

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Cholesterol a žlučové kyseliny v metabolismu lipidů

Anna Brzáková

Bakalářská práce

2019

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Cholesterol and bile acids in lipid metabolism

Anna BrzÁková

Bachelor thesis

2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anna Brzáková**  
Osobní číslo: **C15080**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Cholesterol a žlučové kyseliny v metabolismu lipidů**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popište strukturu a vlastnosti cholesterolu.
2. Popište strukturu a vlastnosti žlučových kyselin.
3. Zaměřte se na funkce cholesterolu a žlučových kyselin při metabolických pochodech lipidů.
4. Stručně se zmiňte, s jakými nemocněními může být spojena špatná funkce těchto látek.
5. Zmiňte metody stanovení cholesterolu a žlučových kyselin v biochemii a kde jinde je stanovována hladina cholesterolu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**20. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 7. 2019

Anna Brzáková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí paní RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady, připomínky a ochotu, které mi pomohly při zpracování bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá charakteristikou cholesterolu a žlučových kyselin. Zaměřuje se na hlavní funkce cholesterolu a žlučových kyselin v metabolismu lipidů. Dále se zabývá onemocněními spojenými s jejich špatnou funkcí. Poslední kapitola popisuje metody stanovení cholesterolu a žlučových kyselin.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

cholesterol, apolipoproteiny, žlučové kyseliny, metabolismus, nealkoholická tuková jaterní choroba, ateroskleróza

## **ANOTATION**

This bachelor thesis deals with the characteristics of cholesterol and bile acids. It focused on the main functions of cholesterol and bile acids in lipid metabolism. It also deals with diseases associated with their malfunction. The last chapter describes methods of determination of cholesterol and bile acids.

## **KEYWORDS**

cholesterol, apolipoproteins, bile acids, metabolism, nonalcoholic fatty liver disease, atherosclerosis

# OBSAH

0	ÚVOD.....	13
1	CHOLESTEROL.....	15
1.1	Objev cholesterolu .....	15
1.2	Struktura cholesterolu .....	15
1.3	Vlastnosti cholesterolu .....	16
1.4	Zdroj cholesterolu .....	16
1.5	Cholesterol v krvi.....	16
1.5.1	Lipoproteiny.....	17
1.5.2	Apolipoproteiny .....	19
1.6	Syntéza cholesterolu.....	20
2	ŽLUČOVÉ KYSELINY .....	23
2.1	Objev žlučových kyselin.....	23
2.2	Struktura žlučových kyselin.....	23
2.3	Vlastnosti žlučových kyselin.....	24
2.4	Funkce žlučových kyselin .....	25
2.5	Syntéza žlučových kyselin .....	25
2.5.1	Klasická dráha syntézy žlučových kyselin .....	26
2.5.2	Alternativní dráha syntézy žlučových kyselin .....	26
2.5.3	Yamasaki cesta syntézy žlučových kyselin .....	27
2.5.4	25-hydroxylační cesta syntézy žlučových kyselin.....	27
3	FUNKCE CHOLESTEROLU A ŽLUČOVÝCH KYSELIN PŘI METABOLICKÝCH POCHODECH.....	30
3.1	Enterohepatální oběh.....	30
3.2	Reverzní transport cholesterolu (RCT) .....	31
3.2.1	Cholesterol ester transportní protein (CETP) .....	33



3.2.2	Niemann-Pick C2 (NPC2) .....	34
3.3	Homeostáza buněčného cholesterolu .....	34
4	ONEMOCNĚNÍ SPOJENÁ SE ŠPATNOU FUNKCÍ CHOLESTEROLU A ŽLUČOVÝCH KYSELIN.....	35
4.1	Nedostatek primárních žlučových kyselin .....	35
4.1.1	Cerebrotendinózní xantomatóza .....	35
4.2	Nealkoholická tuková jaterní choroba (NAFLD) .....	36
4.3	Familiární hypercholesterolemie.....	37
4.4	Ateroskleróza .....	38
5	METODY STANOVENÍ CHOLESTEROLU A ŽLUČOVÝCH KYSELIN .....	40
5.1	Metody stanovení cholesterolu .....	40
5.1.1	Modifikovaná Abell-Kendallová metoda .....	40
5.1.2	Enzymatické testy .....	40
5.1.3	Plynová (GC) a kapalinová chromatografie (LC).....	41
5.2	Metody stanovení žlučových kyselin .....	42
6	ZÁVĚR.....	43
	Bibliografie .....	44

