białka sojowego (Moradi i in., 2020).

Jak wcześniej wspomniano ekwól powstaje w organizmie w wyniku przemian daidzeiny będącej jednym z izoflawonów sojowych i wykazuje silniejszą aktywność estrogenową niż związek macierzysty, a przez to wpływa na procesy, w których znaczną rolę odgrywają receptory estrogenowe. Jednak jak wiadomo przemiana daidzeiny do ekwołu zachodzi tylko u części populacji. Z tego względu w badaniu przeprowadzonym przez Akahane i in. zaobserwowano, że stopień zwłóknienia wątroby był wyższy u osób niebędących producentami ekwołu, w porównaniu do osób, które mają zdolność do jego produkcji (Akahane i in., 2021).

Należy jednak podkreślić, że przeglądy systematyczne opisujące badania wpływu spożycia soi i jej składników na NAFLD mówią o pewnych sprzecznościach w uzyskiwanych wynikach. Powodów tego stanu upatruje się w kilku czynnikach

stanowiących zarazem zmienne. Należą do nich: analizowanie spożycia różnych form produktów sojowych (ziarna soi, izolaty białka sojowego, suplementy izoflawonów sojowych) oraz różne ich dawki i czas trwania interwencji dietetycznych, różne grupy badane i mnogość czynników związanych ze stylem życia, różnice genetyczne w populacjach, metody diagnostyczne stanu wątroby czy różne modele badawcze w doświadczeniach *in vivo* (Xiong & Zhu, 2021).

Jeśli chodzi o mechanizm działania soi w kontekście NAFLD, to wykazano, że zawarte w niej izoflawony sojowe i/lub białko sojowe wpływają na proces lipogenezy, β -oksydacji kwasów tłuszczowych i syntezy kwasów tłuszczowych poprzez transkrypcyjną regulację tych procesów. Opisuje się bowiem, że składniki te poprzez wpływ na aktywność czynników transkrypcyjnych, tj. PPAR γ lub SREBP-1c mogą obniżać ekspresję genu *FASN* zaangażowanego w proces lipogenezy. Oddziaływanie tych związków na *AMPK* lub *PPAR α* może prowadzić do zwiększenia intensywności β -oksydacji kwasów tłuszczowych, tym samym zmniejszając pulę akumulowanych lipidów. Izoflawony sojowe mogą również wpływać na aktywację czynnika transkrypcyjnego FXR, co prowadzi do zmniejszenia syntezy kwasów tłuszczowych oraz zwiększenia katabolizmu kwasów żółciowych (Jiang i in., 2015; Neshatbini i in., 2024).

W kontekście niniejszej pracy warto również zwrócić uwagę na zawartość choliny w produktach na bazie soi. Jak wcześniej opisano, cholina odgrywa istotną rolę w procesie prawidłowego funkcjonowania wątroby. W związku z tym dostarczanie z produktami na bazie soi nie tylko białka sojowego czy izoflawonów sojowych, ale również choliny może mieć znaczenie w pozytywnym oddziaływaniu spożycia tego rodzaju produktów u pacjentów z NAFLD. Ziarna soi zawierają bowiem około 120 mg choliny na 100 g surowca, mąka sojowa - 190 mg/100 g, napój sojowy – 24 mg/100 ml, tofu - 30 mg/100 g, tempeh – 40 mg/100 g, izolat białka sojowego – 85 mg/100 g. Spożycie tych produktów może znacząco zwiększać dostarczanie choliny z dietą szczególnie w przypadku diet wegetariańskich (Patterson i in., 2008).

Wykazany w wielu badaniach pozytywny związek między spożyciem soi a funkcjonowaniem wątroby i łagodzeniem procesu stłuszczenia spowodował, że prowadzone są kolejne badania dotyczące poszukiwania nowych szlaków metabolicznych tłumaczących ten wpływ. Jednak jak dotąd nie przeprowadzono badań opisujących potencjalny mechanizm oddziaływania fitoestrogenów sojowych na aktywację szlaku PEMT związanego z fosfatydylocholiną, a przez to i prawidłowym funkcjonowaniem wątroby.

3. Cele i zakres pracy

Jak wspomniano wcześniej stłuszczenie wątroby stanowi obecnie jeden z głównych problemów zdrowia publicznego w populacji światowej. Choroba ta może być wywołana przez różne czynniki. Wśród nich można wymienić np. nieprawidłowości w OCM, na który składają się wzajemnie powiązane ze sobą szlaki przemian metioniny, folianów i choliny. Zauważono, że niedobór choliny, a konkretnie jednej z jej form - fosfatydylocholiny, upośledza eksport lipidów z wątroby, doprowadzając do akumulacji TG w cytozolu komórek wątrobowych. Związane jest to z faktem, iż fosfatydylocholina jest niezbędna do syntezy VLDL, które transportują lipidy z wątroby do krążenia. Cholina jako składnik odżywczy może być dostarczana do organizmu wraz z pożywieniem (głównie pochodzenia zwierzęcego), ale może być również syntetyzowana w wątrobie poprzez enzym PEMT. Tempo endogennej syntezy fosfatydylocholiny zależy od poziomu ekspresji genu *Pemt*, który z kolei jest uzależniony od stężenia estrogenów.

Jednocześnie zauważono, że spożycie soi może stanowić czynnik ochronny, zapobiegający stłuszczeniu wątroby. Mechanizmy działania soi w tym aspekcie nie zostały jednak dotąd poznane. Biorąc pod uwagę fakt, iż jednym ze składników soi są izoflawony sojowe (do których należą m.in. genisteina i daidzeina), które wykazują strukturalne podobieństwo do estrogenów, zasadnym wydaje się prowadzenie badań w obszarze wpływu tych związków na szlaki metaboliczne zależne od estrogenów i związane z gromadzeniem lipidów. Warto w tym miejscu wspomnieć także o jednym z trendów konsumenckich ostatnich lat, mianowicie o zwiększeniu spożycia produktów sojowych oraz suplementów na bazie soi. Biorąc pod uwagę wszystkie te dane stwierdza się, że odpowiedź na pytanie czy spożycie soi w dawkach przyjętych za zwyczajowe jest w stanie wspomóc działanie wątroby, może zwiększyć podstawową wiedzę na temat metabolizmu choliny oraz lipidów, a także mieć duże znaczenie praktyczne.

W związku z powyższym w ramach niniejszej pracy doktorskiej postawiono następujące hipotezy badawcze:

1. Ze względu na obecność elementu odpowiedzi na estrogeny (ERE) w promotorze genu *Pemt*, spożycie izoflawonów sojowych (należących do fitoestrogenów) wraz z dietą, w ilościach odpowiadających ich zwyczajowej konsumpcji, wpływa na jego ekspresję w wątrobie szczura, a tym samym oddziałuje na syntezę fosfatydylocholiny w wątrobie i eksport VLDL do krwiobiegu.

2. Izoflawony sojowe spożyte wraz z dietą wpływają na metabolizm lipidów w organizmie szczura poprzez regulację ekspresji genów *Ppar γ* , *Srebp-1c* i *Fasn* (transkrypcyjna regulacja metabolizmu lipidów).
3. Deficyt choliny w diecie powoduje jej niedobór w organizmie, jednocześnie aktywując związane z tym mechanizmy kompensacyjne, do których należy m.in. zwiększenie endogennej syntezy choliny poprzez zwiększenie ekspresji genu *Pemt* oraz zmiany w ekspresji genów *Ppar γ* , *Srebp-1c*, *Fasn* związanych z metabolizmem lipidów.

Głównym celem niniejszej pracy była ocena wpływu izoflawonów sojowych na proces endogennej syntezy fosfatydylocholiny poprzez wpływ na ekspresję genu *Pemt*, jak również określenie zależności między podażą izoflawonów sojowych a wybranymi procesami związanymi z gromadzeniem lipidów w wątrobie szczurów, zarówno w stanie niedoboru choliny w diecie, jak i prawidłowej jej podaży. Takie dwutorowe podejście umożliwia precyzyjne przeanalizowanie wzajemnego wpływu izoflawonów sojowych i choliny na proces endogennej syntezy fosfatydylocholiny oraz odpowiedź na pytanie czy zakładany efekt działania izoflawonów będzie większy podczas niedoboru choliny w diecie w porównaniu do jej odpowiedniego spożycia. Tym samym daje to możliwość dokładniejszego wnioskowania w podjętym temacie.

Cele szczegółowe obejmowały przeanalizowanie czy dodatek genisteiny, daidzeiny lub ekstraktu izoflawonów sojowych do standardowej diety szczurów o prawidłowej zawartości choliny lub przy jej deficycie może wpływać na:

- syntezę fosfatydylocholiny w wątrobie poprzez aktywację genu *Pemt* zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji, tym samym zwiększając jej poziom w tym narządzie,
- proces gromadzenia się lipidów w wątrobie poprzez aktywację genów *Ppar γ* , *Srebp-1c*, *Fasn* zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji, manifestujący się zmianami w morfologii komórek wątroby,
- stężenia wybranych parametrów biochemicznych krwi związanych z metabolizmem węglowodanów oraz lipidów (glukoza, cholesterol całkowity, cholesterol frakcji HDL oraz LDL, TG, VLDL i enzymy wątrobowe),
- skład ciała zwierząt oraz w zawartość tłuszczu w kale, które stanowią fenotypowe odzwierciedlenie przebiegu procesów związanych z metabolizmem lipidów.

Wspomniane wyżej cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane, a hipotezy badawcze zweryfikowane poprzez przeprowadzenie doświadczenia na modelu zwierzęcym oraz wykonanie szeregu analiz laboratoryjnych w uzyskanym materiale biologicznym.

4. Materiał i metody badań

4.1. Opis eksperymentu na modelu zwierzęcym oraz zastosowanych diet

Badanie na modelu zwierzęcym przeprowadzono zgodnie z międzynarodowymi zasadami dotyczącymi ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Przed rozpoczęciem doświadczenia uzyskano zgodę na jego przeprowadzanie, zatwierdzoną przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (uchwała nr 30/2019). Osiemdziesiąt samców szczurów stada niekrewniaczego Wistar, w wieku ośmiu tygodni (średnia masa ciała zwierząt wynosiła $295,9 \text{ g} \pm 17,8 \text{ g}$), zakupiono z certyfikowanej hodowli zwierząt laboratoryjnych Charles River Laboratories (Niemcy). W trakcie trwania eksperymentu zwierzęta przebywały w pomieszczeniach klimatyzowanych o stałej temperaturze $21 \pm 1^\circ\text{C}$, bez dostępu światła dziennego, o automatycznie zmieniającym się cyklu dzień/noc (co 12 godzin), wilgotności względnej 55-65% i wymianach powietrza 15/h. Utrzymywane były one po dwa osobniki w dokładnie opisanych klatkach typu III H, wraz ze stałym dostępem do karmy i wody *ad libitum*. Przez cały okres trwania doświadczenia zwierzętom codziennie podawana była nowa porcja karmy oraz świeża woda.

Po 5-dniowym okresie aklimatyzacji zwierzęta zostały przydzielone do dwóch grup badanych. Kryterium podziału była masa ciała zwierząt, które rozdzielono w taki sposób, aby średnia masa ciała między grupami była podobna. Zwierzęta w pierwszej grupie spożywały dietę półsyntetyczną AIN-93M bez żadnej modyfikacji (grupa CD; n=40) (Reeves i in., 1993). Natomiast zwierzęta w drugiej grupie otrzymywały taką samą dietę, ale z niedoborem choliny (grupa CholDD; n=40) – tabela 1. Pierwszy etap doświadczenia trwał 4 tygodnie. Po tym okresie każdą z wyżej wspomnianych grup podzielono analogicznie na cztery podgrupy (każda n=10), tj. grupę spożywającą taką samą dietę jak w I etapie eksperymentu bez modyfikacji oraz trzy kolejne grupy, które również kontynuowały spożycie tego samego rodzaju diety co w I etapie, ale z dodatkiem wybranych fitoestrogenów: genisteiny (grupy z dopiskiem GEN; dawka 0,5 g/kg diety), daidzeiny (grupy z dopiskiem DAI; dawka 0,5 g/kg diety) lub ekstraktu izoflawonów sojowych (grupy z dopiskiem ISO; dawka 2 g/kg diety). Ten etap doświadczenia trwał 8 tygodni.

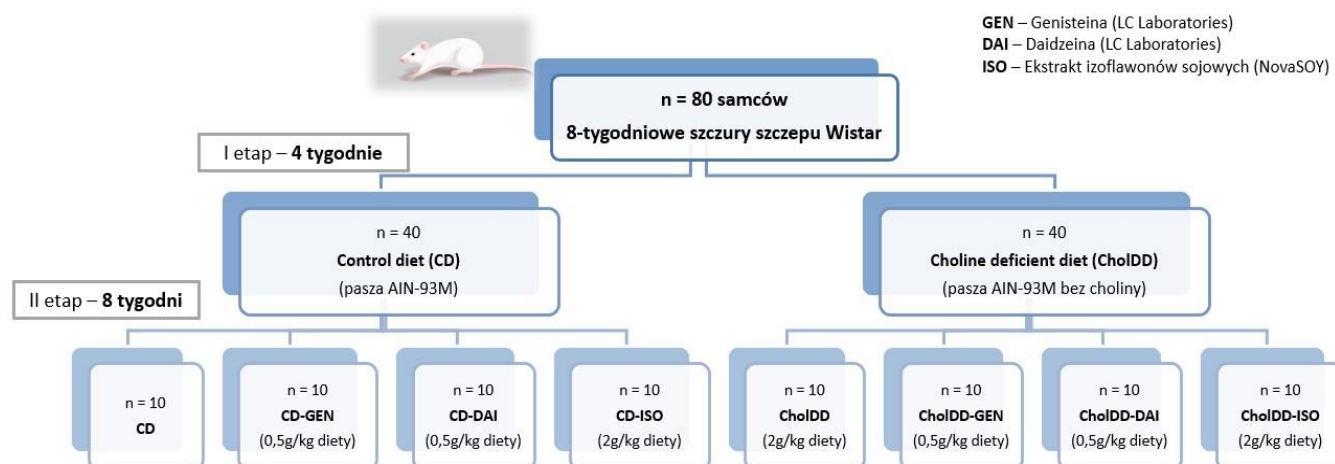
Dawki dodatków izoflawonów sojowych zastosowanych w dietach zostały określone na podstawie przeglądu literatury. Zdecydowano się na skorzystanie z danych dotyczących spożycia tych związków przez populację azjatycką, ze względu na fakt, że spożywa ona

zwyczajowo większe ilości tych składników z dietą, a także fakt, że zostało ono lepiej opisane. Ilości dodatków ustalono w taki sposób, aby ich dzienne pobranie przez zwierzęta odpowiadało przeciętnemu spożyciu ich przez ludzi wraz z produktami sojowymi i/lub suplementami diety je zawierającymi. Możliwe było to dzięki eksperymentom innych badaczy, którzy porównywali spożycie wybranych dawek izoflawonów sojowych w przełożeniu na stężenie tych związków w surowicy krwi zarówno u ludzi jak i u szczurów laboratoryjnych (Doerge & Sheehan, 2002). Dokładny schemat badania przedstawiono na rycinie 4.

Tab. 1. Skład diet AIN-93M i jej modyfikacji zastosowanych podczas doświadczenia na modelu zwierzęcym w przeliczeniu na 1 kg diety.

<i>Składniki diety</i>	<i>Ilość składnika [g]</i>
Kazeina	140
L-Cystyna	1,8
Skrobia kukurydziana	465,692
Sacharoza	100 (lub 102,5 w przypadku diety z deficytem choliny)
Maltodekstryna 10	155
Błonnik (celuloza)	50
Olej słonecznikowy	40
Mieszanka mineralna	35
Mieszanka witamin	10
Cholina (lub jej brak w przypadku diet z deficytem choliny, ilość uzupełniona sacharozą)	2,5
Tert-butyhydroquinone (TBHQ) (8 mg)	0,008
+ dodatek wybranych fitoestrogenów (ilości naddane kosztem sacharozy)	+ 0,5 lub 2
Razem	1000

GEN – Genisteina (LC Laboratories)
 DAI – Daidzeina (LC Laboratories)
 ISO – Ekstrakt izoflawonów sojowych (NovaSOY)



Ryc. 4. Schemat doświadczenia na modelu zwierzęcym.

Genisteina oraz daidzeina zostały zakupione z LC Laboratories, natomiast gotowy ekstrakt izoflawonów sojowych NovaSoy400 z firmy Archer Daniels Midland. Novasoy400 to koncentrat izoflawonów na bazie soi, wyekstrahowany w taki sposób, aby zapewnić zachowanie proporcji izoflawonów oraz izoform aglikonu i glikonu, jakie można znaleźć w ziarnach soi i niesfermentowanej żywności sojowej. Zgodnie z informacjami deklarowanymi przez producenta całkowita zawartość izoflawonów w przeliczeniu % masy wynosi minimalnie 40%. Dokładny skład ekstraktu przedstawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Skład ekstraktu izoflawonów sojowych (NovaSoy 400) użyty w doświadczeniu na modelu zwierzęcym (wraz z przeliczeniami zawartości poszczególnych aglikonów).

	NovaSoy 400¹	Konwersja	Łączna ilość	Genisteina	Daidzeina	Glyciteina
	g/100g	współczynnik	AIE, g/100g	AIE, g/100g	AIE, g/100g	AIE, g/100g
Daidzyna	18,12	0,61057	11,06		11,06	
Mal-Daidzyna	0,09	0,50597	0,05		0,05	
Ac-Daidzyna	1,07	0,55458	0,59		0,59	
Daidzeina	0,24	1,00000	0,24		0,24	
Glicytina	1,73	0,63677	1,10			1,10
Mal-Glicytina	0,1	0,53383	0,05			0,05
Ac-Glicytina	0,14	0,58196	0,08			0,08
Glyciteina	0,08	1,00000	0,08			0,08
Genistina	20,15	0,62500	12,59	12,59		
Mal-Genistina	0,1	0,52123	0,05	0,05		
Ac-Genistina	1,34	0,56962	0,76	0,76		
Genisteina	0,14	1,00000	0,14	0,14		
Łącznie	43,3	-	26,79	13,54	11,94	1,31

Legenda: ¹Novasoy jest produktem naturalnym, wartości te nieznacznie się różnią w zależności od partii;

AIE - odpowiednik aglikonu izoflawonu;

4.2. Ocena spożycia diet, analiza masy i składu ciała

Przez cały okres trwania doświadczenia dokonywano codziennej kontroli spożycia diety, a wyniki pomiarów zapisywano w dzienniku doświadczeń. Wykonano również cotygodniowe pomiary masy ciała z wykorzystaniem wagi elektronicznej (Radwag). Przeprowadzono także pomiary składu ciała wszystkich zwierząt w trzech punktach czasowych, tj. pierwszego dnia doświadczenia, na koniec I etapu oraz na koniec II etapu. Pomiary te wykonane były za pomocą analizatora składu ciała zwierząt laboratoryjnych minispec LF90II (Bruker, Niemcy), którego zasada działania oparta jest na jądrowym rezonansie magnetycznym domeny czasu. Przeprowadzenie tej analizy polegało na umieszczeniu zwierzęcia w specjalnie przystosowanej do tego tubie, która stanowiła poskramiacz umożliwiający ograniczenie ruchów zwierząt w trakcie trwania pomiaru oraz umieszczenie go w analizatorze. Pomiar trwał około 2 minuty, po czym zwierzęta bezpośrednio odkładano do ich klatek.

4.3. Procedura pobrania próbek krwi i tkanek

Eksperyment zakończył się uśmierceniem zwierząt w celu pobrania materiału biologicznego do dalszych analiz. Na 12 godzin przed rozpoczęciem niniejszej czynności

doświadczalnej zwierzętom odstawiono paszę. Jako znieczulenie zastosowano mieszaninę dwutlenku węgla i powietrza (podaną wziewnie, kontrolowany skład 70% : 30%), a po stwierdzeniu braku przytomności zwierzęta uśmiercono poprzez wykrwawienie.

W celu pozyskania surowicy krew zebrano do standardowych fiolek i pozostawiono do wykrzepienia w temperaturze pokojowej na 30-40 minut. Następnie próbkę wirowano przy 3500 rpm przez 7 minut w temperaturze pokojowej. W przypadku pozyskiwania osocza, materiał zbierano do probówek z antykoagulantem i odwirowywano przy 3500 rpm przez 7 minut w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu zarówno surowica, jak i osocze zostały rozdzielone z wykorzystaniem pipety automatycznej do jednorazowych plastikowych probówek o małej pojemności, a następnie przechowywane w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

Od zwierząt pobrano także narządy wewnętrzne, tj. wątrobę, śledzionę, nerki, serce, mózg i jądra, które bezpośrednio po pobraniu zostały zważone na wadze elektronicznej (Radwag), następnie niezwłocznie przeniesione do probówek przeznaczonych do głębokiego mrożenia (tzw. kriofiolek), w celu natychmiastowego zamrożenia w ciekłym azocie. Próbkę tę przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz. Wyjątek stanowiła wątroba, której ściśle określony fragment (zawsze z tego samego płata) przed przeniesieniem do probówek przeznaczonych do głębokiego mrożenia, został umieszczony w probówkach z roztworem Bouin'a. Roztwór ten jest utrwalaczem, który zabezpiecza tkankę do momentu wykonania preparatów histologicznych.

4.4. Badanie histologiczne wątroby szczurów

Przygotowanie preparatów histologicznych wraz z barwieniem wykonano we współpracy z Zakładem Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pierwszym etapem tej procedury było odwadnianie tkanki poprzez inkubację w szeregu alkoholi i ksylenu (od alkoholu 50% przez 70%, 80%, 90%, 96% i absolutny 99,8% do mieszaniny etanol-ksylen i czystego ksylenu) (Leica ST5010 Autostainer XL). Następnym krokiem było tzw. przepajanie, które polegało na umieszczeniu materiału w mieszaninie parafiny z ksylenem, a dalej w ciekłej parafinie. Tak przygotowany fragment tkanki zatopiono w bloczku parafinowym (BioOptica), z którego za pomocą mikrotomu obrotowego (Leica RM2255) przygotowano skrawki o grubości 5 µm. Przygotowane w ten sposób skrawki umieszczono na szkiełkach podstawowych do czasu dalszych analiz. Badanie struktury histologicznej wątroby rozpoczęto od odparafinowania skrawków poprzez ich umieszczenie w dwóch zmianach ksylenu, oraz

nawodnienia ich w szeregu alkoholi przygotowanym podobnie jak szereg odwadniający, jednak ułożonych w odwrotnej kolejności (od alkoholu absolutnego do 70%). W celu przeanalizowania morfologii komórek wątroby wybrano metodę barwienia hematoksyliną i eozyną (H-3502, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA), które wykonano zgodnie z protokołem producenta. Przygotowane wcześniej szkiełka inkubowano z hematoksyliną przez 5 minut i przemyto dwukrotnie wodą destylowaną. W dalszej procedurze wykonano płukanie preparatów alkoholem absolutnym, po czym barwiono roztworem eozyny przez 3 minuty i znów płukano alkoholem absolutnym. Na koniec szkiełka odwodniono w trzech zmianach alkoholu absolutnego i przykryto szkiełkami nakrywkowymi. Tak wykonane barwienie zostało udokumentowane za pomocą skanera slajdów Ocus firmy Grundium (Grundium, Tampere, Finlandia).

4.5. Analiza stężenia wybranych parametrów biochemicznych

W ramach analizy parametrów biochemicznych w krwi i tkankach pobranych od zwierząt, wykonano oznaczenie m.in. profilu lipidowego, tj. poziomu cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji HDL oraz LDL, oraz TG, a także glukozy i enzymów wątrobowych, tj. aminotransferazy alaninowej (ALAT) oraz aminotransferazy asparaginowej (AspAT). Powyższe parametry oznaczono w surowicy krwi z wykorzystaniem komercyjnych zestawów (Thermo Fisher Scientific, USA), za pomocą w pełni zautomatyzowanego analizatora Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific, Finlandia). Zastosowane testy bazują na metodzie enzymatyczno-kolorymetrycznej, która polega na przeprowadzeniu reakcji enzymatycznych między badanym biomarkerem, a odczynnikami zawartymi w zestawie, w konsekwencji czego powstaje barwny produkt. Końcowym etapem analizy jest pomiar absorbancji (zwanej również gęstością optyczną) uzyskanego produktu. Otrzymany wynik po przeliczeniu wyraża stężenie analizowanego parametru w próbce.

W surowicy krwi oznaczono także stężenie VLDL wykorzystując komercyjnie dostępny test immunoenzymatyczny ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (E-EL-R1203, Elabscience), który umożliwia oznaczenie ilościowe danego białka. Oznaczenia dla każdej próbki zostało wykonane w dwóch powtórzeniach. Zastosowany test bazuje na metodzie „sandwich ELISA”, tj. „kanapkowa ELISA”, gdyż antygen (czyli analizowane białko) wiązany jest między dwoma warstwami przeciwciał. Faza stała, którą w niniejszym zestawie stanowiła 96-dołkowa płytka, pokryta była przeciwciałem swoistym dla szczerzej lipoproteiny VLDL. Pierwszym krokiem w procedurze było dodanie próbek

surowicy krwi do odpowiednich dołków płytki. Na tym etapie następowało wiązanie analizowanego białka ze swoistym przeciwciałem. Następnie do każdego dołka dodawano biotynylowane przeciwciało (wyznakowane koniugatem awidyna-peroksydaza chrzanowa) skierowane przeciwko lipoproteinie VLDL. Co ważne, to przeciwciało rozpoznaje inny fragment cząsteczki białkowej. Dzięki temu przeciwciało wykorzystane w fazie stałej nie blokowało przeciwciała wyznakowanego enzymem. W kolejnym etapie procedury dodawano substrat dla peroksydazy chrzanowej, co skutkowało wystąpieniem reakcji barwnej i pojawienie się koloru niebieskiego. Po kilkunastu minutach, zgodnie z protokołem, reakcję tę przerywano przez dodanie roztworu STOP. Niebieskie zabarwienie zmieniało się na żółte. Ostatnim zadaniem zgodnie z protokołem był pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm, którego dokonano za pomocą czytnika wielodetekcyjnego (Infinite Pro 200, Tecan). Z uzyskanych wyników wyliczono średnią absorbancję dla obu powtórzeń i wyznaczono krzywą wzorcową, która umożliwiła przeliczenie tych wartości na stężenie białka.

W pobranych próbkach wątroby oznaczono również stężenia fosfatydylocholiny. W tym celu skorzystano z komercyjnie dostępnego zestawu, który bazuje na metodzie kolorymetrycznej (MAK049, Sigma-Aldrich). Dla każdej próbki wykonano dwa powtórzenia. Analizę przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta. Ostatnim etapem było wykonanie pomiaru absorbancji przy długości fali 570 nm z wykorzystaniem czytnika wielodetekcyjnego (Infinite Pro 200, Tecan) oraz wyliczenie stężenia fosfatydylocholiny w próbkach.

4.6. Oznaczenie zawartości tłuszczu w próbkach kału

Kał od zwierząt biorących udział w doświadczeniu zebrano w ciągu 7 ostatnich dni II etapu eksperymentu. Ze względu na fakt, że zwierzęta przebywały w klatce parami, próbki materiału pochodziły zawsze od dwóch osobników. Nie wpływało to jednak na otrzymane wyniki, gdyż analizowano średnie wartości tego parametru dla danej grupy eksperymentalnej. W celu odpowiedniego zabezpieczenia próbek, w tym okresie przechowywano je w temperaturze 4°C. Następnie materiał suszono w suszarce laboratoryjnej (SUP-100W Wamed) do stanu powietrznie suchego, po czym zmielono go przy użyciu komercyjnie dostępnego młynka do mielenia ziaren.

Zawartość tłuszczu w tak przygotowanych próbkach oznaczono wg metody Soxhleta, przy użyciu analizatora tłuszczu Soxtec Avanti 2055 (Foss-Tecator, Dania). Metoda ta polega na kilkugodzinnej ekstrakcji ciągłej tłuszczu z próbek kału za pomocą eteru

naftowego. Ilość wyekstrahowanego tłuszczu oblicza się wagowo. Analizę rozpoczynano od odważania około 0,8 g zmielonego kału do gilz ekstrakcyjnych oraz zważenia czystych naczynek aluminiowych, do których wlewano następnie po 50 ml eteru naftowego (AlfaChem). Tak przygotowane gilzy zakryte watą i naczynka umieszczano w analizatorze, w którym w 3 etapach przeprowadzano analizę główną, polegającą na:

- ekstrakcji we wrzącym eterze przez 25 minut (I etap),
- ekstrakcji w parach eteru (przy uniesionych gilzach ekstrakcyjnych) przez 40 minut (II etap),
- odparowaniu rozpuszczalnika przy zamkniętych kranikach (III etap).

Po wykonaniu tej części oznaczenia naczynka aluminiowe, w których znajdował się tłuszcz po ekstrakcji, suszono w suszarce przez 45 minut w temperaturze 105°C. Następnie naczynka te ostudzono z użyciem eksykatora i zważono na wadze elektronicznej (Sartorius). Próbka kału z każdej klatki oznaczona została w trzech powtórzeniach, z których obliczono średnią. Pomiary na wadze elektronicznej przeprowadzono z dokładnością do 0,001 g. Wynik obliczano z poniższego wzoru:

$$\text{Tłuszcz surowy \%} = \frac{\text{masa kolby z tłuszczem (g)} - \text{masa kolby (g)}}{\text{masa próbki (g)}} \times 100\%$$

4.7. Analiza ekspresji wybranych genów na poziomie transkrypcji

Pierwszym etapem analizy transkrypcji genów była izolacja RNA z fragmentu wątroby szczurów, który został pobrany i zabezpieczony podczas sekcji kończącej doświadczenie. Izolację wykonano z zastosowaniem odczynnika Extrazol (Blirt), zgodnie z metodyką producenta. Procedurę rozpoczynało przeprowadzenie homogenizacji tkanki (wykorzystaniem homogenizatora MagNA Lyser, Roche) i lizy komórek w środowisku w którym następuje denaturacja rybonukleaz. Kolejnym krokiem było dodanie chloroformu i wirowanie próbek (12 000 x g przez 15 minut w temperaturze 2-8°C.). Efektem tego był rozdział mieszaniny na trzy fazy. Całkowite RNA znajdowało się w fazie wodnej, która została wykorzystana w dalszych etapach, do których należała precypitacja izopropanolem wyizolowanego RNA oraz dokładne oczyszczenie osadu poprzez płukanie 75% alkoholem etylowym. Tak przygotowany materiał rozpuszczono w wodzie DEPC (tj. wodzie dejonizowanej, wolnej od nukleaz, dzięki obecności pirydyanu dietylu). Ocenę

ilościową i jakościową stężenia RNA wykonano przy pomocy spektrofotometru do pomiaru w mikroobjętościach (DS-11 DeNovix).

Następnie przeprowadzono syntezę cDNA na matrycy RNA przy użyciu komercyjnego zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Pierwszym jej etapem była standaryzacja ilości RNA do 1 µg, kolejno dodanie wody i starterów oligo-dt oraz inkubacja w temperaturze 65°C. Dalsze działania polegały na dodaniu mieszaniny reakcyjnej, na którą składał się bufor, nukleotydy oraz enzym odwrotna transkryptaza, co prowadziło do wywołania reakcji odwrotnej transkrypcji. Etap ten prowadzono z użyciem termocyklera gradientowego (MultiGene, Labnet) przez około 2 godziny.

Ostatnim krokiem w analizie ekspresji genów na poziomie transkrypcji było wykonanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time* PCR). Została ona przeprowadzona na urządzeniu Light Cycler 480 (Roche Diagnostics), przy użyciu sond UPL znakowanych fluorescencyjnie (Universal Probe Library; Real-Time Ready Assay, Roche Diagnostics) oraz zestawu do amplifikacji LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics). Dokładny skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 3. Analizowano poziom transkrypcji czterech genów, tj. *Pemt*, *Ppar γ*, *Srebp-1c*, *Fasn*, oraz dwóch genów referencyjnych, tj. *Actb*, *Hprt1*. Informacje na temat sekwencji niniejszych genów w bazie GenBank zaprezentowano w tabeli 4. Reakcję dla każdej próbki przeprowadzano w trzech powtórzeniach z użyciem 1 µl matrycy cDNA. Amplifikację genów przeprowadzono w wystandaryzowanych warunkach, tj. 10 minut aktywacji polimerazy w 95°C; 45 cykli w tym: 10 sekund denaturacji w 95°C, 30 sekund przyłączania starterów w 60°C i 1 sekunda elongacji w 72°C; oraz chłodzenia w 30 sekundach w temperaturze 40°C.

W celu ilościowej oceny produktu amplifikacji wyznaczono krzywe standardowe (dla każdego z genów). Relatywny poziom ekspresji genów został określony na podstawie analizy maksimum drugiej pochodnej z wykorzystaniem oprogramowania Roche.

Tab. 3. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji *real-time* PCR.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość [µl]
cDNA	2,5
Sonda UPL (<i>Universal ProbeLibrary probe</i>)	0,5
Master mix	5,0
H ₂ O DEPC	2,0
Łączna objętość mieszaniny	10

Tab. 4. Charakterystyka ampliconu zastosowanego dla analizowanych genów.

Symbol genu	Numer sekwencji w bazie GenBank	Długość ampliconu (nt)
<i>Pemt</i>	NM_013003.1	72
<i>Ppar γ</i>	NM_013124.3	76
<i>Srebp-1c</i>	NM_001276708.1	72
<i>Fasn</i>	NM_017332.1	75
<i>Actb</i>	NM_031144.3	72
<i>Hprt1</i>	NM_012583.2	61

4.8. Oznaczenie białek metodą Western Blot

W celu rozwinięcia i uszczegółowienia analizy ekspresji wyżej wspomnianych genów oznaczono białka PEMT (22 kDa), PPAR γ (57 kDa) oraz β -aktyny (41 kDa) metodą Western Blot. Pierwszym etapem tej analizy było wykonanie izolacji białek z wątroby szczurów. Do tego celu wykorzystano bufor RIPA, w skład którego wchodzi: 50 mmol Tris-HCl, pH 8,0 wraz z 150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% deoksycholanem sodu, 0,1% SDS, 10 mM NaF i 1 mM Na₃VO₄ (R0278, Sigma-Aldrich). Bufor ten został wzbogacony w gotowy koktajl inhibitorów proteazy (P8340, Sigma-Aldrich). Tkanę w ilości 50 mg przeniesiono do próbek wypełnionych ceramicznymi kulkami, następnie zalano 500 μ l przygotowanego roztworu RIPA, po czym poddano homogenizacji z wykorzystaniem homogenizatora laboratoryjnego (MagNA Lyser, Roche). Homogenat tkankowy wirowano (8,000 $\times$ g, 10 minut, w 4°C), po czym uzyskany supernatant zawierający białka cytoplazmatyczne i błonowe przeniesiono do nowych próbek typu Eppendorf. Kolejnym krokiem było oznaczenie całkowitej ilości białka w supernatancie za pomocą komercyjnego zestawu (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, USA). Oznaczenie wykonano zgodnie z protokołem producenta, a pomiar absorbancji przy długości fali 562 nm za pomocą czytnika wielodetekcyjnego (Infinite Pro 200, Tecan).

Każdą z analizowanych próbek przygotowano w taki sposób, aby zawierała 30 μ g białka. Próbki zgodnie z obliczeniami uzupełniono buforem RIPA, po czym dodano w stosunku 1:3 (w/v) 4x bufor obciążający i barwiący Laemmli (BioRad) wzbogacony β -merkaptetanolem (Sigma-Aldrich), zawierający czynnik denaturujący. Tak przygotowane próbki denaturowano przez 5 minut w 95°C.

Następnym krokiem w procedurze Western Blot było nałożenie próbek z równą ilością białka na żel poliakrylamidowy (składający się z dwóch części, tj. 4% żelu zagęszczającego oraz 12% żelu separującego) i przeprowadzenie rozdziału elektroforetycznego (tzw.

elektroforeza SDS-PAGE). Rozdział ten przeprowadzono w aparacie do elektroforezy białek (Mini-PROTEAN Tetra Cell, 4-Gel system, BioRad), pod napięciem 120 V przez ok. 1,5 h, w obecności buforu do elektroforezy. Na żel, razem z próbkami białek, nakładano marker umożliwiający identyfikację wielkości prążków (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards, 2-250 kDa, BioRad).

Kolejnym etapem niniejszej procedury był transfer póluchy białek z żelu na membranę PVDF (BioRad) w aparacie do transferu białek (Trans-Blot Turbo Transfer System, BioRad). Transfer ten wykonano przy natężeniu 0,3 A, przez 10 minut w obecności buforu Towbin. Wizualizację białek, a tym samym wydajność transferu, sprawdzono poprzez 1-minutową inkubację membrany w roztworze Ponceau S (Sigma-Aldrich). Następnie membranę z białkami inkubowano w 3% roztworze albuminy surowicy bydlęcej (BSA, Sigma-Aldrich) w buforze TBST (ang. *tris-buffered saline with Tween-20*) przez 1 h w temperaturze 4°C, w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał.

Dalszym krokiem była immunodetekcja pośrednia, podzielona na 4 etapy tj.:

1. inkubacja membrany z przeciwciałem I-rzędowym zawieszonym w buforze TBST, przez 24 h w 4°C:
 - dla białka PEMT (królicze przeciwciało poliklonalne, rozcieńczenie 1:1000; PA5-42383, Thermo Fisher Scientific),
 - dla białka PPAR γ (mysie przeciwciało monoklonalne, rozcieńczenie 1:1000; 419300, Thermo Fisher Scientific),
2. 3-krotne płukanie membrany w buforze TBST przez 10 min,
3. inkubacja z przeciwciałem II-rzędowym wyznakowanym enzymem (skierowane swoiście przeciwko przeciwciału I-rzędowemu) zawieszonym w buforze TBST przez 2 h w 4°C:
 - dla białka PEMT (przeciwciało anty-królicze, rozcieńczenie 1:10000; 31210, Thermo Fisher Scientific),
 - dla białka PPAR γ (przeciwciało anty-mysie, rozcieńczenie 1:4000; SA5-10265, Sigma-Aldrich),
4. 3-krotne płukanie membrany w buforze TBST przez 10 min.

Następnym etapem procedury było inkubowanie membrany z substratem (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific) dla enzymu z przeciwciała II-rzędowego. Detekcja sygnału chemiluminescencyjnego wykonana została za pomocą systemu ChemiDoc Touch Imaging (BioRad).

W celu w normalizacji poziomów wykrywanych białek, membranę po uprzednim 3-krotnym płukaniu w roztworze TBST inkubowano przez 24 h w 4°C z przeciwciałem I-rzędowym dla β -aktyny, stanowiącej białko referencyjne (jest to białko o stałym poziomie ekspresji w komórce). Po 3-krotnym przepłukaniu w roztworze TBST, membranę inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym przez 2 h w 4°C, po czym wykonano ponowną detekcję sygnału chemiluminescencyjnego, którą opisano powyżej. Do oznaczenia beta aktyny wykorzystano:

- przeciwciało I-rzędowe: mysie przeciwciało monoklonalne, rozcieńczenie: 1:5000 w 3% roztworze w TBST (ab8226, Abcam),
- przeciwciało II-rzędowe: przeciwciało anty-mysie, rozcieńczenie: 1:4000 w 3% roztworze w TBST (ab98808, Abcam).

Analizę densytometryczną prążków przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania firmy BioRad. Odczyt sygnału dla PPAR γ normalizowano względem sygnału dla białka referencyjnego – beta aktyny.

4.9. Oznaczenie białek metodą ELISA

Wykonano również oznaczenie ilościowe białek SREBP-1 (120 kDa) oraz FAS (272 kDa) w wątrobie szczurów. Ze względu na dużą masę cząsteczkową tych białek skorzystano z komercyjnie dostępnych testów ELISA (SREBP-1 - MBS040783, FAS - MBS706221; MyBioSource). Zasada działania tych zestawów była taka sama jak w przypadku opisanego powyżej oznaczenia lipoproteiny VLDL (w podrozdziale „4.5. Analiza stężenia wybranych parametrów biochemicznych”) i opierała się na tzw. metodzie „kanapkowej ELISA”. Każde oznaczenie wykonano w dwóch powtórzeniach zgodnie z protokołem przygotowanym przez producenta. Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika wielodetekcyjnego (Infinite Pro 200, Tecan).

4.10. Analiza statystyczna

Wyniki analizowanych parametrów uzyskane w poszczególnych grupach zostały przedstawione jako średnia i odchylenie standardowe. Wyjątek stanowi wykres obrazujący przyrosty masy ciała zwierząt, który ukazuje wyłącznie wartości średnie. Dla spożycia karmy w całym doświadczeniu podano także wartość minimalną i maksymalną.

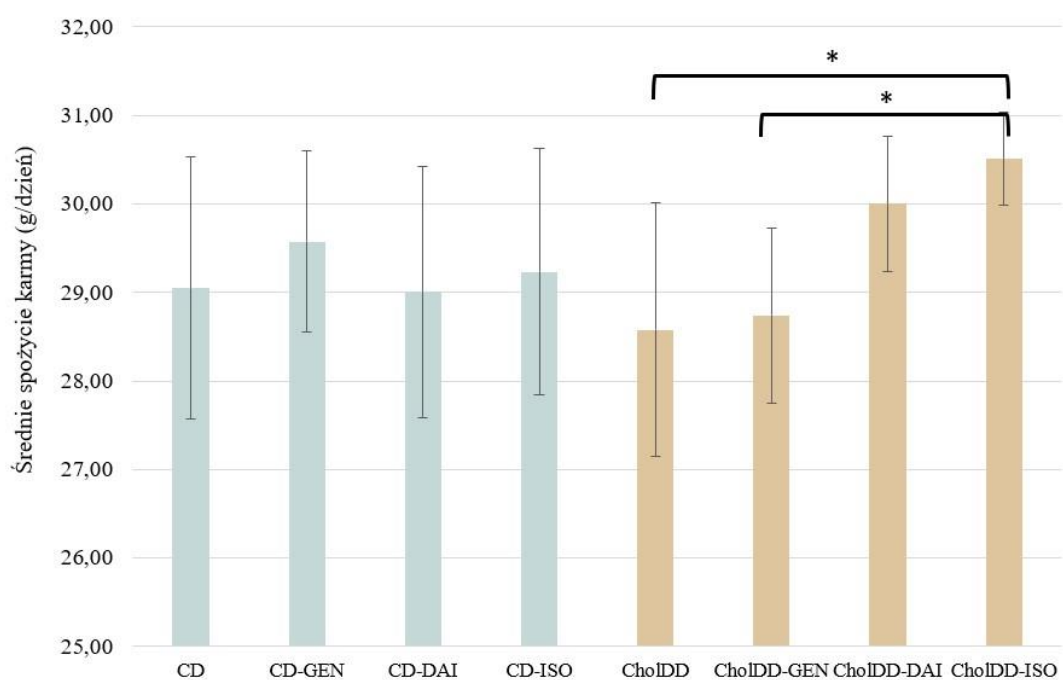
Wartości uzyskane w ramach pomiarów składu ciała zwierząt poddano analizie wariancji z powtórzonymi pomiarami. Sferyczność danych sprawdzono wykorzystując test Mauchly'ego. Jeśli założenia nie zostały spełnione, wykonano poprawkę Greenhouse-Geissera. Jeśli dla tej korekty uzyskano istotność statystyczną ($p < 0,05$), przeprowadzano analizę post hoc z wykorzystaniem testu Tukeya.

W przypadku pozostałych wyników rozkład danych sprawdzono za pomocą statystyki Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Browna-Forsythe'a. Jeśli założenia zostały spełnione średnie wartości w grupach zostały porównane z wykorzystaniem analizy wariancji. Gdy dla zmiennej uzyskano istotność statystyczną ($p < 0,05$), została wykonana analiza post hoc z wykorzystaniem testu Tukeya. Jeśli założenia nie zostały spełnione (rozkład danych bez normalności i/lub niejednorodność wariancji) wykorzystano nieparametryczny test rang Kruskala-Wallisa. Gdy dla zmiennej uzyskano istotność ($p < 0,05$) różnice pomiędzy grupami były analizowane poprzez wyliczenie wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich prób. Obliczenia zostały wykonane w programie *Statistica 13* (Statsoft, Polska).

5. Wyniki

5.1. Parametry ogólnożywieniowe i wzrostowe zwierząt

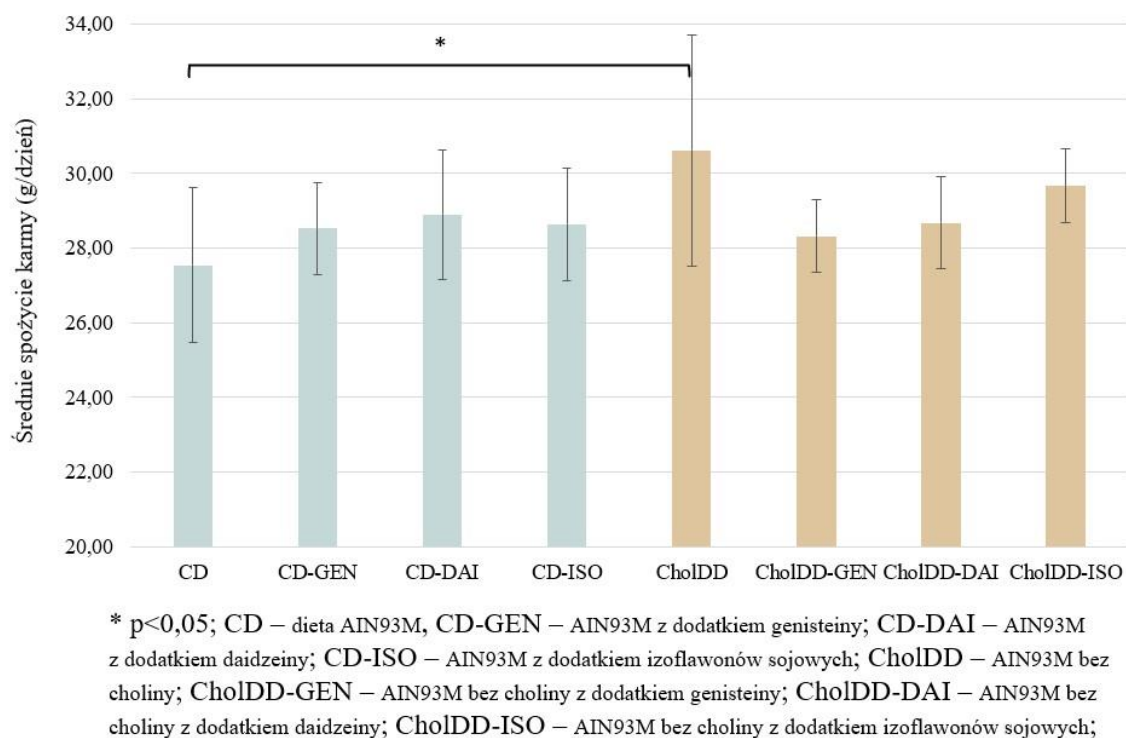
W ramach oceny parametrów ogólnożywieniowych w doświadczeniu *in vivo*, dokonano pomiarów spożycia karmy oraz obliczono efektywność żywienia, która wyraża przyrost masy ciała (g) przeliczony na 100 g spożytej paszy. Dla każdego z tych parametrów, w danej grupie zwierząt, obliczono i zaprezentowano na rycinach lub w tabeli średnią arytmetyczną wraz z odchyleniem standardowym. Dane zbierano na podstawie spożycia karmy w każdej klatce, przeliczając umowne spożycie na jedno zwierzę poprzez podzielenie wyników przez 2 (w każdej klatce znajdowały się po dwa osobniki). Średnie dzienne spożycie karmy w I etapie doświadczenia różniło się istotnie statystycznie między grupami ChoIDD-ISO i ChoIDD oraz ChoIDD-ISO i ChoIDD-GEN. W obu przypadkach spożycie paszy było istotnie wyższe dla grupy ChoIDD-ISO i wynosiło 30,51 g/dzień. Niniejsze wyniki zaprezentowano na rycinie 5.



* $p < 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; ChoIDD – AIN93M bez choliny; ChoIDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; ChoIDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; ChoIDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 5. Spożycie karmy w grupach szczurów – I etap doświadczenia.

Spożycie karmy w II etapie doświadczenia przedstawiono na rycinie 6. Różnicę istotną statystycznie w tym okresie trwania eksperymentu zaobserwowano jedynie między grupami CD i ChoI DD. Średnia wartość tego parametru na jedno zwierzę w grupie CD wynosiła 27,54 g/dzień, natomiast w grupie ChoI DD 30,62 g/dzień.



Ryc. 6. Spożycie karmy w grupach szczurów – II etap doświadczenia.

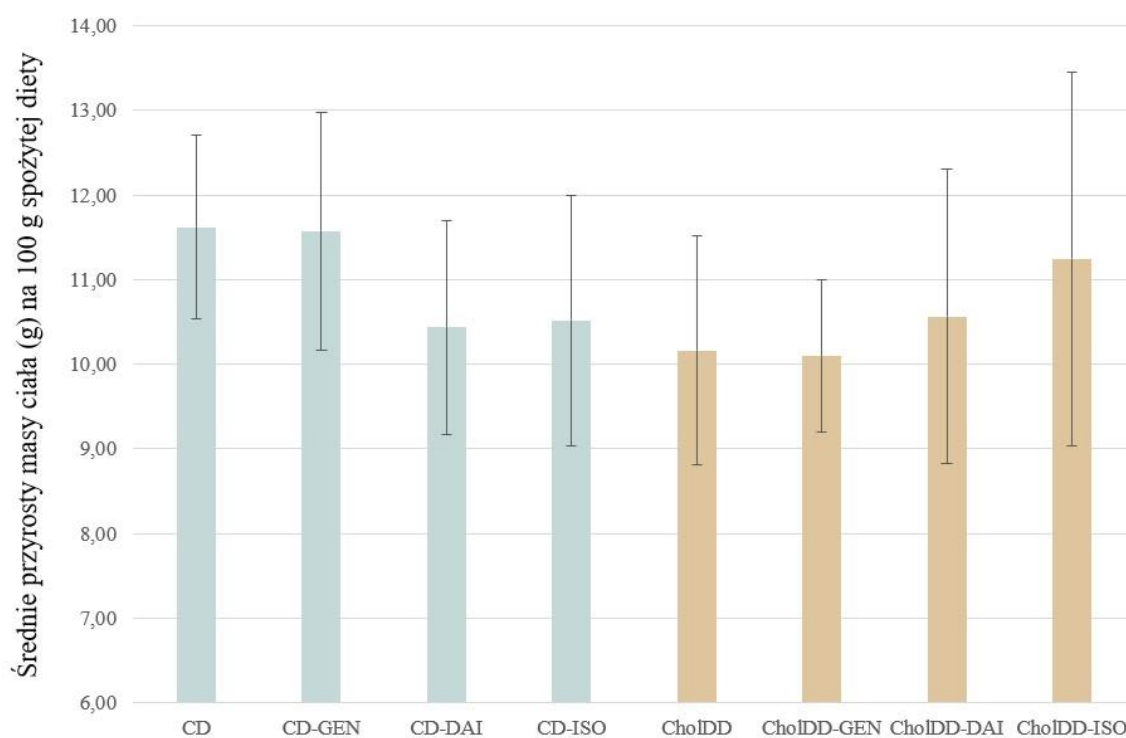
Biorąc pod uwagę dane dotyczące spożycia karmy w trakcie całego eksperymentu, zaobserwowano różnice istotne statystycznie wyłącznie między grupą CD a grupą ChoI DD. Wynik ten przedstawiono w tabeli 5, w której uwzględniono także wartości minimalne i maksymalne dla tego parametru. Uszczegóławiając, można zauważyć, iż w grupach spożywających karmę z prawidłową ilością choliny, średnie dzienne spożycie wynosiło 28,68 g, natomiast w grupach spożywających paszę z deficytem choliny 29,36 g.

Przez cały okres trwania doświadczenia zwierzęta spożywały dziennie średnio 26 – 32 g karmy dziennie na osobnika, co w przypadku samców w tym okresie rozwoju i takiej masie ciała przyjmuje się za normę.

Tab. 5. Spożycie karmy w grupach szczurów – całe doświadczenie (I i II etap).

Spożycie karmy w grupach (g/dzień)	CD	CD-GEN	CD-DAI	CD-ISO	ChoIDD	ChoIDD-GEN	ChoIDD-DAI	ChoIDD-ISO
	x ± SD							
	Min-Max							
	28,05 ± 1,86*	28,88 ± 1,10	28,94 ± 0,75	28,84 ± 1,28	29,94 ± 1,94*	28,46 ± 0,77	29,11 ± 0,75	29,94 ± 0,73
	26,38-31,34	27,45-30,09	28,17-30,25	26,92-30,40	26,63-32,19	27,37-29,50	28,19-30,20	28,70-30,70
* p<0,05; ANOVA analiza wariancji								

W przypadku oceny efektywności żywienia najniższą średnią wartość uzyskały zwierzęta z grupy ChoIDD-GEN (10,10), natomiast najwyższą zwierzęta z grupy CD (11,62), a więc te które spożywały dietę zbilansowaną bez żadnych dodatków. Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie między poszczególnymi grupami. Dokładne wyniki zaprezentowano na rycinie 7.



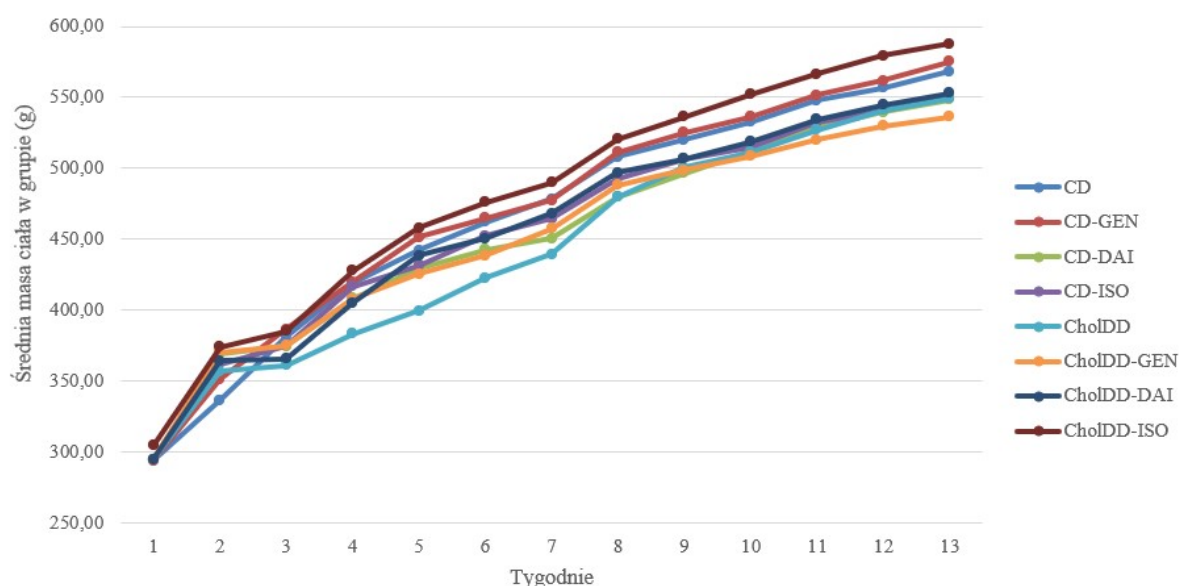
p>0,05; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; ChoIDD – AIN93M bez choliny; ChoIDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; ChoIDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; ChoIDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 7. Efektywność żywienia w poszczególnych grupach szczurów.

W ramach parametrów wzrostowych analizie poddano przyrost masy ciała zwierząt w trakcie trwania doświadczenia (rycina 8), a także masę względną narządów pobranych podczas sekcji (tabela 6). Przyrosty masy ciała wzięte pod uwagę w analizie statystycznej obliczono poprzez odjęcie wyniku z pierwszego pomiaru, w dniu rozpoczynającym eksperyment, od ostatniego pomiaru, który następował w dniu sekcji. Masa względna narządów wyraża % całkowitej masy ciała jaki stanowi dany narząd. W niniejszym doświadczeniu oceniono masę wątroby, śledziony, nerek, serca, mózgu i jąder.

Średnie wartości przyrostów masy ciała nie różniły się istotnie statystycznie między grupami i wynosiły od 241,10 g do 283,10 g. Najwyższe średnie przyrosty odnotowano w grupach CD-GEN (281 g) oraz CholDD-ISO (283,10 g), natomiast najniższe w grupach CholDD-GEN (241,10 g) oraz CD-DAI (253,70 g). Na rycinie 8 uwzględniono wyniki wszystkich pomiarów masy ciała wykonanych w trakcie trwania doświadczenia, obrazując zmiany między poszczególnymi tygodniami. Analizując przyrosty masy ciała pojedynczych zwierząt, a nie średniej dla grupy mamy do czynienia z zakresem wartości 161 – 375 g.

Brak różnic istotnych statystycznie między grupami zaobserwowano również dla średnich mas względnych narządów. Wartości tych parametrów były bardzo zbliżone między poszczególnymi grupami, bez potencjalnych tendencji – tabela 6.



$p > 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 8. Przyrost masy ciała w grupach szczurów.

Tab. 6. Średnie masy względne narządów szczurów z różnych grup.

	CD	CD-GEN	CD-DAI	CD-ISO	CholDD	CholDD-GEN	CholDD-DAI	CholDD-ISO	ANOVA
Wątroba [%]	3,50 ± 0,26	3,67 ± 0,33	3,87 ± 0,29	3,79 ± 0,23	3,78 ± 0,55	3,74 ± 0,24	3,81 ± 0,28	3,59 ± 0,31	p>0,05
Śledziona [%]	0,20 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,03	p>0,05
Nerki [%]	0,68 ± 0,05	0,69 ± 0,05	0,74 ± 0,06	0,72 ± 0,07	0,72 ± 0,08	0,71 ± 0,04	0,70 ± 0,08	0,69 ± 0,04	p>0,05
Serce [%]	0,29 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,29 ± 0,03	p>0,05
Mózg [%]	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,02	p>0,05
Jądra [%]	0,81 ± 0,10	0,84 ± 0,15	0,88 ± 0,05	0,87 ± 0,08	0,87 ± 0,06	0,84 ± 0,07	0,81 ± 0,09	0,86 ± 0,17	p>0,05

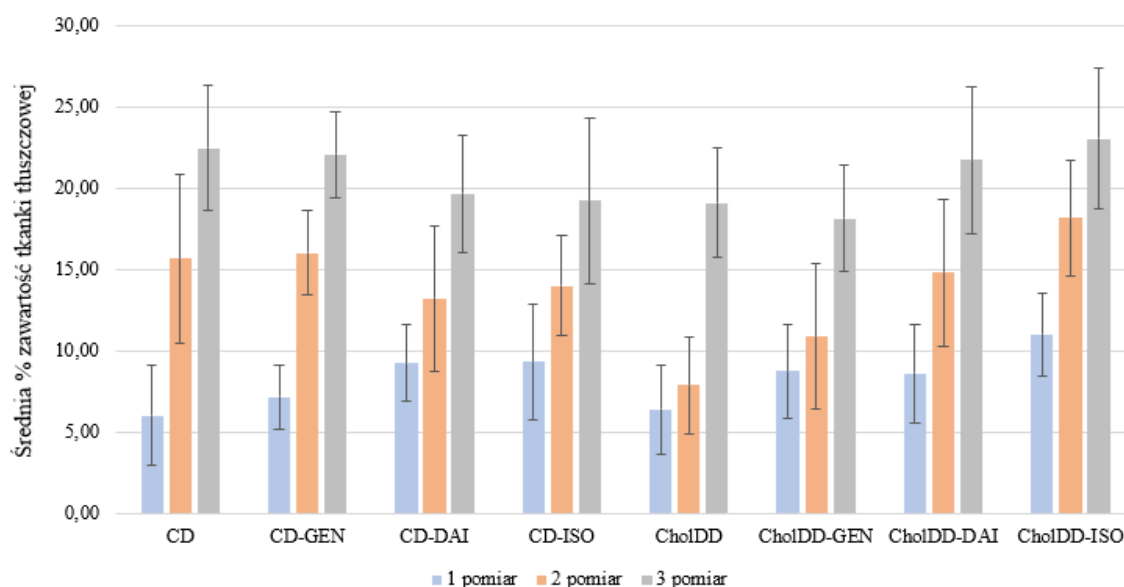
ANOVA analiza wariancji;

5.2. Analiza składu ciała zwierząt

Rozwinięciem i wzbogaceniem analizy parametrów ogólnożywnieniowych, których wyniki zebrano w trakcie doświadczenia *in vivo*, było wykonanie oceny składu ciała zwierząt. Pomiary wykonano w trzech punktach czasowych, istotnych z punktu widzenia schematu badania, tj. w dniu rozpoczęcia doświadczenia, na koniec I etapu i na koniec II etapu. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała szereg różnic zarówno między poszczególnymi grupami w ramach tych samych punktów czasowych, jak i wewnątrz grup w różnych punktach czasowych. Średnią zawartość tkanki tłuszczowej w poszczególnych grupach zobrazowano na rycinie 9, natomiast średnią zawartość beztłuszczowej masy ciała na rycinie 10. Można zauważyć, że wraz z postępem trwania doświadczenia zawartość tkanki tłuszczowej zwiększała się wśród zwierząt we wszystkich analizowanych grupach. Przekładało się to na zmniejszenie beztłuszczowej masy ciała, ale dopiero między drugim a trzecim pomiarem. Co ciekawe różnice między grupami w zawartości beztłuszczowej masy ciała między pierwszym, a drugim pomiarem były niewielkie. W części grup nastąpiło nawet niewielkie zwiększenie tej wartości w drugim pomiarze. Może to wynikać z faktu, że między pierwszym a drugim pomiarem był krótszy odstęp czasu (4 tygodnie), niż między drugim a trzecim (8 tygodni).

Skupiając się na wynikach uzyskanych w ramach 3 pomiaru, tj. na zakończenie doświadczenia, nie odnotowano statystycznie istotnych różnic między grupami w zawartości tkanki tłuszczowej. Średnia wartość tego parametru mieściła się w zakresie od 18,15% dla grupy CholDD-GEN do 23,03% w grupie CholDD-ISO. Różnice istotne statystycznie wykazano natomiast w zawartości beztłuszczowej masy ciała, również w 3 pomiarze. Występowały one między grupą CD i CD-GEN (kolejno 59,52% i 59,70%) a grupą CholDD-GEN (67,45%) oraz grupami CholDD-GEN (67,45%) i CholDD-ISO

(58,21%). W tym punkcie czasowym grupa CholDD-GEN charakteryzowała się najwyższą wartością beztłuszczowej masy ciała i najniższą zawartością tkanki tłuszczowej w porównaniu do pozostałych grup.



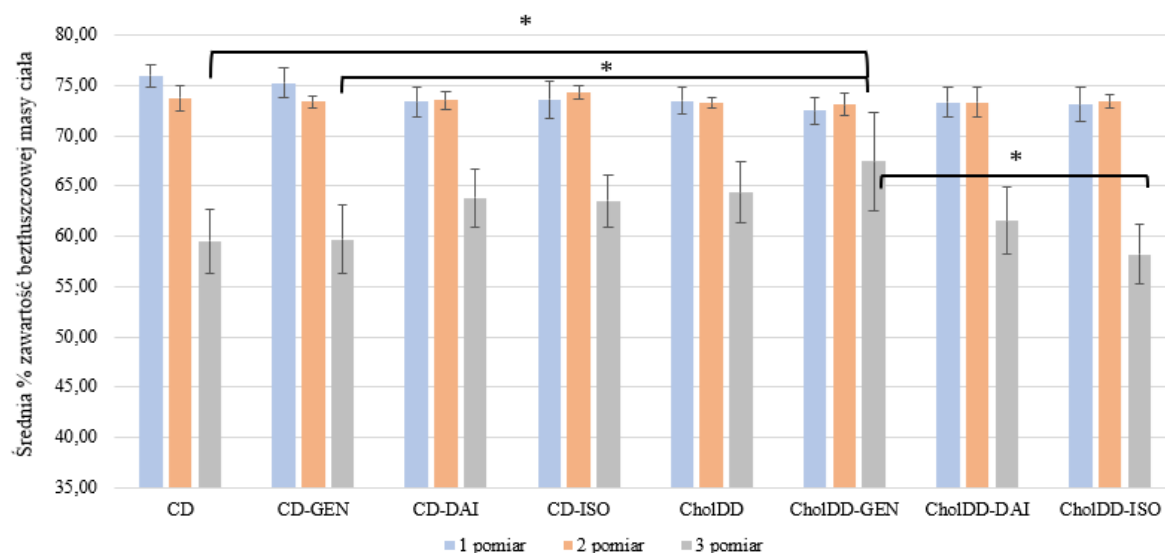
Analiza statystyczna przeprowadzona dla pomiaru nr 3 - $p > 0,05$

CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny;

CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny;

CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 9. Zawartość tkanki tłuszczowej w różnych grupach szczurów wykorzystanych w doświadczeniu.



*Analiza statystyczna przeprowadzona dla pomiaru nr 3 - * $p < 0,05$*

CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 10. Zawartość beztłuszczowej masy ciała w różnych grupach szczurów wykorzystanych w doświadczeniu.

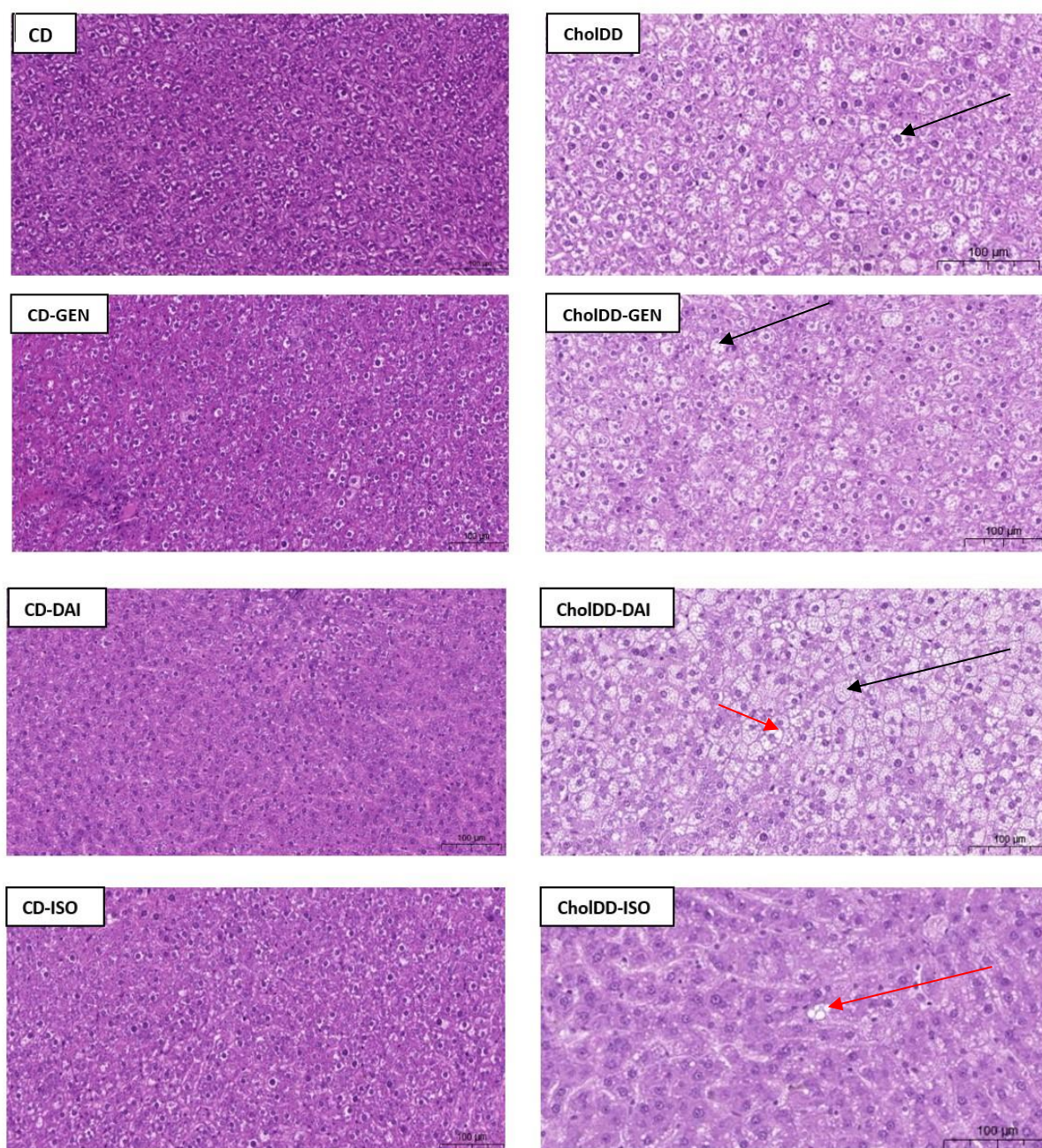
5.3. Analiza histologiczna wątroby szczurów

Wątroby pobrane od zwierząt w trakcie sekcji zostały podzielone na kilka fragmentów, które po odpowiednim zabezpieczeniu poddano dalszym analizom, w tym ocenie histologicznej.

W pierwszym etapie dokonano oceny makroskopowej, która nie wykazała wyraźnych różnic między narządami w poszczególnych grupach. Następnie tkanki zatopione w bloczkach parafinowych zostały pocięte przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości 6 μm , co pozwoliło na wykonanie pogłębionych analiz histologicznych. W tym celu wykonano jedną z najczęściej stosowanych w histopatologii metodę barwienia tkanek przy użyciu hematoksyliny i eozyny, pozwalając na uwidocznienie podstawowych struktur komórkowych. Ostatnim krokiem analiz była obserwacja mikroskopowa wybarwionych skrawków oraz archiwizacja otrzymanych rezultatów. Przykładowe zdjęcia mikroskopowe preparatów przedstawiono na rycinie 11.

Pogłębiona analiza mikroskopowa wykazała charakterystyczne zmiany w morfologii hepatocytów, w preparatach pochodzących od zwierząt z grup karmionych

dieta z deficytem choliny (CholDD). Najczęstsze obserwowane zmiany morfologiczne związane były z powiększeniem (wakuolizacją) hepatocytów oraz akumulacją w nich drobnych kropeł lipidów. Mikropęcherzykowe zmiany tłuszczowe hepatocytów zaobserwowano w grupach CholDD, CholDD-GEN, CholDD-DAI, podczas gdy w grupie CholDD-ISO zaobserwowano zmiany makropęcherzykowe. Zmiany mikropęcherzykowe są prawdopodobnie odzwierciedleniem procesów obejmujących zaburzenia mitochondrialne. Ponadto wakuolizacja hepatocytów związana jest także z uciskiem i wymuszonym przemieszczeniem jąder komórkowych na obwód zmienionych hepatocytów. Wykazano także nieznaczne ilości poliploidalnych jąder w komórkach wątrobowych. Natomiast nie wykazano megamitochondriów w żadnej z analizowanych grup. W grupach CD, czyli u zwierząt spożywających dietę z prawidłową zawartością choliny, morfologia komórek wątroby oceniana jest jako prawidłowa. Istotny jest również fakt, że zarówno w obrębie grup CD, jak i grup CholDD nie występują różnice w budowie komórek wątroby, zależne od dodatku do diety wybranych izoflawonów sojowych.



CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; ChoIDD – AIN93M bez choliny; ChoIDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; ChoIDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; ChoIDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

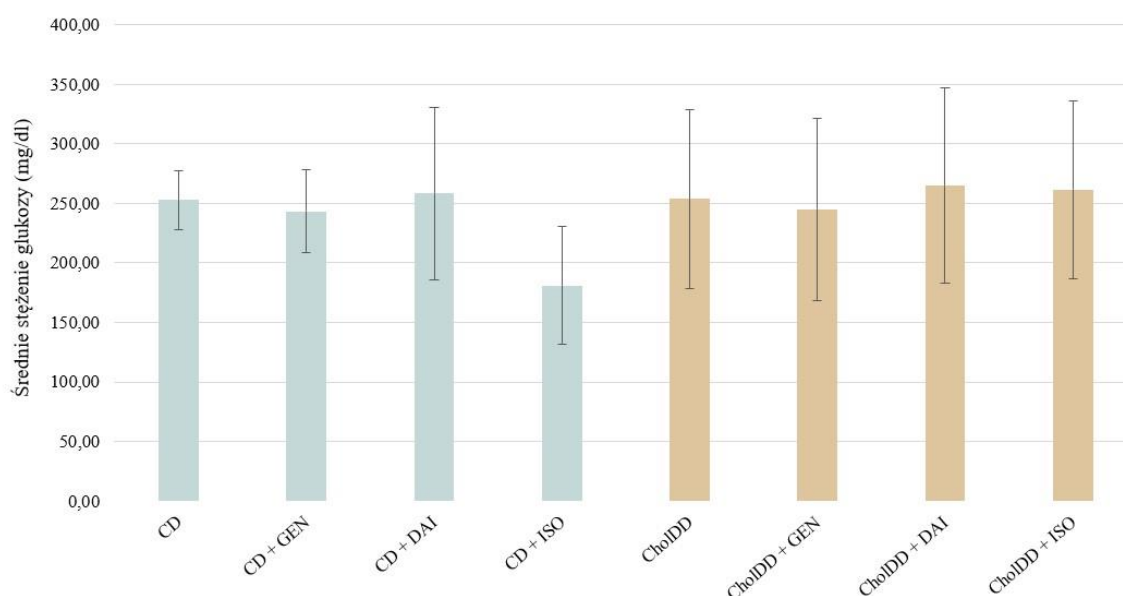
Ryc. 11. Obraz mikroskopowy wątroby szczurów (x10.0), z zastosowaniem metody barwienia hematoksyliną i eozyną.

Kolorem niebieskim wybarwiono jądra komórkowe, cytoplazma wybarwiona jest kontrastowo kolorem różowym. Czarnymi strzałkami zaznaczono wakuolizację hepatocytów, natomiast czerwonymi drobnymi kropkami lipidowe wewnątrz komórek.

5.4. Analiza wybranych parametrów biochemicznych

W celu oceny wpływu zastosowanych diet oraz dodatków izoflawonów sojowych oznaczono w krwi i tkankach parametry związane z metabolizmem glukozy, lipidów oraz funkcjonowaniem wątroby.

Średnie stężenie glukozy w surowicy krwi w analizowanych grupach przedstawiono na rycinie 12. Najwyższy średni poziom zaobserwowano w grupie CholDD+DAI, tj. 264,84 mg/dl, natomiast najniższy w grupie CD-ISO, tj. 181,08 mg/dl. Mimo różnicy na poziomie 83 jednostek, wartości uzyskane w poszczególnych grupach nie różniły się między sobą istotnie statystycznie. Poza grupą CD-ISO średni poziom tego markera zawierał się w przedziale 243 -265 mg/dl.

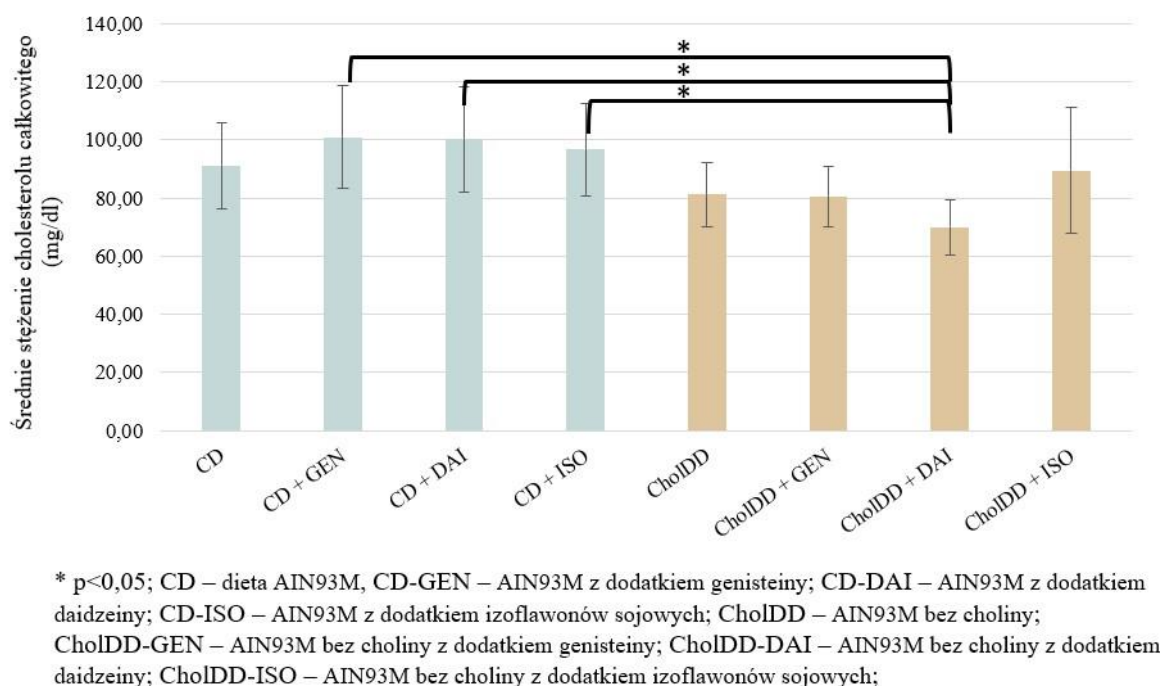


$p > 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 12. Stężenie glukozy w surowicy krwi różnych grup szczurów.

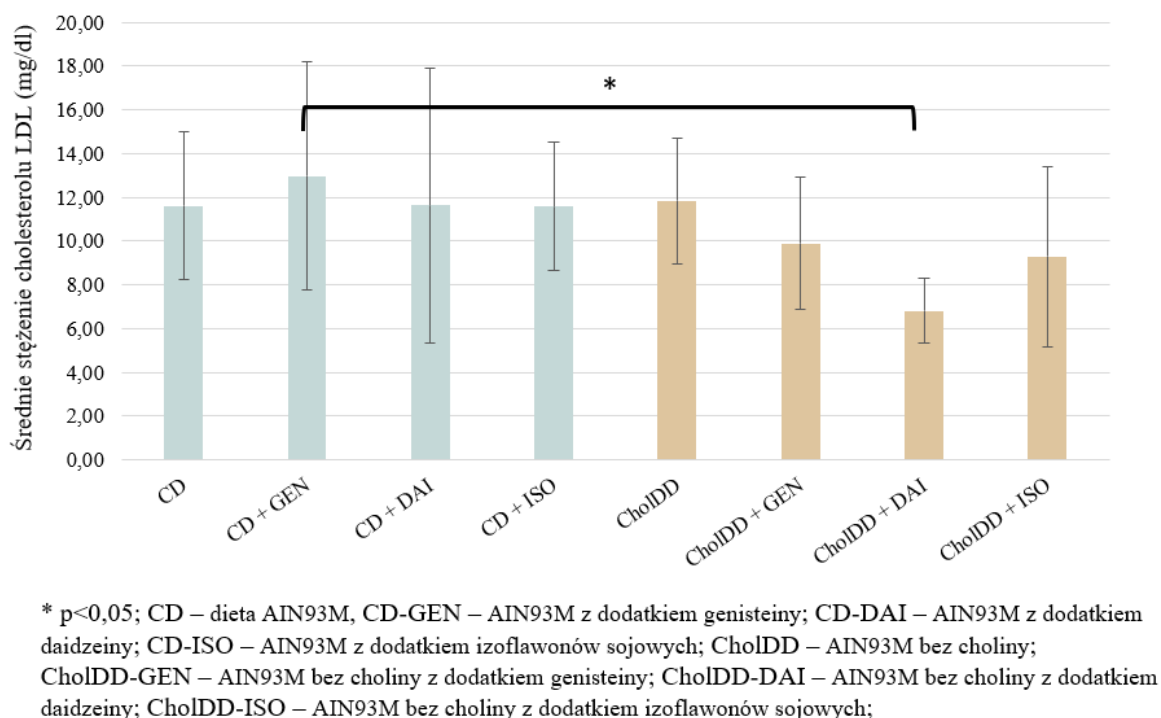
W surowicy krwi oznaczono także profil lipidowy, tj. stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL i HDL oraz triacylogliceroli. W przypadku cholesterolu całkowitego zaobserwowano różnice istotne statystycznie między grupą CholDD-DAI (70,12 mg/dl) a grupami CD-GEN (101,07 mg/dl), CD-DAI (100,23 mg/dl) oraz CD-ISO (96,72 mg/dl), czyli wszystkimi grupami spożywającymi dietę o prawidłowej podaży choliny z poszczególnymi dodatkami izoflawonów sojowych. Różnica ta wynosi

około 30 jednostek, a więc $\frac{1}{3}$ uzyskiwanych wartości w grupach CD. W grupach CholDD spożywających dietę pozbawioną choliny z/bez dodatków izoflawonów sojowych zaobserwowano sumarycznie niższe wartości tego parametru, niż w przypadku grup CD. Średnia dla grup CholDD wynosiła 80,39 mg/dl, natomiast dla grup CD 97,31 mg/dl. Omówione wyniki przedstawiono na rycinie 13.



Ryc. 13. Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi różnych grup szczurów.

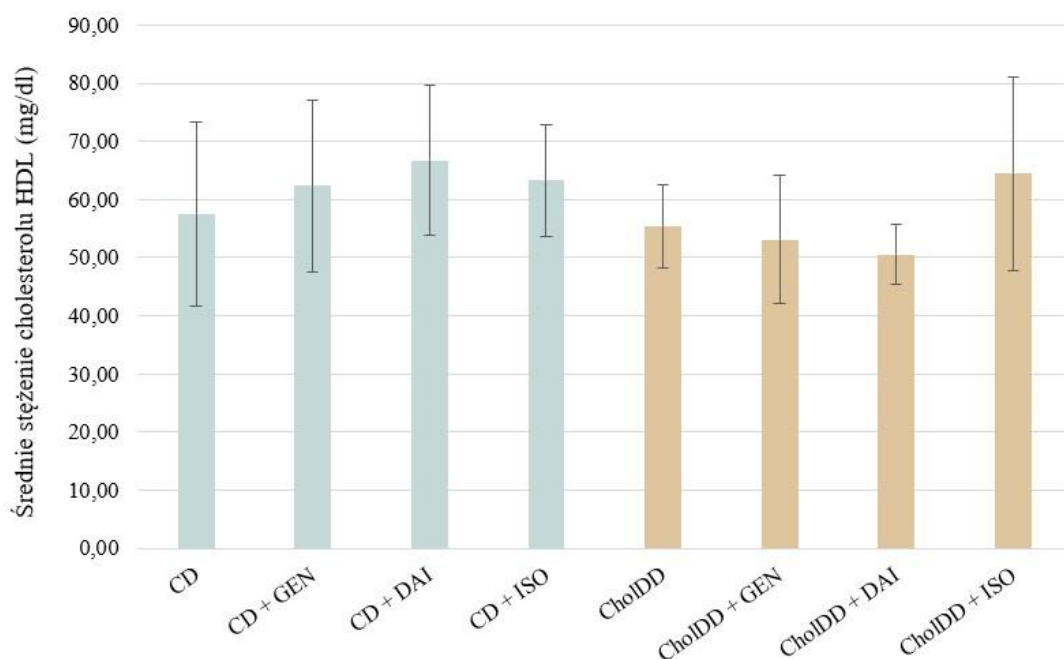
Różnice istotne statystycznie zaobserwowano także w przypadku stężenia cholesterolu frakcji LDL między grupą CD-GEN (12,98 mg/dl) a grupą CholDD-DAI (6,81 mg/dl). Warto zauważyć, że jest to prawie dwukrotna różnica stężenia. Grupa CholDD-DAI charakteryzowała się najniższą wartością tego parametru wśród wszystkich analizowanych grup. W pozostałych dwóch grupach CholDD z dodatkami izoflawonów sojowych (tj. CholDD-GEN i CholDD-ISO) średnie stężenie cholesterolu frakcji LDL nie przekroczyło wartości 10 mg/dl, podczas gdy we wszystkich grupach CD osiągnęło wartości powyżej 11 mg/dl. Uzyskane wyniki obrazuje rycina 14.



Ryc. 14. Stężenie cholesterolu frakcji LDL w surowicy krwi różnych grup szczurów.

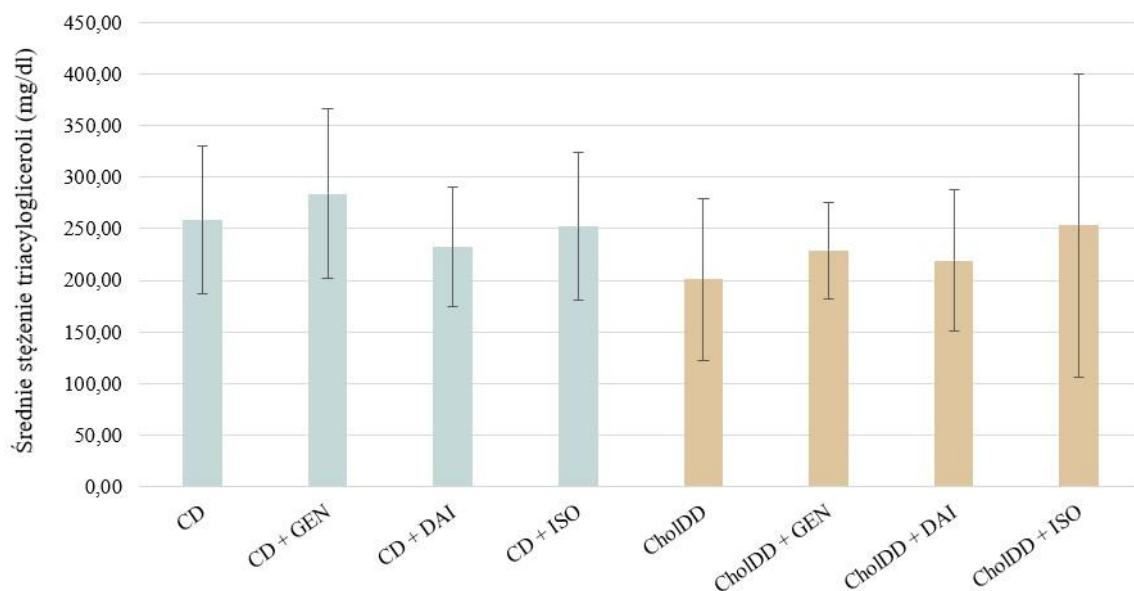
Na rycinach 15 i 16 przedstawiono wartości stężeń cholesterolu frakcji HDL i TG. Zarówno w przypadku pierwszego, jak i drugiego parametru nie wykazano różnic istotnych statystycznie między grupami. Najwyższe wartości stężenia cholesterolu frakcji HDL uzyskano w grupach CD-DAI (66,69 mg/dl) oraz CholDD-ISO (64,49 mg/dl), natomiast najniższe w grupach CholDD-GEN (53,09 mg/dl) i CholDD-DAI (50,55 mg/dl). Średni poziom cholesterolu frakcji HDL dla grup spożywających dietę o prawidłowej zawartości choliny wynosił 62,44 mg/dl, natomiast dla grup spożywających karmę pozbawioną choliny 55,87 mg/dl.

W przypadku stężenia TG, mimo braku istotności statystycznej ciekawe wydaje się porównanie grupy spożywającej dietę o prawidłowej podaży choliny (CD), w której wartość tego parametru wynosiła 258,41 mg/dl, z grupą spożywającą taką samą dietę, tylko z deficytem choliny (CholDD), w której wynosiła ona 200,73 mg/dl i była najniższym wynikiem wśród wszystkich analizowanych grup. Interesujące jest także porównanie grupy CD-ISO i grupy CholDD-ISO, czyli grup różniących się zawartością choliny w diecie, ale z dodatkiem ekstraktu izoflawonów sojowych. W obu tych grupach zaobserwowano taką samą wartość tego parametru, tj. około 252 mg/dl.



$p > 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; ChoIDD – AIN93M bez choliny; ChoIDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; ChoIDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; ChoIDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 15. Stężenie cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi różnych grup szczurów.

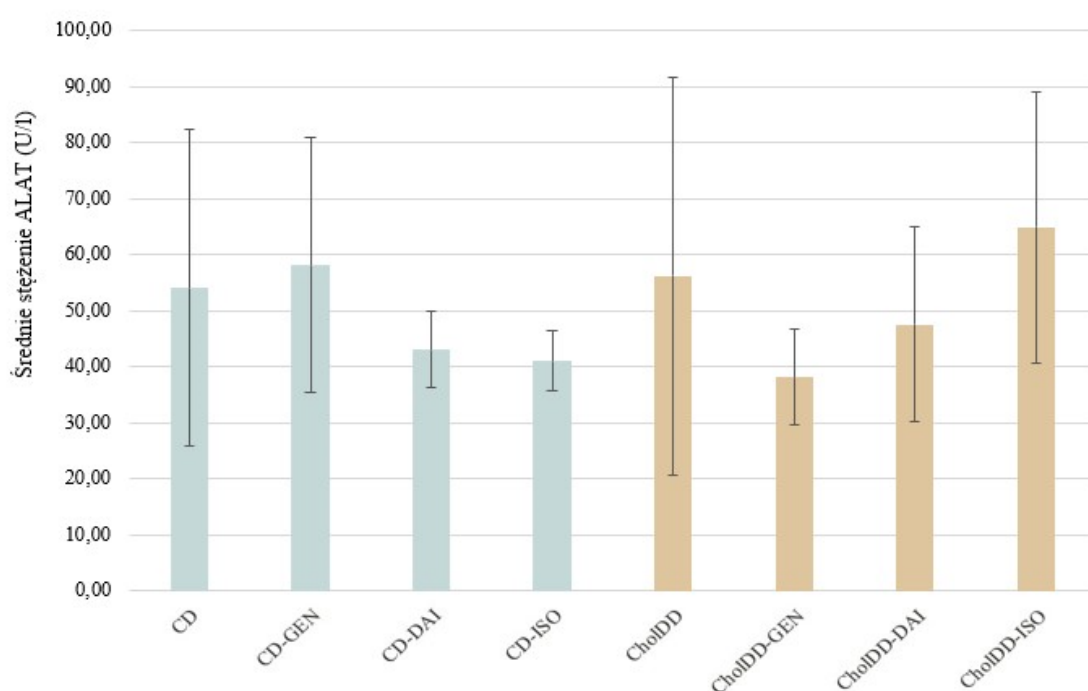


$p > 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; ChoIDD – AIN93M bez choliny; ChoIDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; ChoIDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; ChoIDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 16. Stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi różnych grup szczurów.

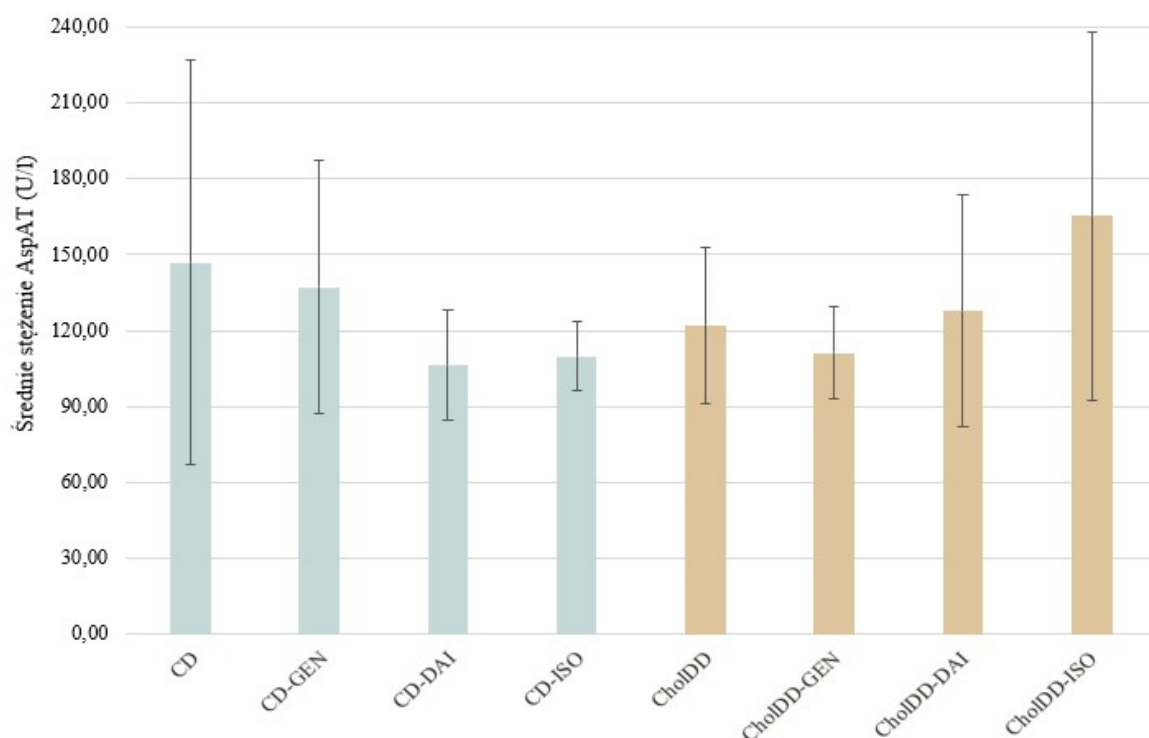
Chcąc ocenić funkcjonowanie wątroby wykonano oznaczenia stężenia enzymów wątrobowych w surowicy krwi, do których należą: ALAT i AspAT. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 17 i 18. Zarówno w przypadku stężenia ALAT, jak i AspAT nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie między badanymi grupami. Najniższe wartości tych parametrów zaobserwowano u grup CD-DAI, CD-ISO oraz CholDD-GEN, natomiast najwyższe u grup CD-GEN i CholDD-ISO. Zakres średnich wartości dla ALAT we wszystkich grupach wynosi 38,19 – 64,94 U/l, natomiast dla AspAT 106,26 – 165,58 U/l. Mimo dużych różnic między grupami o najniższych i najwyższych poziomach tych markerów, ich stężenia sumarycznie dla wszystkich grup CD, w odniesieniu do grup CholDD kształtują się na bardzo zbliżonym poziomie. Mianowicie:

- dla ALAT: grupy CD – 49,10 U/l; grupy CholDD – 51,73 U/l
- dla AspAT: grupy CD – 125,05 U/l; grupy CholDD – 131,68 U/l



$p > 0,05$; CD – dieta AIN93M; CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

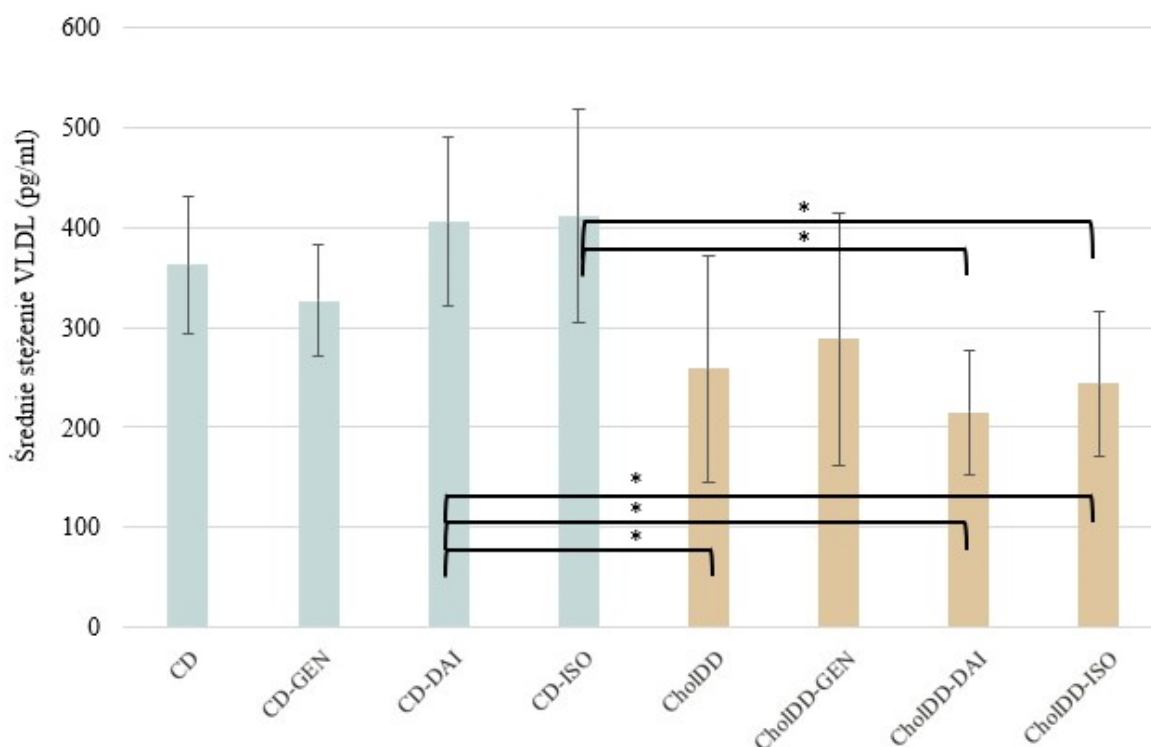
Ryc. 17. Stężenie aminotransferazy alaninowej w surowicy krwi różnych grup szczurów.



$p > 0,05$; CD – dieta AIN93M; CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 18. Stężenie aminotransferazy asparaginianowej w surowicy krwi różnych grup szczurów.

W surowicy krwi pozyskanej od zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu oznaczono także stężenie VLDL. Wartości tego parametru przedstawiono graficznie na rycinie 19. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice między grupą CD-DAI (405,34 pg/ml) spożywającą dietę z prawidłową zawartością choliny i dodatkiem daidzeiny a grupami CholDD (258,99 pg/ml), CholDD-DAI (215,01 pg/ml) i CholDD-ISO (243,59 pg/ml), które spożywały dietę pozbawioną choliny bez dodatku izoflawonów sojowych lub z dodatkiem daidzeiny lub ekstraktu izoflawonów sojowych. Różnice istotne statystycznie stwierdzono także między grupą CD-ISO (411,13 pg/ml) spożywającą dietę z prawidłową zawartością choliny i dodatkiem ekstraktu izoflawonów sojowych, a grupami CholDD-DAI i CholDD-ISO. Można zatem zauważyć, że różnice między dwiema grupami z najwyższym poziomem tego markera, tj. CD-DAI i CD-ISO są prawie dwukrotnie wyższe od tych zareportowanych dla grup CholDD, CholDD-DAI oraz CholDD-ISO.



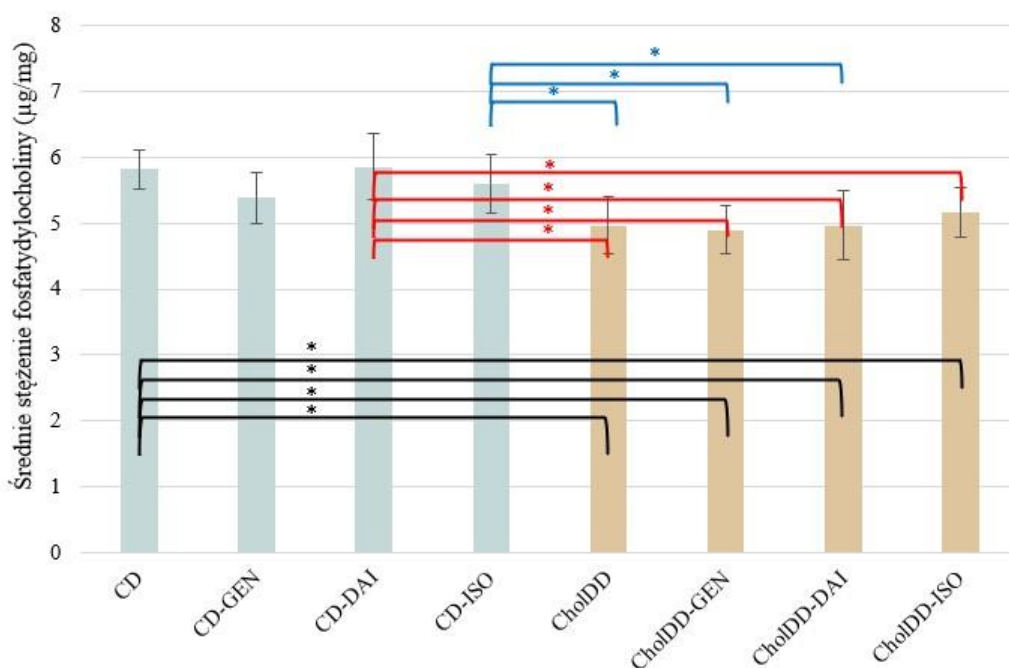
* $p < 0,05$; CD – dieta AIN93M; CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 19. Stężenie VLDL w surowicy krwi różnych grup szczurów.

Istotnym parametrem, którego wyniki są niezbędne do przedyskutowania postawionej hipotezy badawczej jest stężenie fosfatydylocholiny w wątrobie badanych zwierząt (rycina 20). Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała szereg różnic między poszczególnymi grupami. Istotne statystycznie różnice odnotowano między:

- grupą CD a wszystkimi grupami spożywającymi dietę z deficytem choliny, a więc grupami CholDD, CholDD-GEN, CholDD-DAI, CholDD-ISO, przy czym grupa CD ma istotnie wyższy poziom fosfatydylocholiny,
- grupą CD-DAI a wszystkimi grupami spożywającymi dietę z deficytem choliny, a więc grupami CholDD, CholDD-GEN, CholDD-DAI, CholDD-ISO, przy czym grupa CD-DAI ma istotnie wyższy poziom fosfatydylocholiny,
- oraz grupą CD-ISO a grupami CholDD, CholDD-GEN i CholDD-DAI, przy czym grupa CD-ISO ma istotnie wyższy poziom fosfatydylocholiny.

Co ciekawe nie zaobserwowano różnic między grupą CD-ISO a jej odpowiednikiem z deficytem choliny i również dodatkiem ekstraktu izoflawonów sojowych, czyli grupą CholDD-ISO. Zakres wartości uzyskanych we wszystkich grupach dla tej substancji wynosił 4,90 – 5,86 µg/mg.

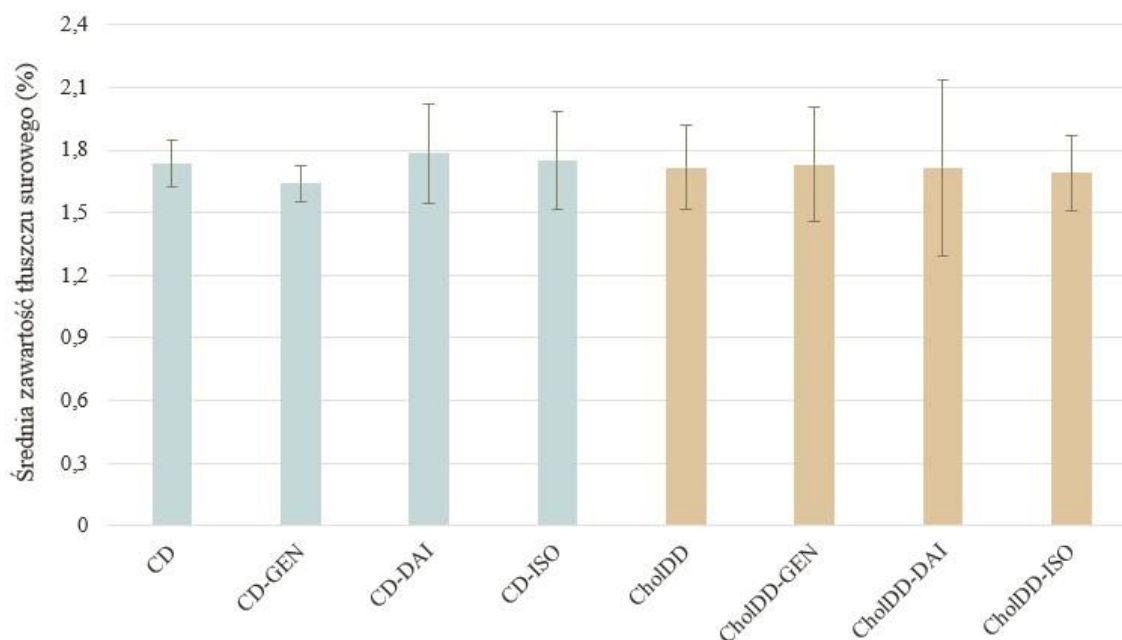


* $p < 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 20. Stężenie fosfatydylocholiny w wątrobie szczurów z różnych grup.

5.5. Oznaczenie zawartości tłuszczu w próbkach kału

W celu oceny wydalania tłuszczów u zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu wykonano oznaczenie zawartości tłuszczu surowego w zebranych próbkach kału. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinie 21. Średnie wartości tego parametru dla poszczególnych grup mieściły się w wąskim przedziale 1,6-1,8% i nie różniły się między sobą istotnie statystycznie. Zbliżony był także uśredniony wynik dla wszystkich grup spożywających dietę z prawidłową zawartością choliny, w porównaniu do grup przyjmujących paszę pozbawioną choliny.



$p > 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 21. Zawartość tłuszczu surowego w próbkach kału różnych grup szczurów.

5.6. Analiza ekspresji wybranych genów na poziomie transkrypcji oraz translacji

5.6.1. Transkrypcja

W wątrobach szczurów oznaczono relatywny poziom transkrypcji czterech wybranych genów, tj. *Pemt*, *Ppar γ* , *Srebp-1c*, *Fasn*, oraz dwóch genów referencyjnych, tj. *Actb*, *Hprt1*. Poziom ekspresji genów referencyjnych był niezbędny do wykonania obliczeń i normalizacji wyników uzyskanych dla wybranych genów.

Wartości relatywnego poziomu ekspresji genu *Pemt* przedstawiono na rycinie 22. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała szereg różnic między poszczególnymi grupami. Istotnie statystycznie różnice stwierdza się między:

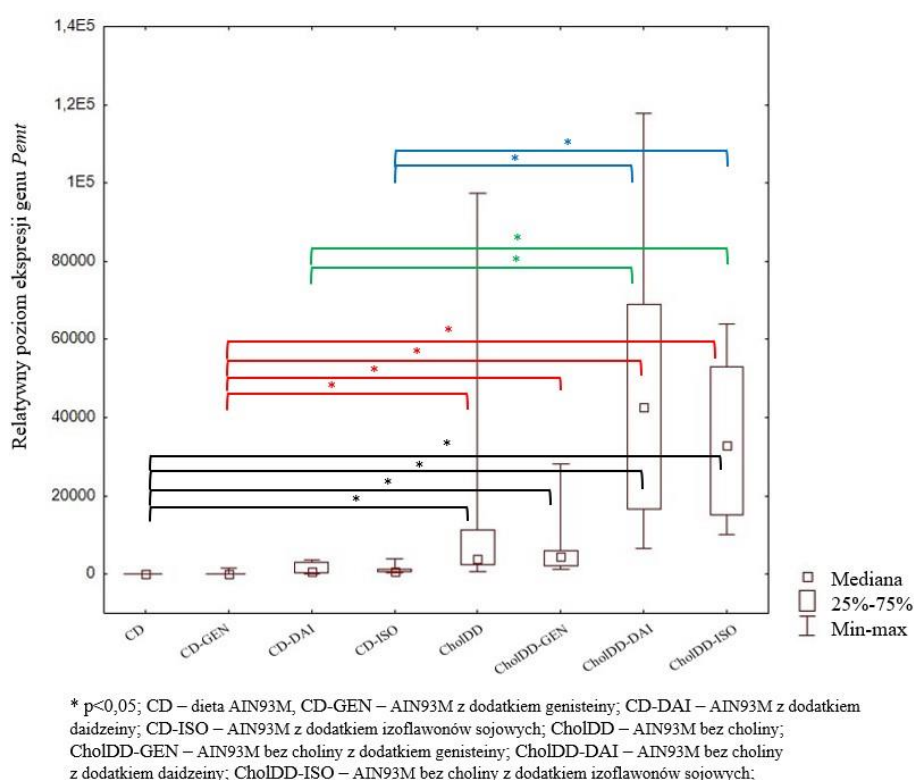
- grupą CD a wszystkimi grupami spożywającymi dietę z deficytem choliny, a więc grupami CholDD, CholDD-GEN, CholDD-DAI, CholDD-ISO,
- grupą CD-GEN a wszystkimi grupami spożywającymi dietę z deficytem choliny, a więc grupami CholDD, CholDD-GEN, CholDD-DAI, CholDD-ISO,

- grupą CD-DAI a grupą spożywającą dietę z deficytem choliny i dodatkiem daidzeiny, tj. CholDD-DAI lub dodatkiem ekstraktu izoflawonów sojowych, tj. CholDD-ISO,
- grupą CD-ISO a grupą spożywającą dietę z deficytem choliny i dodatkiem daidzeiny, tj. CholDD-DAI lub dodatkiem ekstraktu izoflawonów sojowych, tj. CholDD-ISO.

Co istotne opisane powyżej różnice były na poziomie kilku rzędów wielkości. Wyższe wyniki tego parametru uzyskano w grupach CholDD. Przykładowo średnia wartość tego parametru była:

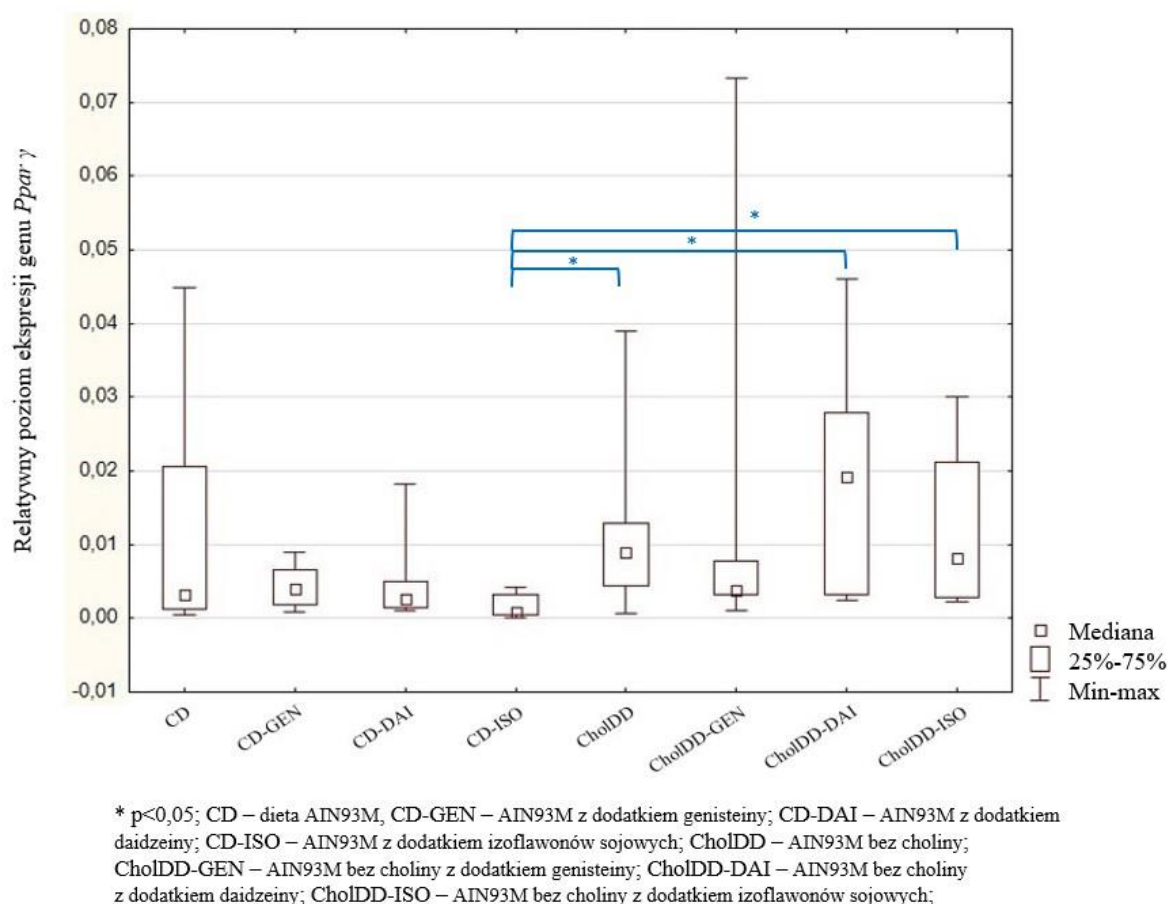
- około 1000 razy wyższa w grupie CholDD od wartości w grupie CD,
- 170 razy wyższa w grupie CholDD-GEN w porównaniu z grupą CD-GEN,
- 38-krotnie wyższa w grupie CholDD-DAI w porównaniu z grupą CD-DAI,
- oraz 25-krotnie wyższa w grupie CholDD-ISO w porównaniu z grupą CD-ISO.

Do tego nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami CD (zwierzęta spożywające dietę o prawidłowej zawartości choliny bez/z dodatkami izoflawonów sojowych), jak i pomiędzy grupami CholDD (zwierzęta spożywające dietę z deficytem choliny bez/z dodatkami izoflawonów sojowych).



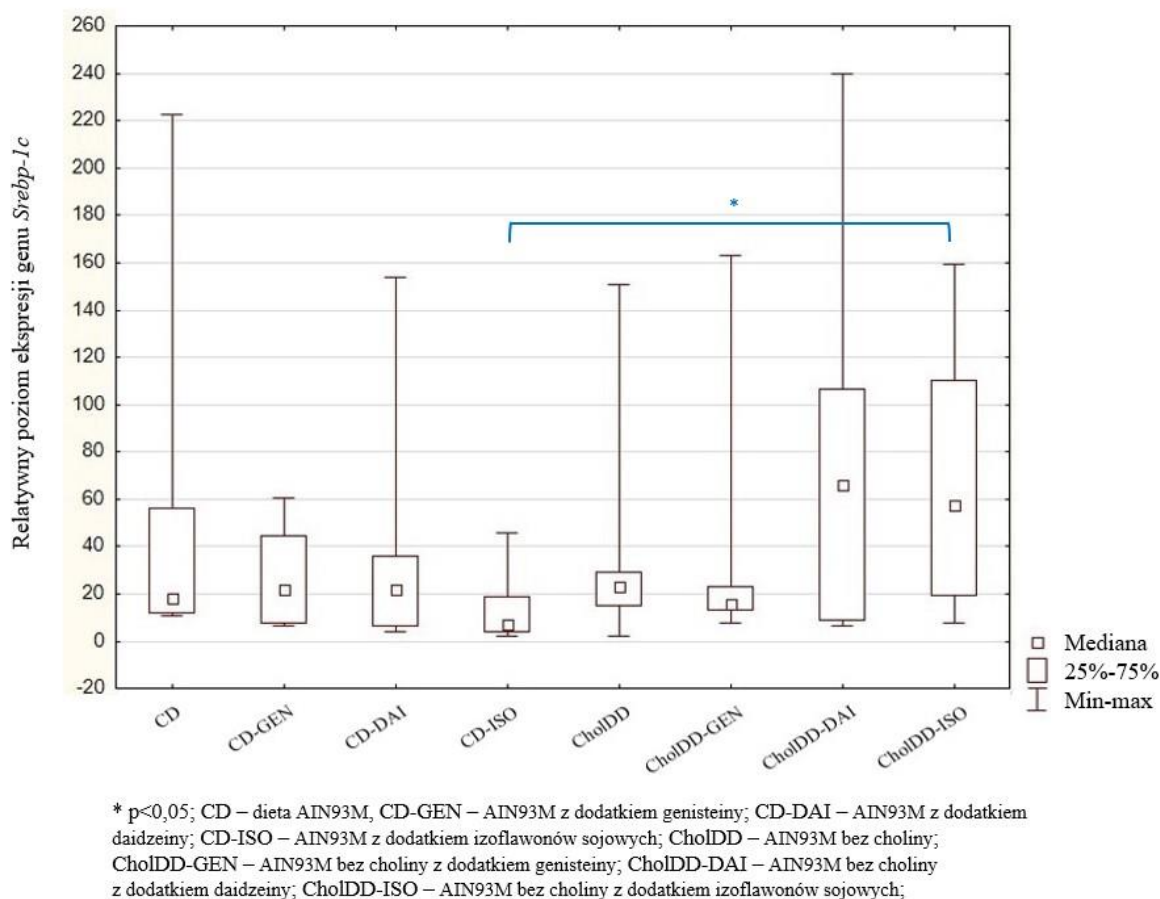
Ryc. 22. Relatywny poziom ekspresji genu *Pemt* w wątrobie różnych grup szczurów.

Na rycinie 23 zobrazowano wyniki relatywnego poziomu transkrypcji genu *Ppar γ*. Stwierdzono różnice istotne statystycznie między grupą CD-ISO a grupami CholDD, CholDD-DAI, CholDD-ISO. W grupie CD-ISO poziom transkrypcji był najniższy w porównaniu do pozostałych analizowanych grup. Wartości mediany uzyskane w grupach CholDD, CholDD-DAI, CholDD-ISO były 5- lub 10-krotnie wyższe niż w grupie CD-ISO.



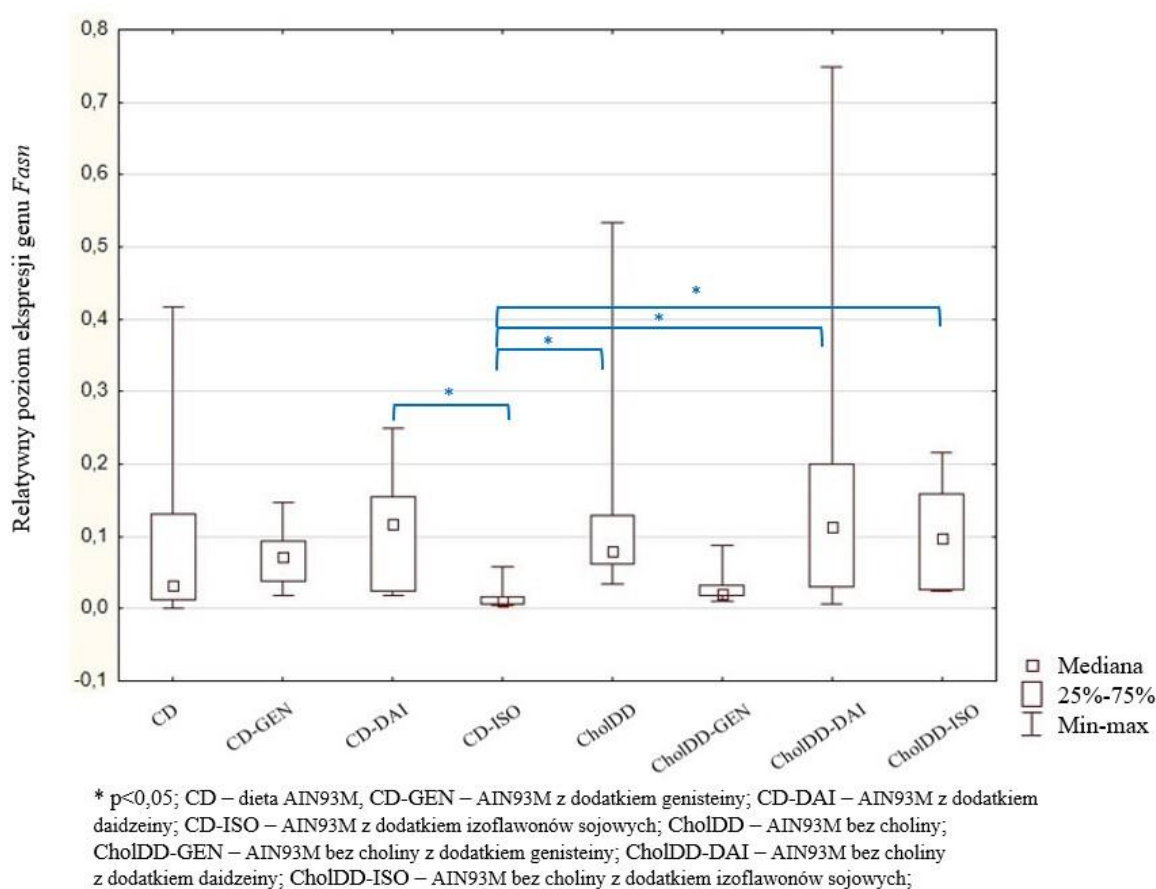
Ryc. 23. Relatywny poziom ekspresji genu *Ppar γ* w wątrobie różnych grup szczurów.

Kolejnym genem analizowanym w wątrobie szczurów był *Srebp-1c* - rycina 24. Różnice istotne statystycznie odnotowano między grupą CD-ISO a grupą CholDD-ISO ($p=0,0019$), przy czym grupa CholDD-ISO charakteryzowała się istotnie wyższym (prawie 8-krotnie) relatywnym poziomem ekspresji. Czynnikiem różniącym te grupy między sobą była zawartość choliney w diecie. Stosunkowo wysokim poziomem ekspresji opisywanego genu odznaczała się także grupa CholDD-DAI.



Ryc. 24. Relatywny poziom ekspresji genu *Srebp-1c* w wątrobie różnych grup szczurów.

Na rycinie 25 zaprezentowano wyniki uzyskane dla genu *Fasn*. Różnice istotne statystycznie występują między grupą CD-DAI a grupą CD-ISO, a więc grupami spożywającymi dietę o prawidłowej zawartości choline, różniące się dodatkiem izoflawonów sojowych. Analiza statystyczna wykazała również istotne różnice między grupą CD-ISO a grupami CholDD, CholDD-DAI i CholDD-ISO ($p=0,0028$). W grupie CD-ISO relatywny poziom ekspresji był najniższy w porównaniu do pozostałych analizowanych grup (o 7-10 razy niższy).

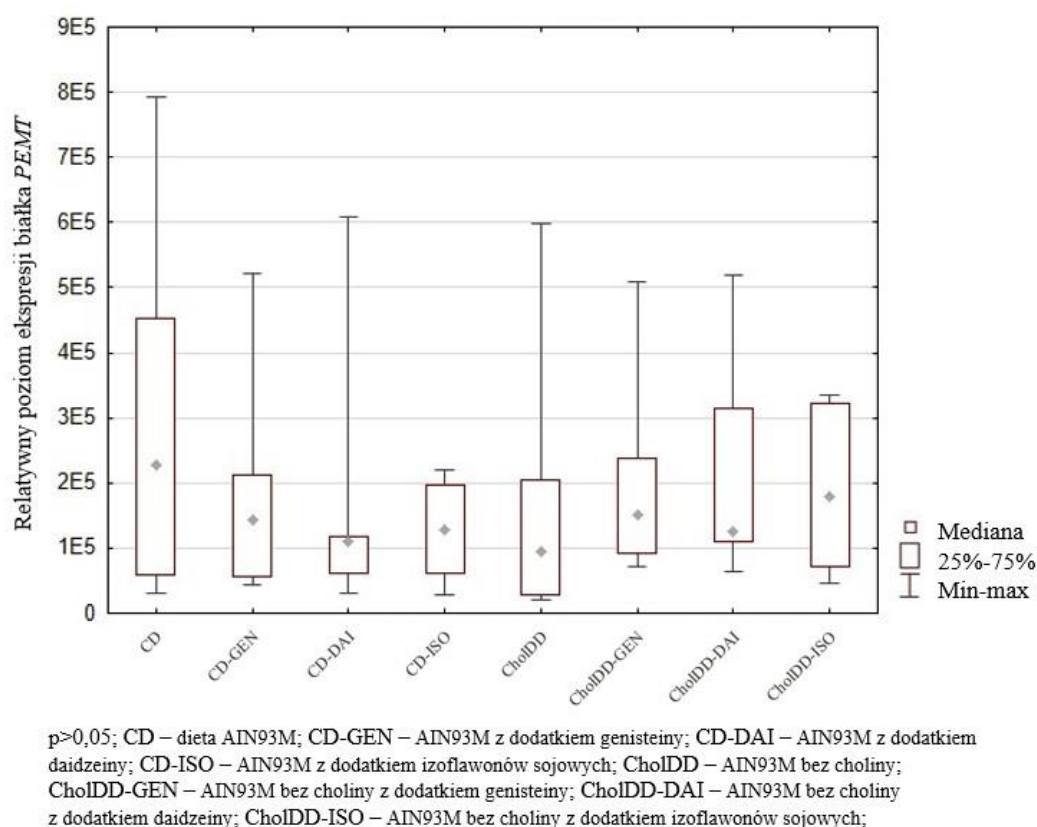


Ryc. 25. Relatywny poziom ekspresji genu *Fasn* w wątrobie różnych grup szczurów.

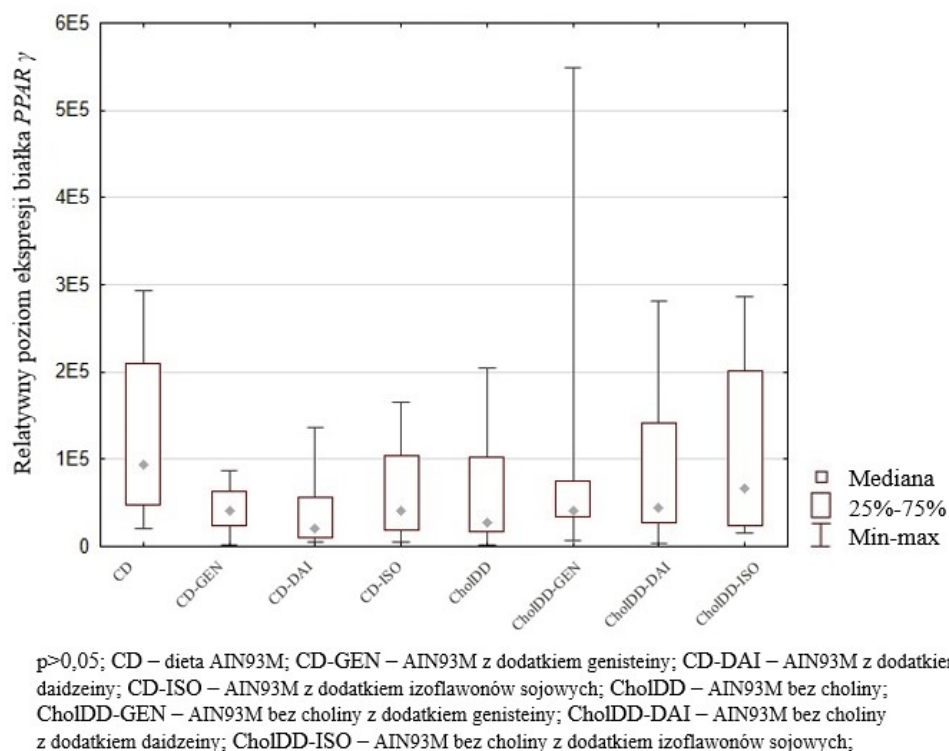
5.6.2. Translacja

W celu uzupełnienia analizy ekspresji genów na poziomie transkrypcji wykonano testy dla czterech białek kodowanych przez wybrane geny, tj. PEMT, PPAR γ , SREBP-1C, FAS oraz jednego białka referencyjnego, tj. β -aktyny. Materiałem do analiz również były wątroby pozyskane od szczurów.

Białka PEMT, PPAR γ oraz β -aktynę oznaczono metodą Western Blot. Analiza statystyczna nie wykazała różnic istotnych statystycznie między poszczególnymi grupami zarówno dla białka PEMT, jak i PPAR γ . Zauważa się, iż średnie wartości w relatywnym poziomie ekspresji tych białek, sumarycznie dla grup CD, w odniesieniu do grup ChoIDD kształtują się na zbliżonym poziomie. Mimo różnic w poziomie transkrypcji genów kodujących te białka, nie przekładało się to różnice w poziomie translacji. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinach 26 i 27.



Ryc. 26. Relatywny poziom białka PEMT w wątrobie różnych grup szczurów.

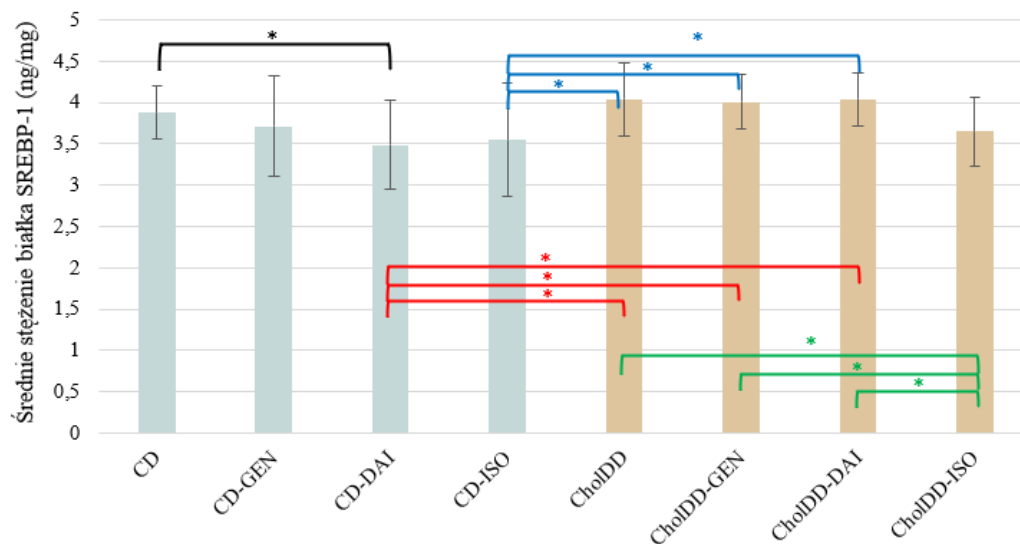


Ryc. 27. Relatywny poziom białka PPAR γ w wątrobie różnych grup szczurów.

Stężenia białek SREBP-1c oraz FAS w wątrobie oznaczono metodą ELISA wykorzystując komercyjne zestawy odczynników. Wyniki uzyskane dla białka SREBP-1c przedstawiono na rycinie 28. Analiza statystyczna otrzymanych wartości wykazała szereg różnic między poszczególnymi grupami. Istotne statystycznie różnice zaobserwowano między:

- grupą CD a grupą CD-DAI (różnica na poziomie 0,39 ng/mg), a więc wśród grup spożywających dietę z prawidłową zawartością choliny, różniących się dodatkiem daidzeiny, przy czym w grupie CD wykazano wyższą średnią zawartość tego białka,
- grupą CD-DAI a grupami CholDD, CholDD-GEN, CholDD-DAI (różnice około 0,50 ng/mg), a więc między grupami spożywającymi dietę z deficytem choliny bez/z dodatkiem daidzeiny lub ekstraktu izoflawonów sojowych, przy czym w grupie CD-DAI wykazano niższą średnią zawartość tego białka,
- grupą CD-ISO a grupami CholDD, CholDD-GEN, CholDD-DAI (również różnice około 0,50 ng/mg), a więc między grupami spożywającymi dietę z deficytem choliny bez/z dodatkiem daidzeiny lub ekstraktu izoflawonów sojowych, przy czym w grupie CD-ISO wykazano niższą średnią zawartość tego białka,

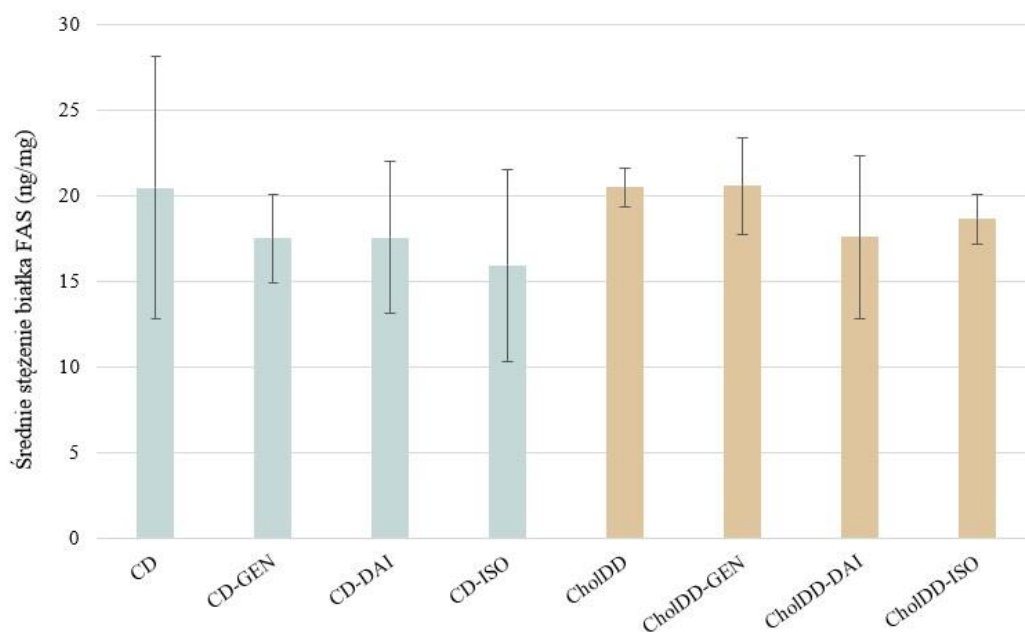
- a także między grupą CholDD-ISO, dla której wartość opisanego parametru była istotnie niższa niż w grupach CholDD, CholDD-GEN, CholDD-DAI (różnice około 0,40 ng/mg).



* $p < 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 28. Stężenie białka SREBP-1 w wątrobie różnych grup szczurów.

Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między poszczególnymi grupami zwierząt jeśli chodzi o średni poziom białka FAS - rycina 29. Najwyższym średnim poziomem tego białka charakteryzowały się grupy CD, CholDD oraz CholDD-GEN, natomiast najniższym grupa CD-ISO. Rozpatrując sumarycznie grupy CD, w porównaniu do grup CholDD, to średnia wartość niniejszego parametru dla grup CD wynosi 17,89 ng/mg, natomiast dla grup CholDD 19,35 ng/mg.



$p > 0,05$; CD – dieta AIN93M, CD-GEN – AIN93M z dodatkiem genisteiny; CD-DAI – AIN93M z dodatkiem daidzeiny; CD-ISO – AIN93M z dodatkiem izoflawonów sojowych; CholDD – AIN93M bez choliny; CholDD-GEN – AIN93M bez choliny z dodatkiem genisteiny; CholDD-DAI – AIN93M bez choliny z dodatkiem daidzeiny; CholDD-ISO – AIN93M bez choliny z dodatkiem izoflawonów sojowych;

Ryc. 29. Stężenie białka FAS w wątrobie różnych grup szczurów.

6. Dyskusja

Niniejsza praca doktorska porusza niezbadany dotąd aspekt wpływu spożycia izoflawonów sojowych na endogenną syntezę choliny. Z badań opisujących wpływ fitoestrogenów na szereg szlaków metabolicznych i funkcjonowanie różnych narządów nadal płynie wiele nieścisłości a uzyskiwane wyniki niekiedy wzajemnie się wykluczają. Nowatorskim podejściem w niniejszej rozprawie jest ocena działania tych związków w dwóch sytuacjach, tj. prawidłowej podaży choliny z dietą oraz jej niedoboru. W związku z tym w analizie wyników należy jednocześnie wziąć pod uwagę dwa czynniki, tj. zawartość choliny w diecie oraz dodatek izoflawonów sojowych, które mogą w różnym stopniu wpływać na poszczególne parametry. W celu jak najdokładniejszego wnioskowania, zaprojektowano układ badania i podział na grupy w taki sposób, aby można porównywać grupy spożywające dietę z prawidłową zawartością choliny (CD) i te spożywające karmę z deficytem choliny (CholDD) oraz dodatkami izoflawonów między sobą, ale także w obrębie siebie (dwie grupy kontrolne, tj. CD i CholDD bez dodatków izoflawonów).

Zdecydowano się na wybór stada niekrewniaczego (outbred) Wistar, które odznacza się wysokim stopniem heterozygotyczności (w porównaniu do szczepów wsobnych) tym samym odzwierciedlając naturalną zmienność genetyczną występującą w populacji. Może to wyjaśniać duże odchylenia standardowe w uzyskanych wynikach, zwłaszcza w przypadku ekspresji genów. Nie bez znaczenia dla obserwowanych odchyleń jest także stosunkowo niewielka liczba osobników w analizowanych grupach. Jednakże, należy podkreślić, że 10 zwierząt w grupie przy stadzie niekrewniaczym spełnia zasady testów statystycznych uwzględniając wielkość efektu, wpisując się zarazem we wskazania płynące z zasady 3R (ang. *replacement, reduction and refinement*) w badaniach na zwierzętach, mówiącej m.in. o wykorzystaniu jak najmniejszej możliwej liczby zwierząt (Sneddon i in., 2017). Zastosowanie stada niekrewniaczego jest podejściem zalecanym w większości badań biomedycznych ze względu na większą precyzję wnioskowania. Obejmuje bowiem szerszy zakres potencjalnych efektów, wynikający ze zmienności genetycznej (Tuttle i in., 2018). Natomiast w przypadku planowania kolejnych doświadczeń w temacie wpływu fitoestrogenów na metabolizm grup jednowęglowych i lipidów, skupionych wyłącznie na analizie funkcji i ekspresji genów należałoby wybrać zwierzęta z chowu wsobnego (Brekke i in., 2018).

Wybrany model zwierzęcy miał na celu odzwierciedlić sytuację niskiego spożycia choliny z pokarmem. Celem zastosowania karmy deficytowej w cholinę w części grup eksperymentalnych nie było wywołanie NAFLD, a odwzorowanie sytuacji niedoboru/niskiej podaży tego składnika w diecie oraz stworzenie warunków w których, konieczna jest wzmożona endogenna synteza choliny. Niemniej jednak użycie takiej diety jest jedną z możliwości tworzenia zwierzęcych modeli NAFLD indukowanych dietą. Natomiast grupy spożywające karmę zawierającą prawidłową ilość tego składnika stanowiły tło porównawcze. Dodatkowo zdecydowano się na wybór diety AIN-93M, ponieważ ze względu na swój skład nie zawiera źródeł soi, tym samym dodatkowej ilości izoflawonów (Jensen & Ritskes-Hoitinga, 2007).

Celowy jest również wybór płci zwierząt i przeprowadzenie doświadczenia na samcach szczurów. Doniesienia literaturowe mówią o tym, że samce są bardziej podatne na negatywne skutki diety deficytowej w cholinę niż samice, przez co można spodziewać się wyraźniejszej obserwacji założonych efektów (Obeid i in., 2024). Ponadto, ze względu na opisywane oddziaływania fitoestrogenów na receptory estrogenowe i potencjalne konkurowanie z estrogenami endogennymi, wybór samców (cechujących się stałym i niższym poziomem estrogenów niż samice) – stanowił w tym zakresie bardziej stabilny model badawczy.

W momencie przygotowania niniejszej rozprawy nie znaleziono informacji na temat doświadczeń opisujących dietę deficytową w cholinę z dodatkami izoflawonów sojowych, co generuje porównywanie otrzymanych wyników ze zbliżonymi lecz nie identycznymi modelami.

- **Wpływ różnej zawartości choliny w diecie oraz dodatku fitoestrogenów sojowych na parametry ogólnowitamine i wzrostowe szczurów**

Głównym celem oceny spożycia paszy w przeprowadzonym doświadczeniu było sprawdzenie czy zwierzęta z grup CholDD, ze względu na deficyt choliny w diecie, będą wykazywać istotnie mniejsze lub większe spożycie karmy niż szczury z grup CD. W I etapie badania zaobserwowano różnice między grupą CholDD z dodatkiem ekstraktu izoflawonów sojowych a grupami CholDD i CholDD z genisteiną, co może wynikać z różnic osobniczych między poszczególnymi zwierzętami. Z czasem bowiem efekt ten zanikł i biorąc pod uwagę spożycie karmy przez 12 tygodni (czyli całe doświadczenie), różnice istotne statystycznie były widoczne wyłącznie między grupą CD a CholDD, czyli między grupami różniącymi się wyłącznie zawartością choliny w diecie, w kierunku

wyższego spożycia w grupie CholDD. Różnica ta wynosiła średnio jedynie 2 g. Dodatkowo nie zauważono różnic pomiędzy pozostałymi grupami biorącymi udział w doświadczeniu, co pokazuje, że uzyskano zakładany efekt, tj. grupy CD i CholDD poza choliną spożywały zbliżone ilości poszczególnych składników odżywczych z diety. Warto w tym miejscu przytoczyć doświadczenie przeprowadzone przez Rossi i Costa, w którym samcom szczurów Wistar przez 10 dni podawano dietę z prawidłową ilością choliny lub z jej deficytem, w którym odnotowano niższe spożycie w grupie spożywającej karmę niedoborową (Rossi & Costa, 1980). Jednak odnosząc wartość spożycia do masy ciała (efektywność żywienia), nie zauważono różnic istotnych statystycznie. Podobny wynik dla efektywności żywienia, tj. brak różnic między poszczególnymi grupami odnotowano w badaniu własnym. Można w tym upatrywać wytłumaczenia, że różnica w spożyciu karmy między grupami CD a CholDD, jest wynikiem różnic w masie ciała między zwierzętami i płynącym z tego różnym zapotrzebowaniem na karmę. W zbliżonym badaniu na modelu zwierzęcym Fujitani i in., podając przez 4 tygodnie samcom szczurów karmę zawierającą ekstrakt izoflawonów sojowych w dawce 300 mg/kg diety, nie wykazali zmian w poziomie spożycia diety (Fujitani i in., 2022). W badaniu przeprowadzonym przez Penza i in. na myszach, dodatek genisteiny również nie powodował różnic w spożyciu karmy (Penza i in., 2006). Podobne wnioski wyciągnęli Liu i in. po przeprowadzeniu doświadczenia na samcach szczura Sprague-Dawley, jednak w tym badaniu wykorzystano dietę wysokotłuszczową (Liu i in., 2017). Co ciekawe, w badaniu własnym w I etapie odnotowano wyższy poziom spożycia paszy w grupie CholDD z dodatkiem ekstraktów izoflawonów sojowych w porównaniu do grupy bez dodatku/z dodatkiem genisteiny. Natomiast w literaturze opisuje się, że ze względu na nieprzyjemną gorycz płynącą z dodatku ekstraktu izoflawonów sojowych do diety odnotowuje się niechęć smakową przekładającą się na spożycie pokarmu. Jednak niechęć ta obserwowana była częściej u samic niż u samców (Fujitani i in., 2022).

W porównaniu do diety z niedoborem choliny i metioniny, dieta niedoborowa wyłącznie w cholinę nie powoduje zmniejszenia masy ciała u zwierząt (Jahn i in., 2019). Tłumaczyłoby to brak różnic między grupami w przyrostach masy ciała, a pośrednio także brak różnic w średnich bezwzględnych masach narządów obserwowane w niniejszych badaniach. Biorąc pod uwagę wpływ spożycia dodatków izoflawonów sojowych na masę ciała to dostępne są różne dane. W badaniu własnym nie odnotowano różnic między grupami spożywającymi dietę z lub bez dodatków tych związków. W eksperymencie przeprowadzonym przez Sandini i in. na 12-miesięcznych samicach szczurów, którym

przez 90 dni podawano przez zgłębnik ekstrakt izoflawonów w dawkach 50, 100 oraz 200 mg/kg/dzień, przy dawkach 100 i 200 mg/kg/dzień odnotowano istotnie mniejszy przyrost masy ciała (Sandini i in., 2019). Natomiast Penza i in. we wspomnianym wcześniej badaniu przeprowadzonym na samcach i samicach myszy szczepu C57BL/6, podając genisteinę przez zgłębnik w dawkach (50, 500, 5000, 50 000, 200 000 µg/kg/dzień) lub w paszy w dawce 800 µg/g diety przez 15 dni i nie zaobserwowali wpływu na przyrosty masy ciała (Penza i in., 2006). W badaniach dotyczących wpływu izoflawonów sojowych na modelach wykorzystujących diety z niedoborem choliny i metioniny lub wysoką zawartością tłuszczu/fruktozy wyniki dotyczące wpływu na masę ciała również są niejednoznaczne. Dla przykładu podawanie wraz z dietą wysokotłuszczową genisteiny (w dawce 0,1% na kg diety) samicom szczurów Sprague Dawley po przeprowadzonej uprzednio owariektomii nie wpływało na zmiany w masie ciała (Choi & Song, 2009).

Istotną z punktu widzenia podjętego tematu jest również ocena składu ciała zwierząt przeprowadzona w trakcie doświadczenia w trzech punktach czasowych. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała szereg pojedynczych różnic między poszczególnymi grupami. Znaczący jest jednak fakt, że w pomiarach wykonanych na koniec doświadczenia nie zaobserwowano różnic między grupami w zawartości tkanki tłuszczowej u zwierząt. Świadczy to o tym, że czynniki eksperymentalne nie wpłynęły globalnie na metabolizm lipidów i gromadzenie tkanki tłuszczowej.

- **Wpływ różnej zawartości choliny w diecie oraz dodatku fitoestrogenów sojowych na obraz histologiczny wątroby szczurów**

W badaniu własnym nie stwierdzono istotnych różnic między poszczególnymi grupami w masie wątroby oraz w strukturze makroskopowej tego narządu. Dla poszerzenia analizy wpływu niedoboru choliny w diecie oraz dodatków izoflawonów sojowych wykonano ocenę histologiczną wycinków wątroby, która wykazała różnice między próbkami pobranymi od zwierząt z grup CD (spożywających dietę o prawidłowej ilości choliny) w porównaniu do grup CholDD (przyjmujących karmę z deficytem choliny). Szczury z grup CD charakteryzowały się prawidłową morfologią hepatocytów, natomiast zmiany zaobserwowane u zwierząt z grup CholDD miały charakter łagodny. Brak zmian makroskopowych w strukturze wątroby po 12 tygodniach przyjmowania diety deficytowej w cholinę może być wynikiem aktywacji mechanizmów kompensacyjnych uruchomionych w sytuacji niedoboru tego składnika w organizmie. Szczególne znaczenie w tym temacie

przypisuje się szlakom związanym z metabolizmem lipidów oraz OCM (da Silva i in., 2020; Pei i in., 2020).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zbliżone do informacji dostępnych w literaturze mówiących, że przy 8-tygodniowym niedoborze choliny w diecie zmiany morfologii komórek wątroby nie są obserwowane lub są łagodne (w badaniu własnym - 12 tygodni). Znaczny poziom stłuszczenia i/lub zmiany związane z włóknieniem występują w przypadku połączenia deficytu choliny z wysoką zawartością tłuszczu w diecie (Radhakrishnan i in., 2020). Taki model powoduje również różnice w masie wątroby między grupami kontrolnymi a badanymi, w kierunku zwiększenia masy tego narządu u zwierząt spożywających dietę wysokotłuszczową (Stephenson i in., 2018). Warty odnotowania jest również wpływ na masę wątroby modeli MCD, z którymi porównuje się zastosowaną w niniejszym badaniu dietę deficytową wyłącznie w cholinę. U zwierząt na dietach MCD odnotowuje się zmniejszenie masy tego narządu (Lee i in., 2011).

W badaniu własnym nie został potwierdzony pozytywny wpływ izoflawonów sojowych na zmiany morfologiczne wątroby wynikające z niedoboru choliny. Nie zaobserwowano bowiem różnic między grupami spożywającymi karmę z lub bez dodatków tych związków. Dla porównania, we wspomnianym wcześniej doświadczeniu Liu i in. na samcach szczura przyjmujących dietę wysokotłuszczową oraz izoflawony sojowe przez zgłębnik dożołądkowy zauważono, że karma o wysokiej zawartości tłuszczu powoduje znaczne zmiany stłuszczeniowe w wątrobie (tj. powiększenie objętości komórek, obecność kropeł lipidowych oraz translokację jądra). Natomiast zastosowanie fitoestrogenów sojowych wiązało się ze znacznie łagodniejszymi zmianami, zwłaszcza w grupie przyjmującej wyższe dawki izoflawonów (20 mg/kg/dzień). Jednak model zastosowany w badaniach Liu i in. bazuje na wpływie wysokiej zawartości tłuszczów w diecie, a nie deficycie choliny (Liu i in., 2017).

- **Wpływ różnej zawartości choliny w diecie oraz dodatku fitoestrogenów sojowych na wybrane parametry biochemiczne krwi szczurów oraz zawartość tłuszczu w kale**

W niniejszym badaniu wykazano, że deficyt choliny, a także dodatek izoflawonów sojowych nie wpływa na stężenie glukozy w surowicy krwi szczurów. Podobne wyniki uzyskano w innych badaniach bazujących na diecie niedoborowej w cholinę, w których wykazano, że taka modyfikacja diety nie powodowała zmian w tolerancji glukozy oraz nie wpływała na występowanie oporności na insulinę. Hiperglikemia pojawiała się natomiast

w przypadku połączenia diety deficytowej w cholinę z wysoką zawartością tłuszczu (Jahn i in., 2019). Pozytywny wpływ izoflawonów sojowych na poziomy glukozy we krwi odnotowuje się w doświadczeniach wykorzystujących model diety wysokotłuszczowej. Przykładowo w badaniu przeprowadzonym przez Kim i in. wykazano, że podanie genisteiny w dawce 2g/kg diety myszom szczepu C57BL/6 karmionym 12 tygodni dietą wysokotłuszczową spowodowało obniżenie poziomu glukozy w surowicy krwi w porównaniu do grupy, która nie spożywała tego izoflawonu (Kim i in., 2005). Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniu Zhang i in., którzy również przez 12 tygodni podawali samcom myszy szczepu C57BL/6 genisteinę w dawce 60 mg/kg i wykazali, że związek ten powoduje obniżenie stężenia glukozy na czczo (Zhang i in., 2022). Zastosowanie diety o wysokiej zawartości tłuszczu nie pozwala jednak na bezpośrednie porównanie z wynikami uzyskanymi w ramach badania własnego.

Istotną analizą, wynikającą z celu niniejszej pracy, było oznaczenie parametrów profilu lipidowego w surowicy krwi, tj. cholesterolu całkowitego, LDL, HDL oraz TG. Różnice istotne statystycznie między grupami zaobserwowano wyłącznie w przypadku cholesterolu całkowitego i cholesterolu frakcji LDL. Kluczowym jest, że różnice występowały między grupami z różną zawartością choliny oraz dodatkami izoflawonów sojowych. Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic między grupami CD a CholDD, czyli grupami bez dodatków izoflawonów sojowych. Z tego względu nie można jednoznacznie stwierdzić, że głównym czynnikiem prowadzącym do wspomnianych różnic w grupach była zawartość choliny w diecie. Nie można również potwierdzić, że wpływ miał dodatek izoflawonów sojowych, bowiem nie wykazano różnic między grupami (zarówno CD i CholDD) bez dodatków w porównaniu do grup z dodatkami tych związków. Zaobserwowano natomiast, że wśród grup CD stężenie cholesterolu całkowitego i LDL było nieznacznie wyższe niż w grupach CholDD. Jak wspomniano cholina jest prekursorem fosfatydylocholiny, która jest istotnym składnikiem VLDL. W wyniku szeregu przemian, z udziałem m.in. lipazy lipoproteinowej VLDL ulega konwersji do LDL (Kumari i in., 2021; Sigurdsson i in., 1975). Tak więc niedostateczna ilość choliny w diecie może pośrednio oddziaływać na stężenie LDL, prowadząc do jego zmniejszenia. Niedobór choliny poprzez wpływ na szlaki związane z metabolizmem lipidów może również powodować zmiany w poziomach cholesterolu całkowitego i TG w surowicy krwi. W badaniu przeprowadzonym przez Tinoco i in. wykazano, że niedobór choliny w diecie powodował zmniejszenie poziomów cholesterolu i TG w surowicy krwi (Tinoco i in., 1964). Podobne wyniki uzyskał Won i in., w doświadczeniu przeprowadzonym na samcach

szczurów Sprague-Dawley, którym podawano dietę deficytową w cholinę. Zaobserwowano u tych zwierząt zmniejszenie stężenia cholesterolu całkowitego i LDL, natomiast stężenie TG nieznacznie wzrosło (Won i in., 1986). W przypadku badań z udziałem ludzi, z jednej strony wykazano, że spożycie 3 jaj dziennie będących źródłem choliny przez okres 4 tygodni zwiększało poziom cholesterolu całkowitego oraz LDL. Natomiast 2-tygodniowa suplementacja fosfatydylocholiną u zdrowych ochotników nie wpłynęła na zmiany stężenia cholesterolu całkowitego. Przy rozpatrywaniu tego typu wyników należy jednak wziąć m.in. pod uwagę formę w jakiej cholina była spożywana wraz z dietą (Van Parys i in., 2022). Jeśli chodzi o wpływ izoflawonów sojowych na parametry profilu lipidowego, to w badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że zastosowanie tych związków powoduje obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego i TG w surowicy krwi. Najczęściej były to jednak modele, w których zastosowano diety wysokotłuszczową lub wysokofruktozową, znacząco wpływające na metabolizm lipidów. W badaniu Arunkumar i in. samce myszy, otrzymujące dietę o wysokiej zawartości tłuszczu i fruktozy, którym podawano dożołądkowo genisteinę w dawce 1 mg/kg/m.c. charakteryzowały się niższym stężeniem cholesterolu całkowitego niż zwierzęta na tej samej diecie, ale nieotrzymujące izoflawonu (Arunkumar i in., 2013). Podobne wyniki otrzymali Liu i in. testując wpływ dwóch dawek genisteiny podawanych szczurom na diecie wysokotłuszczowej i wysokofruktozowej. Zaobserwowali oni, że dodatek genisteiny do wody spożywanej przez zwierzęta wpływa na obniżenie stężenia TG i cholesterolu LDL w surowicy krwi (Liu i in., 2017). Należy jednak zaznaczyć, że różne efekty jakie uzyskuje się w badaniach dotyczących wpływu izoflawonów sojowych na parametry lipidowe we krwi wynikają z wykorzystania w doświadczeniach preparatów o różnych dawkach, ich połączenia z białkiem sojowym, różnego czasu ekspozycji i podawania ich zróżnicowanym pod względem genetycznym i fenotypowym modelom zwierzęcym.

Jak wiadomo deficyt choliny w diecie prowadzi do akumulacji kropeł lipidowych w komórkach wątroby. Jednak ze względu na rodzaj powstających zmian, tj. najczęściej mikropęcherzykowe zmiany tłuszczowe, nie dochodzi do uszkodzenia integralności struktury komórkowej. Z tego względu nie obserwuje się zwiększenia poziomów aminotransferaz wątrobowych w surowicy krwi, które stanowią marker uszkodzenia hepatocytów. Z kolei w przypadku diety deficytowej zarówno w metioninę, jak i cholinę pojawiają się bardziej rozległe zmiany na poziomie komórkowym oraz większa progresja do włóknienia, co manifestuje się podwyższonymi poziomami enzymów wątrobowych w surowicy krwi. W badaniu przeprowadzonym przez Macfarlane i in. myszy szczepu

C57BL/6J podzielono na trzy grupy, którym podawano karmę z prawidłową zawartością wszystkich składników pokarmowych, z deficytem choliny lub z deficytem choliny i metioniny. Po dwóch tygodniach stosowania takich diet zauważono, że poziom aminotransferaz wątrobowych podwyższył się wyłącznie w grupie przyjmującej karmę z deficytem choliny i metioniny. Wartości tego parametru w grupie kontrolnej i grupie z niedoborem choliny nie różniły się między sobą (Lau i in., 2017; Macfarlane i in., 2011). Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych, tj. po okresie 12 tygodni stosowania diety deficytowej w cholinę nie zaobserwowano zmian w stężeniu enzymów wątrobowych w porównaniu do grup spożywających karmę o prawidłowej zawartości choliny. Łączy się to z obserwacjami, jakich dokonano w ramach oceny histologicznej skrawków wątroby, w której nie zauważono zmian świadczących o istotnym uszkodzeniu komórek. Natomiast potencjalny wpływ izoflawonów sojowych na stężenie aminotransferaz wątrobowych rozpatrywany był najczęściej w badaniach, w których wykorzystywano dietę wysokotłuszczową. W zależności od zastosowanej dawki i czasu ekspozycji wykazywano, że związki te mogą wpływać na obniżenie zarówno ALAT jak i AspAT (Xin i in., 2019). We wspomnianym już doświadczeniu przeprowadzonym przez Liu i in. na samcach szczurów Sprague-Dawley, gdzie do diety wysokotłuszczowej podawanej zwierzętom dodano izoflawony sojowe w dawce 10 lub 20 mg/kg/dzień, zaobserwowano, że po 12 tygodniach takiego żywienia stężenie ALAT w grupach z dodatkiem fitoestrogenów znormalizowało się do poziomów występujących w grupie kontrolnej, spożywającej karmę o prawidłowej zawartości tłuszczu (Liu, Zhong, Leng, i in., 2017). Obniżenie stężenia aminotransferaz wątrobowych wykazano także w badaniu, gdzie samcom szczurów Wistar karmionych dietą wysokofruktozową podawano dożołądkowo genisteinę w dawce 1 mg/kg/dzień przez 60 dni (Xin i in., 2019).

W ramach niniejszej pracy wykonano również analizę oceny zawartości tłuszczu w kale szczurów. Miała ona na celu ocenę wpływu diety o różnej zawartości choliny z/bez dodatków izoflawonów sojowych na wchłanianie tłuszczów. Jak bowiem wiadomo cholina odgrywa kluczową rolę w wytwarzaniu żółci, niezbędnej do prawidłowego trawienia tłuszczów. Jako prekursor fosfatydylocholina stanowi jeden ze składników żółci, która bierze udział w procesie emulgowania tłuszczów, umożliwiając ich rozkład i wchłanianie w jelicie cienkim. W przypadku niedoboru choliny w diecie proces wytwarzania żółci może być nieprawidłowy, czego konsekwencją jest zmniejszenie jej ilości, a tym samym nieefektywne wchłanianie tłuszczów. Przekłada się to na zwiększenie ich wydzielania wraz z kałem (Nakano i in., 2009; Tso i in., 1981; van der Veen i in., 2017). W niniejszym

badaniu nie zaobserwowano jednak różnic pomiędzy grupami w zawartości tłuszczu w kale. Wy tłumaczenia takiego wyniku można upatrywać w tym, iż fosfatydylocholina niezbędna do produkcji żółci pochodziła z innych źródeł niż tych zależnych od dostarczenia cholicy wraz z dietą (skuteczne mechanizmy kompensacyjne) oraz że 12-tygodniowy okres niedoboru cholicy nie wywołał zmian w metabolizmie lipidów generujących zaburzenia wchłaniania tłuszczów w układzie pokarmowym. W jednym z nielicznych badań oceniających pośrednio wpływ spożycia soi na zawartość tłuszczu w kale, wykazano że dodatek białka sojowego do diety wysokotłuszczowej podawanej w celu indukcji NASH nie wpływał na różnice w zawartości cholesterolu w kale (Yang i in., 2011).

- **Wpływ różnej zawartości cholicy w diecie oraz dodatku fitoestrogenów sojowych na ekspresję genu *Pemt* oraz stężenie fosfatydylocholicy w wątrobie szczurów i VLDL w surowicy krwi**

W badaniu własnym wykazano, że niedobór cholicy w diecie zwiększa poziom transkrypcji genu *Pemt* zaangażowanego w endogenną syntezę cholicy, nie stwierdzono jednak różnic na poziomie białka. Porównując ze sobą grupy CD z odpowiadającymi im grupami CholDD (bez lub z poszczególnymi dodatkami izoflawonów sojowych), zauważa się wyższy poziom transkrypcji tego genu u grup z niedoborem cholicy. Są to różnice na poziomie od około 25-krotnie do 1000-krotnie wyższym dla grup spożywających dietę niedoborową w cholinę. Jak wspomniano wcześniej, gen *Pemt* koduje enzym o tej samej nazwie, który uczestniczy w reakcji przekształcenia fosfatydyloetanolaminy do fosfatydylocholicy, w ramach drugiej ścieżki szlaku biosyntezy fosfatydylocholicy w wątrobie, a pośrednio w zwiększaniu puli dostępnej cholicy. Mimo, że aktywność tego enzymu odnotowano w różnych tkankach, to stanowi ona tylko niewielki procent jego aktywności w komórkach wątroby. Z tego względu upatruje się szczególnej roli genu *Pemt* właśnie w tym narządzie, szczególnie w kontekście mechanizmów odpowiedzialnych za stłuszczenie. Brak różnic w ilościach białka PEMT w wątrobie może wynikać ze złożoności procesu ekspresji genów. Wysoki poziom transkrypcji nie zawsze gwarantuje wysoki poziom odpowiadającego mu białka. Mechanizmy regulacyjne, które wpływają na taki stan obejmują m.in. regulację posttranskrypcyjną, alternatywne składanie genu, regulację stabilności mRNA, efektywność samej translacji czy procesy degradacji białek (Koussounadis i in., 2015; Perl i in., 2017). Podobne badanie przeprowadzili Cui i Vance, którzy przeanalizowali ekspresję genu *Pemt* w wątrobie samców szczurów Sprague-

Dawley karmionych przez 12 tygodni dietą niedoborową w cholinę w porównaniu do grupy spożywającej karmę o prawidłowej zawartości tego składnika. Wykazano, że ekspresja tego genu zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji (poziomy białka PEMT były 5-krotnie wyższe u szczurów na diecie z niedoborem choliny) była zdecydowanie wyższa u zwierząt będących na deficycie choliny. Co istotne nie zauważono przy tym różnic w poziomie fosfatydylocholiny w wątrobie między grupami, co sugeruje, że zwiększenie intensywności reakcji szlaku PEMT mogło kompensować zmniejszoną podaż choliny w diecie. W kilku badaniach wykazano, że niedobór choliny może zwiększać syntezę fosfatydylocholiny w ramach szlaku PEMT, co stanowi potencjalny mechanizm adaptacyjny organizmu w przypadku sytuacji deficytu tego składnika w diecie (Cui & Vance, 1996; Kulinski i in., 2004; Schneider & Vance, 1978).

Natomiast w niniejszej pracy mimo braku różnic w ilościach białka PEMT odnotowano różnice w stężeniach fosfatydylocholiny między grupami CD a CholDD. Grupy CD (niższa ekspresja genu *Pemt* na poziomie mRNA) charakteryzowały się wyższymi stężeniami fosfatydylocholiny w wątrobie niż grupy CholDD. Jak wspomniano już we wcześniejszych częściach pracy poziom fosfatydylocholiny w ustroju nie jest uzależniony wyłącznie od szlaku PEMT. Grupy CD spożywały dietę zawierającą cholinę, w związku z czym mogła ona zostać wykorzystana w „szlaku CDP-choliny” jako głównym szlaku biosyntezy fosfatydylocholiny i spowodować, że u zwierząt CD zaobserwowano wyższy poziom tego fosfolipidu w wątrobie.

Jeśli chodzi o stężenie VLDL we krwi, to podobnie jak w przypadku fosfatydylocholiny, wyższe stężenia tej lipoproteiny wykazano w grupach CD niż CholDD. Zauważono także, że w zbliżony sposób przedstawiają się dla tych dwóch parametrów różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi grupami. Dla przykładu, zarówno dla fosfatydylocholiny jak i VLDL wykazano istotne różnice w stężeniach między grupami CD-DAI a CholDD, CholDD-DAI i CholDD-ISO. Jest to tożsame z wynikami uzyskanymi przez Yao & Vance, którzy podawali szczurom Sprague-Dawley dietę z prawidłową zawartością choliny lub deficytem tego składnika. Grupa spożywająca dietę niedoborową w cholinę charakteryzowała się niższym stężeniem VLDL w surowicy krwi i było to stwierdzane już po 3 dniach stosowania takiej diety (Yao & Vance, 1990). Jak wiadomo fosfatydylocholina jest niezbędna do syntezy VLDL, przez co jej stężenie koresponduje ze stężeniami VLDL w surowicy krwi. Fakt ten może stanowić wytłumaczenie wyników uzyskanych w ramach niniejszej pracy, bowiem stężenia fosfatydylocholiny w poszczególnych grupach znajdują odzwierciedlenie w stężeniach VLDL.

Jak już wspomniano, szereg doświadczeń wykazał, że ekspresja genu *Pemt* jest zależna od stężenia estrogenów, ze względu na obecność elementu odpowiedzi na estrogen w promotorze tego genu. Stanowiło to podstawę w tworzeniu jednej z głównych hipotez badawczych niniejszej rozprawy. Dodatkowo pojawiające się w ostatnich latach wyniki badań przedstawiały, że fitoestrogeny są zdolne do wiązania się z receptorami estrogenowymi występującymi w różnych tkankach, tym samym mogąc oddziaływać na ekspresję genów (Rietjens i in., 2017). Jednak w badaniu własnym nie potwierdzono wpływu dodatków izoflawonów sojowych na ekspresję genu *Pemt* w wątrobie szczura. Ze względu na złożoność procesu ekspresji genów i czynników jakie mogą na nią wpływać, potencjalnego uzasadnienia braku założonego efektu upatruje się m.in. w stosunkowo niskiej dawce zastosowanych dodatków, a także w niższej zdolności do wiązania z receptorami estrogenowymi niż estrogeny endogenne. Jednym z powodów wykorzystania w doświadczeniu własnym samców szczura było zniwelowanie różnic między zwierzętami w skokowych różnicach poziomu hormonów generowanych przez cykl płciowy, co występuje w przypadku samic. Jednak w organizmie samców również odnotowuje się pewne ilości estrogenów endogennych. Wydaje się zasadnym, aby w kolejnych badaniach podejmujących temat wpływu fitoestrogenów na organizm zaplanować oznaczenie poziomów tych hormonów, tym samym poszerzając możliwości wnioskowania.

Jak już wspomniano, izoflawony sojowe jako przedstawiciele fitoestrogenów mają różną zdolność do wiązania ER- α i ER- β , w tym silniejsze powinowactwo wykazują wobec ER- β . Ustalono, że w wątrobie występują przede wszystkim receptory ER- α , w związku z czym można przypuszczać, że do braku efektu przedstawionego w wynikach niniejszej pracy przyczynia się słabe powinowactwo zastosowanych izoflawonów do ER- α . Ponadto ten rodzaj receptora analizowano w przypadku doświadczeń dotyczących regulacji ekspresji genu *Pemt* poprzez estrogeny (Gao i in., 2008; Resseguie i in., 2011). Nie bez znaczenia jest również potencjalne działanie antyestrogenowe tych związków, które poprzez blokowanie wiązania z estrogenami endogennymi zmniejszają aktywność receptorową, a w konsekwencji wpływ na ekspresję genów. Wy tłumaczenia uzyskanych wyników można poszukiwać także w zagadnieniach związanych z metabolizmem fitoestrogenów w organizmie a konkretnie w potencjalnie niskim poziomie aglikonów w krążeniu raportowanym w badaniach, wynikającym z procesu wchłaniania, biotransformacji i różnic w biodostępności. Z tego względu kolejną analizą wartą

zaplanowania w przyszłych badaniach byłoby oznaczenie stężenia tych związków w poszczególnych kompartmentach tkankowych.

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy nie można również potwierdzić wpływu dodatku izoflawonów sojowych na poziom fosfatydylocholiny w wątrobie bowiem nie zaobserwowano różnic wewnątrz grup CD lub CholDD - porównując grupy spożywające diety bez dodatku z grupami, którym podawano karmę z dodatkiem genisteiny, daidzeiny lub ekstraktu izoflawonów sojowych. Podobnie nie potwierdzono wpływu spożycia izoflawonów sojowych na stężenie VLDL we krwi. Większość badań opisujących oddziaływanie tych związków na stężenie lipoprotein w surowicy krwi koncentruje się na poziomach cholesterolu LDL i HDL, przez co wpływ izoflawonów sojowych na stężenie VLDL jest trudny do interpretacji. Niektóre z nich wykazują niewielki spadek stężenia tego parametru po spożyciu fitoestrogenów sojowych, podczas gdy inne nie wskazują żadnych znaczących zmian. Przykładowo w doświadczeniu przeprowadzonym przez Kirk i in. odnotowano obniżenie stężenia VLDL u myszy C57BL/6J z *knock out'em* genu kodującego receptory LDL, które karmiono dietą wysokotłuszczową wzbogaconą izoflawonami sojowymi w porównaniu do zwierząt, które przyjmowały dietę wysokotłuszczową bez tego dodatku. Natomiast efektu zmniejszenia stężenia VLDL nie zauważyli Fonseca i in., którzy podawali ekstrakt izoflawonów sojowych samicom szczurów Wistar poddanym owariektomii (Fonseca i in., 2021; Kirk i in., 1998; Xin i in., 2019).

- **Wpływ różnej zawartości choliny w diecie oraz dodatku fitoestrogenów sojowych na ekspresję genów związanych z metabolizmem lipidów**

W niniejszej pracy zdecydowano się na analizę ekspresji genów *Ppar γ*, *Srebp-1c*, *Fasn*, ze względu na ich udział w metabolizmie lipidów. Gen *PPARγ* ulega ekspresji głównie w adipocytach, gdzie reguluje proces różnicowania preadipocytów w adipocyty, prowadząc do zwiększenia magazynowania kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej (Chawla i in., 1994). Wykazano jednak, że w przypadku stłuszczenia wątroby zwiększa się jego ekspresja również w hepatocytach. Wynika to z faktu, iż białko *PPARγ* jako receptor jądrowy wpływa na aktywację szlaków związanych z lipogenezą (Souza-Mello, 2015). Podobnie *SREBP-1c* jest czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje ekspresję genów zaangażowanych w syntezę kwasów tłuszczowych, TG i fosfolipidów. Bezpośrednio oddziałuje on na ekspresję genu *FASN* kodującego białko FAS, odpowiedzialne za syntezę kwasów tłuszczowych. Poprzez wpływ na lipogenezę geny te biorą pośredni udział

w hamowaniu procesu β -oksydacji (Foretz i in., 1999; Lay i in., 2002). Taka sytuacja prowadzi do zwiększonego magazynowania lipidów w komórkach wątroby, a tym samym do większego zapotrzebowania na fosfatydylocholinę, która jako składnik VLDL mogłaby zostać zaangażowana w eksport lipidów z wątroby do tkanek.

W niniejszym badaniu wykazano tylko pojedyncze różnice w poziomie ekspresji tych genów między poszczególnymi grupami szczurów, tj. między grupą CD-ISO a grupami spożywającymi dietę deficytową w cholinę bez lub z dodatkiem izoflawonów sojowych. W przypadku genu *Fasn* zaobserwowano także różnicę między grupą CD-DAI a CD-ISO. Jednak różnice te nie dają jednoznacznej odpowiedzi czy 12-tygodniowy deficyt choliny w diecie oraz dodatek izoflawonów sojowych mogą wpływać na ekspresję analizowanych genów. Taka sytuacja znajduje częściowo odzwierciedlenie w wynikach parametrów biochemicznych krwi – zauważono bowiem tylko niewielkie różnice w stężeniach poszczególnych składowych profilu lipidowego między poszczególnymi grupami. Oddziaływanie zastosowanych interwencji widoczne jest jednak w ocenie histologicznej skrawków wątroby, w których zaobserwowano zmiany mikropęcherzykowe w komórkach hepatocytów.

W nielicznych badaniach dotyczących wpływu izoflawonów sojowych na ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm lipidów opisywane są pozytywne wyniki sugerujące, że związki te mogą poprawiać funkcjonowanie wątroby i korzystnie wpływać na metabolizm lipidów (Huang i in., 2016; Tan i in., 2019; Xiao & Hendry, 2022; Yamagata & Yamori, 2021). W przytoczonym już badaniu Arunkumar i in. przeprowadzonym na myszach w grupach spożywających dietę wysokotłuszczową i wysokofruktozową oraz genisteinę wykazano obniżenie poziomu ekspresji genów *Srebp-1c* i *Fasn*. W badaniu tym, dodatek genisteiny powodował również obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego i TG w surowicy krwi zwierząt, a także zmniejszenie masy wątroby i zawartości w niej TG (Arunkumar i in., 2013). Potencjalnych komórkowych mechanizmów wpływu izoflawonów sojowych na parametry biochemiczne związane z metabolizmem glukozy i lipidów upatruje się w oddziaływaniu tych związków na aktywność receptorów jądrowych (m.in. receptory estrogenowe, PPAR, SREBP-1c, receptor węglowodorów aryłowych), ale i sygnalizację niereceptorową (m.in. kinaza białkowa aktywowana przez AMP, cyklooksygenaza, sirtuina 1). Poprzez te szlaki może dochodzić do regulacji ekspresji genów odgrywających kluczową rolę w gospodarce węglowodanowej i lipidowej. Dokładny przebieg tych procesów wymaga jednak dokładniejszych analiz (Chadha i in., 2020).

Podsumowując, uwzględniając wyniki podobnych doświadczeń zasadnym wydaje się stwierdzenie, że skutki zarówno niedoboru choliny, jak i zastosowania w diecie dodatków izoflawonów sojowych mogą być zależne od czasu ekspozycji oraz zastosowanej dawki. Testowanie znacznie wyższych dawek izoflawonów sojowych niż przyjętych w niniejszej pracy wymagałoby jednak uargumentowania zasadności takiego podejścia w kierunku możliwości zastosowania takich ilości w praktyce.

7. Wnioski

Przeprowadzone doświadczenie *in vivo* oraz szereg analiz laboratoryjnych umożliwiły realizację celu niniejszej pracy oraz weryfikację hipotez badawczych. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Spożycie izoflawonów sojowych, w ilościach odpowiadających ich zwyczajowej konsumpcji, nie wpływa na ekspresję genu *Pemt* w wątrobie szczura. Wpływu izoflawonów na ekspresję tego genu nie obserwuje się zarówno w przypadku prawidłowej podaży choliny z dietą, jak i w sytuacji jej deficytu. Izoflawony sojowe nie zwiększają również stężenia fosfatydylocholiny w wątrobie, ani VLDL we krwi. Nie stwierdza się więc wpływu izoflawonów sojowych na metabolizm choliny.
2. Izoflawony sojowe spożyte z dietą o prawidłowej zawartości choliny lub z dietą deficytową w ten składnik nie wpływają na ekspresję genów *Ppar γ* i *Srebp-1c* na poziomie transkrypcji. Efekt ten może być obserwowany w odniesieniu do ekspresji genu *Fasn*. Jeśli chodzi o wpływ izoflawonów sojowych na ilość analizowanych białek, to wykazano go wyłącznie dla białka SREBP-1c, zarówno w przypadku niedoboru, jak i prawidłowej podaży choliny z dietą. Nie obserwuje się jednak wpływu izoflawonów sojowych na stężenia parametrów profilu lipidowego, glukozy i enzymów wątrobowych oraz na zawartość tłuszczu w kale. Dodatek do diety izoflawonów sojowych może natomiast wpływać na skład ciała zwierząt. Nie można zatem jednoznacznie potwierdzić wpływu izoflawonów sojowych na metabolizm lipidów.
3. Deficyt choliny w diecie wpływa na metabolizm choliny w organizmie, bowiem powoduje zwiększenie ekspresji genu *Pemt* w wątrobie szczura, zmniejszenie stężenia fosfatydylocholiny w tym narządzie oraz zmiany morfologiczne w komórkach wątroby. Niedobór choliny w diecie może również powodować zmiany w metabolizmie lipidów poprzez wpływ na poziom transkrypcji genów *Ppar γ* , *Srebp-1c* i *Fasn*. Na poziomie translacji efekt ten obserwuje się wyłącznie dla białka SREBP-1c. Szlaki aktywowane przez te geny mogą być zaangażowane w mobilizację mechanizmów kompensacyjnych, poprzez które mimo deficytu choliny w diecie nie zaobserwowano zmian w stężeniach glukozy, cholesterolu frakcji HDL, triacylogliceroli oraz enzymów wątrobowych. 12-tygodniowy deficyt choliny w diecie nie powodował również znaczących zmian w procesach

związanych z wchłanianiem i wydalaniem tłuszczów, gdyż nie wykazano wpływu na zawartości tłuszczu w kale. Potencjalne mechanizmy kompensacyjne wymagają jednak dokładnej analizy bowiem niedobór choliny spowodował zmiany w stężeniach cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL i VLDL oraz w składzie ciała zwierząt.

Podsumowując, dodatek izoflawonów sojowych do diety nie wpływa na proces endogennej syntezy choliny. Związki te mogą natomiast wywoływać zmiany ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm lipidów, w tym genów które są regulatorami przemian lipidów. Jednak efekt ten wymaga potwierdzenia w kolejnych badaniach. Pomimo zmian poziomów ekspresji tych genów, stężenia parametrów biochemicznych związanych z metabolizmem węglowodanów, lipidów oraz funkcjonowaniem wątroby nie zmieniają się po spożyciu izoflawonów sojowych. Zmiany na poziomie molekularnym oraz fenotypowym obserwuje się natomiast w przypadku niedoboru choliny w diecie. Potencjalne mechanizmy kompensacyjne mogą odpowiadać za niewielki stopień tych zmian.

8. Piśmiennictwo

1. Akahane, T., Kaya, D., Noguchi, R., Kaji, K., Miyakawa, H., Fujinaga, Y., Tsuji, Y., Takaya, H., Sawada, Y., Furukawa, M., Kitagawa, K., Ozutsumi, T., Kawaratani, H., Moriya, K., Namisaki, T., & Yoshiji, H. (2021). Association between Equol Production Status and Nonalcoholic Steatohepatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS222111904>
2. Alcorta, A., Porta, A., Tárrega, A., Alvarez, M. D., & Pilar Vaquero, M. (2021). Foods for Plant-Based Diets: Challenges and Innovations. *Foods*, 10(2), 293. <https://doi.org/10.3390/FOODS10020293>
3. Almeda-Valdes, P., Cuevas-Ramos, D., & Aguilar-Salinas, C. A. (2009). Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, 8(SUPPL. 1), S18–S24. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31822-8](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31822-8)
4. Aly, F. Z., & Kleiner, D. E. (2011). Update on fatty liver disease and steatohepatitis. *Advances in anatomic pathology*, 18(4), 294. <https://doi.org/10.1097/PAP.0B013E318220F59B>
5. Anstee, Q. M., & Day, C. P. (2013). The genetics of NAFLD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 10(11), 645–655. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2013.182>
6. Arunkumar, E., Karthik, D., & Anuradha, C. V. (2013). Genistein sensitizes hepatic insulin signaling and modulates lipid regulatory genes through p70 ribosomal S6 kinase-1 inhibition in high-fat-high-fructose diet-fed mice. *Pharmaceutical biology*, 51(7), 815–824. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.766896>
7. Atkinson, C., Frankenfeld, C. L., & Lampe, J. W. (2005). Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental biology and medicine*, 230(3), 155–170. <https://doi.org/10.1177/153537020523000302>
8. Badger, T. M., Ronis, M. J. J., Wolff, J. G., Stanley, S., Ferguson, M., Shankar, K., Simpson, P., & Jo, C. H. (2008). Soy protein isolate reduces hepatosteatoses in yellow Avy/a mice without altering coat color phenotype. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 233(10), 1242–1254. <https://doi.org/10.3181/0802-RM-60>
9. Barone, M., Tanzi, S., Lofano, K., Scavo, M. P., Guido, R., Demarinis, L., Principi, M. B., Bucci, A., & Di Leo, A. (2008). Estrogens, phytoestrogens and colorectal neoproliferative lesions. *Genes & nutrition*, 3(1), 7–13. <https://doi.org/10.1007/S12263-008-0081-6>
10. Bondini, S., Kleiner, D. E., Goodman, Z. D., Gramlich, T., & Younossi, Z. M. (2007). Pathologic assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Clinics in liver disease*, 11(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/J.CLD.2007.02.002>
11. Bradbury, M. W. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 290(2). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00413.2005>
12. Brekke, T. D., Steele, K. A., & Mulley, J. F. (2018). Inbred or outbred? Genetic diversity in laboratory rodent colonies. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(2), 679–686. <https://doi.org/10.1534/G3.117.300495/-/DC1>
13. Bremer, J., & Greenberg, D. M. (1960). Biosynthesis of choline in vitro. *Biochimica et biophysica acta*, 37(1), 173–175. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)90104-9](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)90104-9)
14. Brown, D. A. (2019). Acetylcholine and cholinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, 3, 239821281882050. <https://doi.org/10.1177/2398212818820506>
15. Bugianesi, E., Moscatiello, S., Ciaravella, M., & Marchesini, G. (2010). Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Current pharmaceutical design*, 16(17), 16–30. <https://doi.org/10.2174/138161210791208875>

16. Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2015.12.012>
17. Canivenc-Lavier, M. C., & Bennetau-Pelissero, C. (2023). Phytoestrogens and Health Effects. *Nutrients*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/NU15020317>
18. Caudill, M. A. (2010). Pre- and Postnatal Health: Evidence of Increased Choline Needs. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(8), 1198–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.05.009>
19. Cederroth, C. R., & Nef, S. (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and cellular endocrinology*, 304(1–2), 30–42. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.02.027>
20. Chadha, R., Bhalla, Y., Jain, A., Chadha, K., & Karan, M. (2020). The Role of Isoflavones in Type 2 Diabetes Prevention and Treatment—A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 218*, 22(1), 218. <https://doi.org/10.3390/IJMS 22010218>
21. Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D., & Lazar, M. A. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 135(2), 798–800. <https://doi.org/10.1210/ENDO.135.2.8033830>
22. Chen, J., Lin, H., & Hu, M. (2003). Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 304(3), 1228–1235. <https://doi.org/10.1124/JPET.102.046409>
23. Cheng, C.-P., Chen, C.-H., Kuo, C.-S., Kuo, H.-T., Huang, K.-T., Shen, Y.-L., Chang, C.-H., & Huang Phd, R.-F. S. (2017). Dietary choline and folate relationships with serum hepatic inflammatory injury markers in Taiwanese adults. *Asia Pac J Clin Nutr*, 26(4), 642–649. <https://doi.org/10.6133/apjcn.082016.03>
24. Cheng, S. Y., Shaw, N. S., Tsai, K. S., & Chen, C. Y. (2004). The hypoglycemic effects of soy isoflavones on postmenopausal women. *Journal of women's health (2002)*, 13(10), 1080–1086. <https://doi.org/10.1089/JWH.2004.13.1080>
25. Choi, J. S., & Song, J. (2009). Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats. *Nutrition*, 25(6), 676–685. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2008.11.027>
26. Christensen, K. E., Wu, Q., Wang, X., Deng, L., Caudill, M. A., & Rozen, R. (2010). Steatosis in Mice Is Associated with Gender, Folate Intake, and Expression of Genes of One-Carbon Metabolism, . *The Journal of Nutrition*, 140(10), 1736–1741. <https://doi.org/10.3945/JN.110.124917>
27. Costa, K.-A. da, Kozyreva, O. G., Song, J., Galanko, J. A., Fischer, L. M., & Zeisel, S. H. (2006). Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(9), 1336. <https://doi.org/10.1096/FJ.06-5734COM>
28. Covaleda, A. M. S., Van den Berg, H., Vervoort, J., Van der Saag, P., Ström, A., Gustafsson, J. Å., Rietjens, I., & Murk, A. J. (2008). Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicological sciences*, 105(2), 303–311. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn141>
29. Cui, Z., & Vance, D. E. (1996). Expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 is markedly enhanced in long term choline-deficient rats. *The Journal of biological chemistry*, 271(5), 2839–2843. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.5.2839>

30. Cusi, K. (2009). Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinics in liver disease*, 13(4), 545–563. <https://doi.org/10.1016/J.CLD.2009.07.009>
31. Da Costa, K. A., Corbin, K. D., Niculescu, M. D., Galanko, J. A., & Zeisel, S. H. (2014). Identification of new genetic polymorphisms that alter the dietary requirement for choline and vary in their distribution across ethnic and racial groups. *The FASEB Journal*, 28(7), 2970. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-249557>
32. da Silva, J. G., Magarelli, G., Pedroza, T. M., Cavalcante, R. S., de Souza, J. R., da Silva, J. P., Carrão-Panizzi, M. C., & de Castro, C. S. P. (2021). Determination of total isoflavones and rutin in seeds, roots, and leaves of Brazilian soybean cultivars by using voltammetric methods. *Journal of Agriculture and Food Research*, 3, 100113. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2021.100113>
33. da Silva, R., Eudy, B. J., & Deminice, R. (2020). One-Carbon Metabolism in Fatty Liver Disease and Fibrosis: One-Carbon to Rule Them All. *The Journal of Nutrition*, 150(5), 994–1003. <https://doi.org/10.1093/JN/NXAA032>
34. Deibert, P., Lazaro, A., Schaffner, D., Berg, A., Koenig, D., Kreisel, W., Baumstark, M. W., Steinmann, D., Buechert, M., & Lange, T. (2019). Comprehensive lifestyle intervention vs soy protein-based meal regimen in non-alcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 25(9), 1116. <https://doi.org/10.3748/WJG.V25.I9.1116>
35. Deminice, R., da Silva, R. P., Lamarre, S. G., Brown, C., Furey, G. N., McCarter, S. A., Jordao, A. A., Kelly, K. B., King-Jones, K., Jacobs, R. L., Brosnan, M. E., & Brosnan, J. T. (2011). Creatine Supplementation Prevents the Accumulation of Fat in the Livers of Rats Fed a High-Fat Diet. *The Journal of Nutrition*, 141(10), 1799–1804. <https://doi.org/10.3945/JN.111.144857>
36. Desmawati, D., & Sulastri, D. (2019). Phytoestrogens and Their Health Effect. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(3), 495. <https://doi.org/10.3889/OAMJMS.2019.086>
37. Dietrich, P., & Hellerbrand, C. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 28(4), 637–653. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2014.07.008>
38. Doerge, D. R., & Sheehan, D. M. (2002). Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environmental Health Perspectives*, 110(Suppl 3), 349. <https://doi.org/10.1289/EHP.02110S3349>
39. Dongiovanni, P., Lanti, C., Riso, P., & Valenti, L. (2016). Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 29, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2015.08.024>
40. Dongiovanni, P., Romeo, S., & Valenti, L. (2015). Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/460190>
41. Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1343. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>
42. Dyson, J. K., Anstee, Q. M., & McPherson, S. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline gastroenterology*, 5(4), 277–286. <https://doi.org/10.1136/FLGASTRO-2013-100404>
43. Eslami, O., Shidfar, F., Maleki, Z., Jazayeri, S., Hosseini, A. F., Agah, S., & Ardiyani, F. (2019). Effect of Soy Milk on Metabolic Status of Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Clinical Trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 38(1), 51–58. <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1479990>

44. Eugene, B. (1954). Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria ii. Incoilporation of choline into lecithin*. *Journal of Biological Chemistry*, 209, 525–535. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65479-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65479-1)
45. European Food Safety Authority. (2012). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to soy isoflavones and maintenance of bone mineral density (ID 1655) and reduction of vasomotor symptoms associated with menopause (ID 1654, 1704, 2140, 3093, 3154, 3590) (further assessmen. *EFSA Journal*, 10(8). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2012.2847>
46. European Food Safety Authority. (2015). Risk assessment for peri- and post-menopausal women taking food supplements containing isolated isoflavones. *EFSA Journal*, 13(10). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.4246>
47. European Food Safety Authority. (2016). Dietary Reference Values for choline. *EFSA Journal*, 14(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4484>
48. Fang, K., Dong, H., Wang, D., Gong, J., Huang, W., & Lu, F. (2016). Soy isoflavones and glucose metabolism in menopausal women: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Molecular nutrition & food research*, 60(7), 1602–1614. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201501024>
49. Fernández-Ramos, D., Lopitz-Otsoa, F., Millet, O., Alonso, C., Lu, S. C., & Mato, J. M. (2022). One Carbon Metabolism and S-Adenosylmethionine in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis and Subtypes. *Livers*, 2(4), 243. <https://doi.org/10.3390/livers2040020>
50. Fischer, L. M., Da Costa, K. A., Kwock, L., Galanko, J., & Zeisel, S. H. (2010). Dietary choline requirements of women: effects of estrogen and genetic variation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(5), 1113. <https://doi.org/10.3945/AJCN.2010.30064>
51. Fischer, L. M., Searce, J. A., Mar, M. H., Patel, J. R., Blanchard, R. T., Macintosh, B. A., Busby, M. G., & Zeisel, S. H. (2005). Ad Libitum Choline Intake in Healthy Individuals Meets or Exceeds the Proposed Adequate Intake Level. *The Journal of nutrition*, 135(4), 826. <https://doi.org/10.1093/JN/135.4.826>
52. Fonseca, C. C. N. da, Cezar, L. C., Franco, P. C., Simões, R. S., Sasso, G. R. da S., Simões, M. de J., & Florencio-Silva, R. (2021). Effects of soy isoflavones extract on the lipid profile and uterus in ovariectomized rats. *Gynecological Endocrinology*, 37(2), 177–184. <https://doi.org/10.1080/09513590.2020.1832068>
53. Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., & Foufelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12737. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.22.12737>
54. Fritz, H., Seely, D., Flower, G., Skidmore, B., Fernandes, R., Vadeboncoeur, S., Kennedy, D., Cooley, K., Wong, R., Sagar, S., Sabri, E., & Fergusson, D. (2013). Soy, Red Clover, and Isoflavones and Breast Cancer: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081968>
55. Fujitani, M., Mizushige, T., Adhikari, S., Bhattarai, K., & Kishida, T. (2022). Mechanism of Soy Isoflavone Daidzein-Induced Female-Specific Anorectic Effect. *Metabolites*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/METABO12030252>
56. Gao, H., Fält, S., Sandelin, A., Gustafsson, J. Å., & Dahlman-Wright, K. (2008). Genome-Wide Identification of Estrogen Receptor α -Binding Sites in Mouse Liver. *Molecular Endocrinology*, 22(1), 10. <https://doi.org/10.1210/ME.2007-0121>
57. Gimeno, R. E. (2007). Fatty acid transport proteins. *Current opinion in lipidology*, 18(3), 271–276. <https://doi.org/10.1097/MOL.0B013E3281338558>

58. Golzarand, M., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2022). Association between dietary choline and betaine intake and 10.6-year cardiovascular disease in adults. *Nutrition Journal*, 21(1), 1. <https://doi.org/10.1186/S12937-021-00755-9>
59. Gudbrandsen, O. A., Wergedahl, H., Mørk, S., Liaset, B., Espe, M., & Berge, R. K. (2006). Dietary soya protein concentrate enriched with isoflavones reduced fatty liver, increased hepatic fatty acid oxidation and decreased the hepatic mRNA level of VLDL receptor in obese Zucker rats. *The British Journal of Nutrition*, 96(2), 249–257. <https://doi.org/10.1079/BJN20061837>
60. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(5), 367. <https://doi.org/10.1038/NRM2391>
61. Hakkak, R., Gauss, C. H., Bell, A., & Korourian, S. (2018). Short-Term Soy Protein Isolate Feeding Prevents Liver Steatosis and Reduces Serum ALT and AST Levels in Obese Female Zucker Rats. *Biomedicines*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020055>
62. Hartleb, M., Wunsch, E., Cichoż-Lach, H., Drobnik, J., & Mastalerz-Migas, A. (2019). Management of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – recommendations for general practitioners. Based on the guidelines of the Polish Group of Experts on NAFLD. *Lekarz POZ*, 5(5), 323–334.
63. Hod, R., Maniam, S., & Nor, N. H. M. (2021). A Systematic Review of the Effects of Equol (Soy Metabolite) on Breast Cancer. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/molecules26041105>
64. Holmes-McNary, M. Q., Cheng, W. L., Mar, M. H., Fussell, S., & Zeisel, S. H. (1996). Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. *The American journal of clinical nutrition*, 64(4), 572–576. <https://doi.org/10.1093/AJCN/64.4.572>
65. Huang, C., Pang, D., Luo, Q., Chen, X., Gao, Q., Shi, L., Liu, W., Zou, Y., Li, L., & Chen, Z. (2016). Soy Isoflavones Regulate Lipid Metabolism through an AKT/mTORC1 Pathway in Diet-Induced Obesity (DIO) Male Rats. *Molecules* 2016, Vol. 21, Page 586, 21(5), 586. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21050586>
66. Hwang, C. S., Kwak, H. S., Lim, H. J., Lee, S. H., Kang, Y. S., Choe, T. B., Hur, H. G., & Han, K. O. (2006). Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 101(4–5), 246–253. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2006.06.020>
67. Institute of Medicine. (1998). *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/6015>
68. Islam, M. A., Bekele, R., vanden Berg, J. H. J., Kuswanti, Y., Thapa, O., Soltani, S., van Leeuwen, F. X. R., Rietjens, I. M. C. M., & Murk, A. J. (2015). Deconjugation of soy isoflavone glucuronides needed for estrogenic activity. *Toxicology in vitro*, 29(4), 706. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2015.01.013>
69. Jafari, A., Jalilpiran, Y., Sutor, K., Bellissimo, N., & Azadbakht, L. (2021). The association of dietary choline and betaine and anthropometric measurements among Iranian children: a cross-sectional study. *BMC Pediatrics*, 21(1), 213. <https://doi.org/10.1186/S12887-021-02677-1>
70. Jahn, D., Kircher, S., Hermanns, H. M., & Geier, A. (2019). Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(5), 943–953. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2018.06.023>
71. Jaiswal, A., Dewani, D., Reddy, L. S., & Patel, A. (2023). Choline Supplementation in Pregnancy: Current Evidence and Implications. *Cureus*, 15(11).

<https://doi.org/10.7759/CUREUS.48538>

72. Janero, D. R., Siuta-Mangano, P., Miller, K. W., & Lane, M. D. (1984). Synthesis, processing, and secretion of hepatic very low density lipoprotein. *Journal of Cellular Biochemistry*, 24(2), 131–152. <https://doi.org/10.1002/JCB.240240205>
73. Jarosz, M., Rychlik, E., Stoś, K., & Charzewska, J. (2020). Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie. *NIZP-PZH*.
74. Jensen, M. N., & Ritskes-Hoitinga, M. (2007). How isoflavone levels in common rodent diets can interfere with the value of animal models and with experimental results. *Laboratory animals*, 41(1), 1–18. <https://doi.org/10.1258/002367707779399428>
75. Jiang, G., Li, L., Fan, J., Zhang, B., Oso, A. O., Xiao, C., & Yin, Y. (2015). Dietary soy isoflavones differentially regulate expression of the lipid-metabolic genes in different white adipose tissues of the female Bama mini-pigs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(1), 159–164. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.04.006>
76. Jungbauer, A., & Medjakovic, S. (2014). Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 139, 277–289. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2012.12.009>
77. Kani, A. H., Alavian, S. M., Esmailzadeh, A., Adibi, P., & Azadbakht, L. (2014). Effects of a novel therapeutic diet on liver enzymes and coagulating factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A parallel randomized trial. *Nutrition*, 30(7–8), 814–821. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2013.11.008>
78. Kani, A. H., Alavian, S. M., Esmailzadeh, A., Adibi, P., Haghighatdoost, F., & Azadbakht, L. (2017). Effects of a Low-Calorie, Low-Carbohydrate Soy Containing Diet on Systemic Inflammation among Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Parallel Randomized Clinical Trial. *Hormone and Metabolic Research*, 49(9), 687–692. <https://doi.org/10.1055/S-0042-118707/ID/R2016-09-0303-0011/BIB>
79. Kariv, R., Leshno, M., Beth-Or, A., Strul, H., Blendis, L., Kokia, E., Noff, D., Zelber-Sagie, S., Sheinberg, B., Oren, R., & Halpern, Z. (2006). Re-evaluation of serum alanine aminotransferase upper normal limit and its modulating factors in a large-scale population study. *Liver International*, 26(4), 445–450. <https://doi.org/10.1111/J.1478-3231.2006.01197.X>
80. Kathirvel, E., Morgan, K., Nandgiri, G., Sandoval, B. C., Caudill, M. A., Bottiglieri, T., French, S. W., & Morgan, T. R. (2010). Betaine improves nonalcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: A potential mechanism for hepatoprotection by betaine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(5), 1068–1077. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00249.2010/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH301110578200>
81. Kim, J., Lee, H., Lee, O., Lee, K. H., Lee, Y. B., Young, K. D., Jeong, Y. H., & Choue, R. (2013). Isoflavone supplementation influenced levels of triglyceride and luteinizing hormone in Korean postmenopausal women. *Archives of Pharmacal Research*, 36(3), 306–313. <https://doi.org/10.1007/S12272-013-0059-9/FIGURES/3>
82. Kim, M. H., Kang, K. S., & Lee, Y. S. (2010). The inhibitory effect of genistein on hepatic steatosis is linked to visceral adipocyte metabolism in mice with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *The British journal of nutrition*, 104(9), 1333–1342. <https://doi.org/10.1017/S0007114510002266>
83. Kim, S., Sohn, I., Lee, Y. S., & Lee, Y. S. (2005). Hepatic gene expression profiles are altered by genistein supplementation in mice with diet-induced obesity. *The Journal of nutrition*, 135(1), 33–41. <https://doi.org/10.1093/JN/135.1.33>
84. Kim, Y. I., Hayek, M., Mason, J. B., & Meydani, S. N. (2002). Severe Folate Deficiency Impairs Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity in Rats. *The Journal of Nutrition*,

- 132(6), 1361–1367. <https://doi.org/10.1093/JN/132.6.1361>
85. King, R. A., & Bursill, D. B. (1998). Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5), 867–872. <https://doi.org/10.1093/AJCN/67.5.867>
 86. Kirk, E. A., Sutherland, P., Wang, S. A., Chait, A., & LeBoeuf, R. C. (1998). Dietary Isoflavones Reduce Plasma Cholesterol and Atherosclerosis in C57BL/6 Mice but not LDL Receptor-Deficient Mice. *The Journal of Nutrition*, 128(6), 954–959. <https://doi.org/10.1093/JN/128.6.954>
 87. Kohlmeier, M., Da Costa, K. A., Fischer, L. M., & Zeisel, S. H. (2005). Genetic variation of folate-mediated one-carbon transfer pathway predicts susceptibility to choline deficiency in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 16025. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0504285102>
 88. Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J., & Smith, V. A. (2015). Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Scientific Reports* 2015 5:1, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep10775>
 89. Kozlitina, J., Smagris, E., Stender, S., Nordestgaard, B. G., Zhou, H. H., Tybjaerg-Hansen, A., Vogt, T. F., Hobbs, H. H., & Cohen, J. C. (2014). Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*, 46(4), 352. <https://doi.org/10.1038/NG.2901>
 90. Kraszewska, O., Nynca, A., Kamińska, B., & Ciereszko, R. (2007). Fitoestrogeny. I. Występowanie, metabolizm i znaczenie biologiczne u samic. *Postępy Biologii Komórki*, 34(1), 189-205. <https://www.pbkom.eu/pl/content/fitoestrogeny-i-wystepowanie-metabolizm-i-znaczenie-biologiczne-u-samic>
 91. Kuhnle, G. G. C., Dell'Aquila, C., Aspinall, S. M., Runswick, S. A., Mulligan, A. A., & Bingham, S. A. (2008). Phytoestrogen content of foods of animal origin: dairy products, eggs, meat, fish, and seafood. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 10099–10104. <https://doi.org/10.1021/JF801344X>
 92. Kulinski, A., Vance, D. E., & Vance, J. E. (2004). A Choline-deficient Diet in Mice Inhibits neither the CDP-choline Pathway for Phosphatidylcholine Synthesis in Hepatocytes nor Apolipoprotein B Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23916–23924. <https://doi.org/10.1074/JBC.M312676200>
 93. Kumari, A., Kristensen, K. K., Ploug, M., & Lund Winther, A. M. (2021). The Importance of Lipoprotein Lipase Regulation in Atherosclerosis. *Biomedicines*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9070782>
 94. Larkin, T., Price, W. E., & Astheimer, L. (2008). The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(6), 538–552. <https://doi.org/10.1080/10408390701542716>
 95. Lau, J. K. C., Zhang, X., & Yu, J. (2017). Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of Pathology*, 241(1), 36. <https://doi.org/10.1002/PATH.4829>
 96. Lay, S. Le, Lefrère, I., Trautwein, C., Dugail, I., & Krief, S. (2002). Insulin and Sterol-regulatory Element-binding Protein-1c (SREBP-1C) Regulation of Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes: identification of ccaat/enhancer-binding protein β as an srebp-1c target. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35625–35634. <https://doi.org/10.1074/JBC.M203913200>
 97. Lee, J. Y., Moon, J. H., Park, J. S., Lee, B. W., Kang, E. S., Ahn, C. W., Lee, H. C., & Cha, B. S. (2011). Dietary Oleate Has Beneficial Effects on Every Step of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Progression in a Methionine- and Choline-Deficient Diet-Fed Animal Model. *Diabetes & Metabolism Journal*, 35(5), 489–496.

<https://doi.org/10.4093/DMJ.2011.35.5.489>

98. Lewis, E. D., Field, C. J., & Jacobs, R. L. (2015). Should the forms of dietary choline also be considered when estimating dietary intake and the implications for health? *Lipid Technology*, 27(10), 227–230. <https://doi.org/10.1002/LITE.201500048>
99. Li, J., Xin, Y., Li, J., Chen, H., & Li, H. (2023). Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase: from Functions to Diseases. *Aging and Disease*, 14(3), 879. <https://doi.org/10.14336/AD.2022.1025>
100. Li, Z., & Vance, D. (2008). Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *Journal of Lipid Research*, 49(6), 1187–1194. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700019-JLR200>
101. Liu, H., Zhong, H., Leng, L., & Jiang, Z. (2017). Effects of soy isoflavone on hepatic steatosis in high fat-induced rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 61(2), 85. <https://doi.org/10.3164/JCBN.16-98>
102. Liu, H., Zhong, H., Yin, Y., & Jiang, Z. (2017). Genistein has beneficial effects on hepatic steatosis in high fat-high sucrose diet-treated rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 91, 964–969. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.04.130>
103. Macfarlane, D. P., Zou, X., Andrew, R., Morton, N. M., Livingstone, D. E. W., Aucott, R. L., Nyirenda, M. J., Iredale, J. P., & Walker, B. R. (2011). Metabolic pathways promoting intrahepatic fatty acid accumulation in methionine and choline deficiency: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 300(2), E402. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00331.2010>
104. Mach, T. (2007). Niealkoholowa tłuszczeniowa choroba wątroby. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 2(2), 101–105.
105. Machado, M. V., Michelotti, G. A., Xie, G., De Almeida, T. P., Boursier, J., Bohnic, B., Guy, C. D., & Diehl, A. M. (2015). Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127991>
106. Malinowska, A. M., Szwengiel, A., & Chmurzynska, A. (2017). Dietary, anthropometric, and biochemical factors influencing plasma choline, carnitine, trimethylamine, and trimethylamine-N-oxide concentrations. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(4), 488–495. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1256379>
107. Mentch, S. J., & Locasale, J. W. (2016). One Carbon Metabolism and Epigenetics: Understanding the Specificity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1363(1), 91. <https://doi.org/10.1111/NYAS.12956>
108. Michel, V., Yuan, Z., Ramsbair, S., & Bakovic, M. (2006). Choline transport for phospholipid synthesis. *Experimental biology and medicine*, 231(5), 490–504. <https://doi.org/10.1177/153537020623100503>
109. Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Mascianà, R., Forgione, A., Gabrieli, M. L., Perotti, G., Vecchio, F. M., Rapaccini, G., Gasbarrini, G., Day, C. P., & Grieco, A. (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 49(6), 1877–1887. <https://doi.org/10.1002/HEP.22848>
110. Miksicek, R. J. (1995). Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(1), 44–50. <https://doi.org/10.3181/00379727-208-43830>
111. Młodzik-Czyżewska, M. A., Malinowska, A. M., Szwengiel, A., & Chmurzynska, A. (2022). Associations of plasma betaine, plasma choline, choline intake, and MTHFR polymorphism (rs1801133) with anthropometric parameters of healthy adults are sex-dependent. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 35(4), 701–712.

<https://doi.org/10.1111/JHN.13046>

112. Moore, C., Perreault, M., Mottola, M., & Atkinson, S. (2020). Diet in Early Pregnancy: Focus on Folate, Vitamin B12, Vitamin D, and Choline. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*, 81(2), 58–65. <https://doi.org/10.3148/cjdpr-2019-025>
113. Moradi, M., Daneshzad, E., & Azadbakht, L. (2020). The effects of isolated soy protein, isolated soy isoflavones and soy protein containing isoflavones on serum lipids in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(20). <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1689097>
114. Mu, Y., Kou, T., Wei, B., Lu, X., Liu, J., Tian, H., Zhang, W., Liu, B., Li, H., Cui, W., & Wang, Q. (2019). Soy Products Ameliorate Obesity-Related Anthropometric Indicators in Overweight or Obese Asian and Non-Menopausal Women: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/NU11112790>
115. Muzsik-Kazimierska, A., Szwengiel, A., Nikrandt, G., & Chmurzynska, A. (2022). Lower plasma glutathione, choline, and betaine concentrations are associated with fatty liver in postmenopausal women. *Nutrition Research*, 101, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2022.02.004>
116. Nakano, T., Inoue, I., Katayama, S., Seo, M., Takahashi, S., Hokari, S., Shinozaki, R., Hatayama, K., & Komoda, T. (2009). Lysophosphatidylcholine for Efficient Intestinal Lipid Absorption And Lipoprotein Secretion in Caco-2 Cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45(2), 227. <https://doi.org/10.3164/JCBN.09-25>
117. Neshatbini, A., Hatami, B., Daftari, G., Hekmatdoost, A., Yari, Z., Salehpour, A., Hosseini, S. A., & Helli, B. (2024). The effect of soy isoflavones supplementation on metabolic status in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized placebo controlled clinical trial. *BMC Public Health*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/S12889-024-18812-3>
118. Neshatbini Tehrani, A., Hatami, B., Helli, B., Yari, Z., Daftari, G., Salehpour, A., Hedayati, M., Khalili, E., Hosseini, S. A., & Hekmatdoost, A. (2024). The effect of soy isoflavones on non-alcoholic fatty liver disease and the level of fibroblast growth factor-21 and fetuin A. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-024-55747-6>
119. Nynca, A., Kraszewska, O., Ciereszko, R., Fizjologii Zwierz, K., Warmińsko-Mazurski, U., Endokrynologii Hodowli Tkanek Zak, P., & Fizjologii Zwierz, A. (2007). Fitoestrogeny II. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania w układzie rozrodczym samicy. *Postępy Biologii Komórki*, 34(1), 207–222.
120. Obeid, R., Schön, C., Derbyshire, E., Jiang, X., Mellott, T. J., Blusztajn, J. K., & Zeisel, S. H. (2024). A Narrative Review on Maternal Choline Intake and Liver Function of the Fetus and the Infant; Implications for Research, Policy, and Practice. *Nutrients*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/NU16020260>
121. Ortiz, C., & Manta, B. (2024). Advances in equol production: Sustainable strategies for unlocking soy isoflavone benefits. *Results in Chemistry*, 7, 101288. <https://doi.org/10.1016/J.RECHEM.2023.101288>
122. Pafili, K., & Roden, M. (2021). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Molecular Metabolism*, 50, 101122. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2020.101122>
123. Panasevich, M. R., Schuster, C. M., Phillips, K. E., Meers, G. M., Chintapalli, S. V., Wankhade, U. D., Shankar, K., Butteiger, D. N., Krul, E. S., Thyfault, J. P., & Rector, R. S. (2017). Soy compared with milk protein in a Western diet changes fecal microbiota and decreases hepatic steatosis in obese OLETF rats. *The Journal of*

- nutritional biochemistry*, 46, 125. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2017.05.004>
124. Panneerselvam, S., Packirisamy, R. M., Bobby, Z., Elizabeth Jacob, S., & Sridhar, M. G. (2016). Soy isoflavones (Glycine max) ameliorate hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in high fat-fed ovariectomized Wistar rats (an experimental model of postmenopausal obesity). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 38, 57–69. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2016.08.007>
 125. Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A., & Minutolo, F. (2014). Estrogen Receptors Alpha (ER α) and Beta (ER β): Subtype-Selective Ligands and Clinical Potential. *Steroids*, 0, 13. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2014.06.012>
 126. Patterson, K. Y., Bhagwat, S. A., Williams, J. R., Howe, J. C., & Holden, J. M. (2008). USDA Database for The Choline Content of Common Foods, Release 2. *Agricultural Research Service: Washington, DC, USA*, 1–37. <https://www.ars.usda.gov/ARS/80400525/data/choline/>
 127. Pauwels, S., Ghosh, M., Duca, R. C., Bekaert, B., Freson, K., Huybrechts, I., Langie, S. A. S., Koppen, G., Devlieger, R., & Godderis, L. (2017). Maternal intake of methyl-group donors affects DNA methylation of metabolic genes in infants. *Clinical Epigenetics*, 9(16). <https://doi.org/10.1186/S13148-017-0321-Y>
 128. Pei, K., Gui, T., Kan, D., Feng, H., Jin, Y., Yang, Y., Zhang, Q., Du, Z., Gai, Z., Wu, J., & Li, Y. (2020). An Overview of Lipid Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4020249>
 129. Penza, M., Montani, C., Romani, A., Vignolini, P., Pampaloni, B., Tanini, A., Brandi, M. L., Alonso-Magdalena, P., Nadal, A., Ottobrini, L., Parolini, O., Bignotti, E., Calza, S., Maggi, A., Grigolato, P. G., & Di Lorenzo, D. (2006). Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology*, 147(12), 5740–5751. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-0365>
 130. Perl, K., Ushakov, K., Pozniak, Y., Yizhar-Barnea, O., Bhonker, Y., Shivatzki, S., Geiger, T., Avraham, K. B., & Shamir, R. (2017). Reduced changes in protein compared to mRNA levels across non-proliferating tissues. *BMC Genomics*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12864-017-3683-9/FIGURES/5>
 131. Pessayre, D., & Fromenty, B. (2005). NASH: a mitochondrial disease. *Journal of hepatology*, 42(6), 928–940. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2005.03.004>
 132. Phillips, M. M. (2012). Analytical approaches to determination of total choline in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(8), 2103–2112. <https://doi.org/10.1007/S00216-011-5652-5/FIGURES/3>
 133. Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116. <https://doi.org/10.1016/J.neuron.2012.08.036>
 134. Pogribny, I. P., Kutanzi, K., Melnyk, S., De Conti, A., Tryndyak, V., Montgomery, B., Pogribna, M., Muskhelishvili, L., Latendresse, J. R., James, S. J., Beland, F. A., & Rusyn, I. (2013). Strain-dependent dysregulation of one-carbon metabolism in male mice is associated with choline- and folate-deficient diet-induced liver injury. *The FASEB Journal*, 27(6), 2233–2243. <https://doi.org/10.1096/FJ.12-227116>
 135. Prelicz, C. R., & Lotrean, L. M. (2017). Choline Intake and Its Food Sources in the Diet of Romanian Kindergarten Children. *Nutrients*, 9(8), 896. <https://doi.org/10.3390/NU9080896>
 136. Probst, Y., Guan, V., & Neale, E. (2019). Development of a Choline Database to Estimate Australian Population Intakes. *Nutrients*, 11(4), 913. <https://doi.org/10.3390/NU11040913>
 137. Puri, P., & Sanyal, A. J. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk

- factors, and workup. *Clinical Liver Disease*, 1(4), 99. <https://doi.org/10.1002/CLD.81>
138. Radhakrishnan, S., Ke, J. Y., & Pellizzon, M. A. (2020). Targeted Nutrient Modifications in Purified Diets Differentially Affect Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Disease Development in Rodent Models. *Current Developments in Nutrition*, 4(6), nzaa078. <https://doi.org/10.1093/CDN/NZAA078>
 139. Radziejewska, A., & Chmurzynska, A. (2019). Folate and choline absorption and uptake: Their role in fetal development. *Biochimie*, 158, 10–19. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2018.12.002>
 140. Radziejewska, A., Muzsik, A., Milagro, F. I., Martínez, J. A., & Chmurzynska, A. (2020). One-Carbon Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Crosstalk between Nutrients, Microbiota, and Genetics. *Lifestyle Genomics*, 13(2), 53–63. <https://doi.org/10.1159/000504602>
 141. Rajewski, P., Rajewski, P., Wiciński, M., Dulęba, K., & Dobosz, K. (2020). Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD) — etiologia, rozpoznanie, leczenie w świetle aktualnej wiedzy. *Forum Medycyny Rodzinnej*, 14(1), 1–10. https://journals.viamedica.pl/forum_medycyny_rodzinnej/article/view/67179
 142. Redruello-Requejo, M., Carretero-Krug, A., Rodríguez-Alonso, P., Samaniego-Vaesken, M. L., Partearroyo, T., & Varela-Moreiras, G. (2021). Dietary Intake Adequacy and Food Sources of Nutrients Involved in the Methionine-Methylation Cycle in Women of Childbearing Age from the ANIBES Spanish Population. *Nutrients*, 13(9), 2958. <https://doi.org/10.3390/NU13092958>
 143. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
 144. Resseguie, M. E., Da Costa, K. A., Galanko, J. A., Patel, M., Davis, I. J., & Zeisel, S. H. (2011). Aberrant Estrogen Regulation of PEMT Results in Choline Deficiency-associated Liver Dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1649. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.106922>
 145. Resseguie, M., Song, J., Niculescu, M. D., Costa, K.-A. da, Randall, T. A., & Zeisel, S. H. (2007). Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene expression is induced by estrogen in human and mouse primary hepatocytes. *The FASEB Journal*, 21(10), 2622. <https://doi.org/10.1096/FJ.07-8227COM>
 146. Rietjens, I. M. C. M., Louisse, J., & Beekmann, K. (2017). The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1263. <https://doi.org/10.1111/BPH.13622>
 147. Rinella, M. E., & Green, R. M. (2004). The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *Journal of Hepatology*, 40(1), 47–51. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2003.09.020>
 148. Rizki, G., Arnaboldi, L., Gabrielli, B., Yan, J., Lee, G. S., Ng, R. K., Turner, S. M., Badger, T. M., Pitas, R. E., & Maher, J. J. (2006). Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *Journal of lipid research*, 47(10), 2280–2290. <https://doi.org/10.1194/JLR.M600198-JLR200>
 149. Rizzo, G., & Baroni, L. (2018). Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/NU10010043>
 150. Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Toledo, E., Delgado-Rodríguez, M., & Gaforio, J. J. (2019). Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion? *Molecules*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050917>
 151. Roeren, M., Kordowski, A., Sina, C., & Smollich, M. (2022). Inadequate Choline

- Intake in Pregnant Women in Germany. *Nutrients*, 14(22), 4862. <https://doi.org/10.3390/NU14224862>
152. Rossi, M. A., & Costa, R. S. (1980). Catecholamine and acetylcholine levels of the kidney in weanling rats fed a choline-deficient diet. *Journal of Neural Transmission*, 47(1), 79–87. <https://doi.org/10.1007/BF01256642/METRICS>
 153. Sandini, T. M., Reis-Silva, T. M., Moreira, N., Bernardi, M. M., Lebrun, I., & Spinosa, H. de S. (2019). Effects of isoflavones on behavior, estradiol, glutamate, and GABA levels in intact middle-aged female rats. *Nutritional neuroscience*, 22(11), 805–816. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1447296>
 154. Schneider, W. J., & Vance, D. E. (1978). Effect of choline deficiency on the enzymes that synthesize phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rat liver. *European journal of biochemistry*, 85(1), 181–187. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1978.TB12226.X>
 155. Sigurdsson, G., Nicoll, A., & Lewis, B. (1975). Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein. A metabolic study of apolipoprotein B kinetics in human subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 56(6), 1481. <https://doi.org/10.1172/JCI108229>
 156. Silver, M. J., Corbin, K. D., Hellenthal, G., Da Costa, K. A., Dominguez-Salas, P., Moore, S. E., Owen, J., Prentice, A. M., Hennig, B. J., & Zeisel, S. H. (2015). Evidence for negative selection of gene variants that increase dependence on dietary choline in a Gambian cohort. *FASEB journal*, 29(8), 3426–3435. <https://doi.org/10.1096/FJ.15-271056>
 157. Sneddon, L. U., Halsey, L. G., & Bury, N. R. (2017). Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *The Journal of experimental biology*, 220(Pt 17), 3007–3016. <https://doi.org/10.1242/JEB.147058>
 158. Song, J., Costa, K. A. da, Fischer, L. M., Kohlmeier, M., Kwock, L., Wang, S., & Zeisel, S. H. (2005). Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *The FASEB journal*, 19(10), 1266. <https://doi.org/10.1096/FJ.04-3580COM>
 159. Souza-Mello, V. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 7(8), 1012. <https://doi.org/10.4254/WJH.V7.I8.1012>
 160. Staskova, L., Marx, W., Dawson, S. L., O'Hely, M., Mansell, T., Saffery, R., Burgner, D., Collier, F., Novakovic, B., Vuillermin, P., Field, C. J., Dewey, D., & Ponsonby, A. L. (2023). The distribution of dietary choline intake and serum choline levels in Australian women during pregnancy and associated early life factors. *European Journal of Nutrition*, 62(7), 2855. <https://doi.org/10.1007/S00394-023-03186-W>
 161. Stephenson, K., Kennedy, L., Hargrove, L., Demieville, J., Thomson, J., Alpini, G., & Francis, H. (2018). Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene Expression*, 18(1), 5. <https://doi.org/10.3727/105221617X15093707969658>
 162. Ström, A., Hartman, J., Foster, J. S., Kietz, S., Wimalasena, J., & Gustafsson, J. Å. (2004). Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1566–1571. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0308319100>
 163. Tan, J., Huang, C., Luo, Q., Liu, W., Cheng, D., Li, Y., Xia, Y., Li, C., Tang, L., Fang, J., Pan, K., Ou, Y., Cheng, A., & Chen, Z. (2019). Soy Isoflavones Ameliorate Fatty Acid Metabolism of Visceral Adipose Tissue by Increasing the AMPK Activity

- in Male Rats with Diet-Induced Obesity (DIO). *Molecules*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/molecules24152809>
164. Tang, W. H. W., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., & Hazen, S. L. (2013). Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *The New England journal of medicine*, 368(17), 1575. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1109400>
 165. Tayebati, S. K., Marucci, G., Santinelli, C., Buccioni, M., & Amenta, F. (2015). Choline-containing phospholipids: Structure-activity relationships versus therapeutic applications. *Current Medicinal Chemistry*, 22(38), 4328–4340. <https://doi.org/10.2174/0929867322666151029104152>
 166. Thomas, M. S., & Fernandez, M. L. (2021). Trimethylamine N-Oxide (TMAO), Diet and Cardiovascular Disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 23(4), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S11883-021-00910-X/TABLES/1>
 167. Tinoco, J., Shannon, A., & Lyman, R. L. (1964). Serum lipids in choline-deficient male and female rats. *Journal of Lipid Research*, 5(1), 57–62. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40260-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40260-3)
 168. Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, 81(3), 1031–1064. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.3.1031>
 169. Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012 489:7415, 489(7415), 242–249. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
 170. Tso, P., Kendrick, H., Balint, J. A., & Simmonds, W. J. (1981). Role of biliary phosphatidylcholine in the absorption and transport of dietary triolein in the rat. *Gastroenterology*, 80(1), 60–65. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(81\)90191-8](https://doi.org/10.1016/0016-5085(81)90191-8)
 171. Tuttle, A. H., Philip, V. M., Chesler, E. J., & Mogil, J. S. (2018). Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nature methods*, 15(12), 994. <https://doi.org/10.1038/S41592-018-0224-7>
 172. Ueland, P. M. (2011). Choline and betaine in health and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(1), 3–15. <https://doi.org/10.1007/S10545-010-9088-4>
 173. Ueland, P. M., Holm, P. I., & Hustad, S. (2005). Betaine: A key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 43(10), 1069–1075. <https://doi.org/10.1515/cclm.2005.187/machinereadablecitation/ris>
 174. van der Veen, J. N., Kennelly, J. P., Wan, S., Vance, J. E., Vance, D. E., & Jacobs, R. L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(9), 1558–1572. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2017.04.006>
 175. Van Parys, A., Brække, M. S., Karlsson, T., Vinknes, K. J., Tell, G. S., Haugsgjerd, T. R., Ueland, P. M., Øyen, J., Dierkes, J., Nygård, O., & Lysne, V. (2022). Assessment of Dietary Choline Intake, Contributing Food Items, and Associations with One-Carbon and Lipid Metabolites in Middle-Aged and Elderly Adults: The Hordaland Health Study. *Journal of Nutrition*, 152(2), 513–524. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab367>
 176. Van Parys, A., Karlsson, T., Vinknes, K. J., Olsen, T., Øyen, J., Dierkes, J., Nygård, O., & Lysne, V. (2021). Food Sources Contributing to Intake of Choline and Individual Choline Forms in a Norwegian Cohort of Patients With Stable Angina Pectoris. *Frontiers in Nutrition*, 8(May), 4–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.676026>
 177. Vance, J. E., & Vance, D. E. (1985). The role of phosphatidylcholine biosynthesis in the secretion of lipoproteins from hepatocytes. *Canadian Journal of Biochemistry*

- and *Cell Biology*, 63(8), 870–881. <https://doi.org/10.1139/O85-108>
178. Vennemann, F. B. C., Ioannidou, S., Valsta, L. M., Dumas, C., Ocké, M. C., Mensink, G. B. M., Lindtner, O., Virtanen, S. M., Tlustos, C., D'Addezio, L., Mattison, I., Dubuisson, C., Siksna, I., & Héraud, F. (2015). Dietary intake and food sources of choline in European populations. *British Journal of Nutrition*, 114(12), 2046–2055. <https://doi.org/10.1017/S0007114515003700>
 179. Veteläinen, R., Van Vliet, A., & Van Gulik, T. M. (2007). Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(9), 1526–1533. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1746.2006.04701.X>
 180. Viggiani, M. T., Polimeno, L., Di Leo, A., & Barone, M. (2019). Phytoestrogens: Dietary Intake, Bioavailability, and Protective Mechanisms against Colorectal Neoproliferative Lesions. *Nutrients*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/NU11081709>
 181. Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., & Salomone, S. (2013). Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 38(1), 15–25. <https://doi.org/10.1007/S13318-012-0112-Y/TABLES/2>
 182. Walkey, C. J., Yu, L., Agellon, L. B., & Vance, D. E. (1998). Biochemical and evolutionary significance of phospholipid methylation. *The Journal of biological chemistry*, 273(42), 27043–27046. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.42.27043>
 183. Wallace, T. C., & Fulgoni, V. L. (2016). Assessment of Total Choline Intakes in the United States. *Journal of the American College of Nutrition*, 35(2), 108–112. <https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1080127>
 184. Wallace, T. C., & Fulgoni, V. L. (2017). Usual Choline Intakes Are Associated with Egg and Protein Food Consumption in the United States. *Nutrients*, 9(8), 839. <https://doi.org/10.3390/NU9080839>
 185. Wiedeman, A. M., Barr, S. I., Green, T. J., Xu, Z., Innis, S. M., & Kitts, D. D. (2018). Dietary choline intake: Current state of knowledge across the life cycle. *Nutrients*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/NU10101513>
 186. Wiedeman, A. M., Miliku, K., Moraes, T. J., Mandhane, P. J., Simons, E., Subbarao, P., Turvey, S. E., Zwicker, J. G., & Devlin, A. M. (2024). Women in Canada are consuming above the upper intake level of folic acid but few are meeting dietary choline recommendations in the second trimester of pregnancy: data from the CHILD cohort study. <https://doi.org/10.1139/apnm-2023-0258>. <https://doi.org/10.1139/APNM-2023-0258>
 187. Won, H.-K., Kim, S.-C., & Cho, C.-S. (1986). Effects of Choline Deficient Diets on Serum and Liver Lipid Contents of Rats. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 3(2), 49–64. <https://doi.org/10.12925/JKOCs.1986.3.2.8>
 188. Wu, J. M., Wang, Z. R., Hsieh, T. C., Bruder, J. L., Zou, J. G., & Huang, Y. Z. (2001). Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *International journal of molecular medicine*, 8(1), 3–17. <https://doi.org/10.3892/IJMM.8.1.3>
 189. Xiao, C. W., & Hendry, A. (2022). Hypolipidemic Effects of Soy Protein and Isoflavones in the Prevention of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease- A Review. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 77(3), 319. <https://doi.org/10.1007/S11130-022-00984-1>
 190. Xin, X., Chen, C., Hu, Y. Y., & Feng, Q. (2019). Protective effect of genistein on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 117. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109047>

191. Xiong, P., & Zhu, Y. F. (2021). Soy diet for nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 100(22), E25817. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025817>
192. Yamagata, K., & Yamori, Y. (2021). Potential Effects of Soy Isoflavones on the Prevention of Metabolic Syndrome. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 5863, 26(19), 5863. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195863>
193. Yang, H. Y., Tzeng, Y. H., Chai, C. Y., Hsieh, A. T., Chen, J. R., Chang, L. S., & Yang, S. S. (2011). Soy protein retards the progression of non-alcoholic steatohepatitis via improvement of insulin resistance and steatosis. *Nutrition*, 27(9), 943–948. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2010.09.004>
194. Yao, Z., & Vance, D. E. (1990). Reduction in VLDL, but not HDL, in plasma of rats deficient in choline. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 68(2), 552–558. <https://doi.org/10.1139/O90-079>
195. York, L. W., Puthalapattu, S., & Wu, G. Y. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease and low-carbohydrate diets. *Annual review of nutrition*, 29, 365–379. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NUTR-070208-114232>
196. Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 64(1), 73–84. <https://doi.org/10.1002/HEP.28431>
197. Zeisel, S. H. (1981). Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annual review of nutrition*, 1(Volume 1, 1981), 95–121. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.01.070181.000523/cite/refworks>
198. Zeisel, S. H. (2006). Choline: Critical Role During Fetal Development and Dietary Requirements in Adults. *Annual review of nutrition*, 26, 229–250. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.nutr.26.061505.111156>
199. Zeisel, S. H. (2012). A brief history of choline. *Annals of nutrition & metabolism*, 61(3), 254. <https://doi.org/10.1159/000343120>
200. Zeisel, S. H., & Blusztajn, J. K. (1994). Choline and human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 14(Volume 14, 1994), 269–296. <https://doi.org/10.1146/Annurev.nu.14.070194.001413/cite/refworks>
201. Zeisel, S. H., Costa, K.-A. Da, Franklin, P. D., Alexander, E. A., Lamont, J. T., Sheard, N. F., & Beiser, A. (1991). Choline, an essential nutrient for humans. *The FASEB Journal*, 5(7), 2093–2098. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.5.7.2010061>
202. Zeisel, S. H., & Da Costa, K. A. (2009). Choline: An essential nutrient for public health. *W Nutrition Reviews* (T. 67, Numer 11, ss. 615–623). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x>
203. Zhang, L., Xu, Y., Li, X., Yang, F., Wang, C., & Yu, C. (2024). Multivitamin consumption and childhood asthma: a cross-sectional study of the NHANES database. *BMC Pediatrics*, 24(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12887-024-04540-5/FIGURES/6>
204. Zhang, N., Zhang, W., Guo, X., Liu, J., Li, S., Zhang, H., & Fan, B. (2022). Genistein protects against hyperglycemia and fatty liver disease in diet-induced prediabetes mice via activating hepatic insulin signaling pathway. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1072044. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.1072044>
205. Zhang, S., Kumari, S., Gu, Y., Wu, X., Li, X., Meng, G., Zhang, Q., Liu, L., Wu, H., Wang, Y., Zhang, T., Wang, X., Cao, X., Li, H., Liu, Y., Wang, X., Sun, S., Wang, X., Zhou, M., ... Niu, K. (2020). Soy Food Intake Is Inversely Associated with Newly Diagnosed Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the TCLSIH Cohort Study. *The Journal of nutrition*, 150(12), 3280–3287. <https://doi.org/10.1093/JN/NXAA297>

206. Zhou, R., Yang, M., Yue, C., Shi, Y., Tan, Y., Zha, L., Zhang, J., & Chen, S. (2023). Association between Dietary Choline Intake and Cardiovascular Diseases: National Health and Nutrition Examination Survey 2011–2016. *Nutrients*, 15(18). <https://doi.org/10.3390/NU15184036>
207. Zhu, J., Zhao, Q., Qiu, Y., Zhang, Y., Cui, S., Yu, Y., Chen, B., Zhu, M., Wang, N., Liu, X., Jiang, Y., Xu, W., & Zhao, G. (2021). Soy Isoflavones Intake and Obesity in Chinese Adults: A Cross-Sectional Study in Shanghai, China. *Nutrients*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/NU13082715>

9. Spis tabel

Tab. 1. Skład diet AIN-93M i jej modyfikacji zastosowanych podczas doświadczenia na modelu zwierzęcym w przeliczeniu na 1 kg diety.	53
Tab. 2. Skład ekstraktu izoflawonów sojowych (NovaSoy 400) użyty w doświadczeniu na modelu zwierzęcym (wraz z przeliczeniami zawartości poszczególnych aglikonów).	55
Tab. 3. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji <i>real-time PCR</i>	60
Tab. 4. Charakterystyka amplikonu zastosowanego dla analizowanych genów.	61
Tab. 5. Spożycie karmy w grupach szczurów – całe doświadczenie (I i II etap).	67
Tab. 6. Średnie masy względne narządów szczurów z różnych grup.	69

10. Spis rycin

Ryc. 1. Główne szlaki metaboliczne związane z choliną.	25
Ryc. 2. Podział fitoestrogenów.	36
Ryc. 3. Uproszczony schemat przemian izoflawonów w ustroju.	42
Ryc. 4. Schemat doświadczenia na modelu zwierzęcym.	54
Ryc. 5. Spożycie karmy w grupach szczurów – I etap doświadczenia.	65
Ryc. 6. Spożycie karmy w grupach szczurów – II etap doświadczenia.	66
Ryc. 7. Efektywność żywienia w poszczególnych grupach szczurów.	67
Ryc. 8. Przyrost masy ciała w grupach szczurów.	68
Ryc. 9. Zawartość tkanki tłuszczowej w różnych grupach szczurów wykorzystanych w doświadczeniu.	70
Ryc. 10. Zawartość beztłuszczowej masy ciała w różnych grupach szczurów wykorzystanych w doświadczeniu.	71
Ryc. 11. Obraz mikroskopowy wątroby szczurów (x10.0), z zastosowaniem metody barwienia hematoksyliną i eozyną.	73
Ryc. 12. Stężenie glukozy w surowicy krwi różnych grup szczurów.	74
Ryc. 13. Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi różnych grup szczurów. ...	75
Ryc. 14. Stężenie cholesterolu frakcji LDL w surowicy krwi różnych grup szczurów. ...	76
Ryc. 15. Stężenie cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi różnych grup szczurów. ...	77
Ryc. 16. Stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi różnych grup szczurów.	77
Ryc. 17. Stężenie aminotransferazy alaninowej w surowicy krwi różnych grup szczurów.	78

Ryc. 18. Stężenie aminotransferazy asparaginianowej w surowicy krwi różnych grup szczurów.	79
Ryc. 19. Stężenie VLDL w surowicy krwi różnych grup szczurów.	80
Ryc. 20. Stężenie fosfatydylocholiny w wątrobie szczurów z różnych grup.	81
Ryc. 21. Zawartość tłuszczu surowego w próbkach kału różnych grup szczurów.....	82
Ryc. 22. Relatywny poziom ekspresji genu <i>Pemt</i> w wątrobie różnych grup szczurów. ...	83
Ryc. 23. Relatywny poziom ekspresji genu <i>Ppar γ</i> w wątrobie różnych grup szczurów..	84
Ryc. 24. Relatywny poziom ekspresji genu <i>Srebp-1c</i> w wątrobie różnych grup szczurów.	85
Ryc. 25. Relatywny poziom ekspresji genu <i>Fasn</i> w wątrobie różnych grup szczurów. ...	86
Ryc. 26. Relatywny poziom białka PEMT w wątrobie różnych grup szczurów.....	87
Ryc. 27. Relatywny poziom białka PPAR γ w wątrobie różnych grup szczurów.....	88
Ryc. 28. Stężenie białka SREBP-1 w wątrobie różnych grup szczurów.....	89
Ryc. 29. Stężenie białka FAS w wątrobie różnych grup szczurów.	90