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACAT – acyl-CoA-cholesterol acyltransferáza

acetyl-CoA – acetylkoenzym A

ACOX2 – acyl-CoA oxidáza

AKR1C4 – 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenáza

AKR1D1 –  $\Delta^4$ -3-oxosteroid-5 $\beta$ -reduktáza

AMACR –  $\alpha$ -methylacylCoA racemáza

Apo A – apolipoprotein A

Apo B – apolipoprotein B

Apo D – apolipoprotein D

Apo E – apolipoprotein E

BAAT – N-acyltransferáza

CA – kyselina cholová

CDCA – kyselina chenodeoxycholová

CETP – protein pro přenos cholesterol esteru (z angl. cholesteryl ester transfer protein)

CTX – Cerebrotendinózní xantomatóza

CYP27A1 – sterol 27-hydroxyláza

CYP7A1 – 7 $\alpha$ -hydroxyláza

CYP7B1 – oxysterol-7 $\alpha$ -hydroxyláza

CYP8B1 – sterol 12-hydroxyláza

DBP – D-bifunkční protein

DCA – kyselina deoxycholová

disease)

ESI – ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)

ESI-MS – hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (z angl. electrospray ionisation mass spectrometry)

FAB – ionizace nárazem rychlými atomy (z angl. fast atom bombardment)

FH – familiární hypercholesterolemie

FXR – farnesoid X receptor

GC – plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)

HDL – lipoproteiny s vysokou hustotou

HL – jaterní lipáza (z angl. hepatic lipase)

HMG-CoA – 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA

HMGR – 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktáza

HMGS – 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntáza

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)

HSD3B7 – 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid oxidoreduktáza

CH – chylomikrony

CH25H – sterol 25-hydroxyláza

IDL – lipoproteiny o střední hustotě

LC – kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)

LCA – kyselina lithocholová

LCAT – lecitin-cholesterol acyltransferáza

LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí

LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou

LDL-R – LDL receptor

M-BAR – receptor membránového typu pro žlučové kyseliny (z angl. membrane-type receptor for bile acids)

MS – hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)

NAFLD – nealkoholická tuková jaterní choroba (z angl. nonalcoholic fatty liver)

NASH – nealkoholická steatohepatitida (z angl. nonalcoholic steatohepatitis)

NPC2 – Niemann-Pick C2 onemocnění

PCSK9 – proprotein konvertáza subtilisin kexin typu 9

PLTP – protein pro přenos fosfolipidů (angl. phospholipid transfer protein)

PON 1 – paraoxonáza 1

PPAR- $\alpha$  – receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem (z angl. peroxisome proliferator-activated receptor)

RCT – reverzní transport cholesterolu (z angl. reverse cholesterol transport)

SREBP – proteiny vázající sterolový regulační prvek (z angl. sterol regulatory element-binding proteins)

UCDA – kyselina ursodeoxycholová

VDR – receptor vitamínu D (z angl. vitamin D receptor)

VLDL – lipoproteiny s velmi nízkou hustotou

## 0 ÚVOD

Cholesterol je přírodní organická sloučenina, kterou řadíme do skupiny steroidů. Může se vyskytovat ve formě esterů nebo jako volný cholesterol, který tvoří hlavní složku buněčných membrán. Do organismu se cholesterol dostává vstřebáváním ze stravy přes trávicí trakt nebo je syntetizován z acetyl-CoA. Cholesterol je přenášen krevním řečištěm pomocí lipoproteinových částic. Je výchozí látkou pro biosyntézu žlučových kyselin, vitamínu D a veškerých steroidů v těle.

Žlučové kyseliny jsou amfipatické molekuly, které považujeme za biologické detergenty napomáhající absorpci lipidů a vitaminů rozpustných v tucích. Žlučové kyseliny dělíme na primární, které vznikají syntézou z cholesterolu v játrech, a sekundární, které vznikají z primárních žlučových kyselin ve střevě pomocí bakteriálních enzymů. Důležitou funkcí žlučových kyselin je exkrece cholesterolu a fosfolipidů z těla.

Cholesterol a žlučové kyseliny jsou nezbytné pro správné fungování lidského organismu, pro fungování metabolismu lipidů a udržování jeho homeostázy. Schopnost žlučových kyselin působit jako signální molekuly je důležitá pro regulaci enzymů, které zprostředkovávají transport léků a zajišťují správné fungování metabolismu.

Nejčastějším onemocněním, které souvisí se zvýšenou hladinou cholesterolu v plazmě, je ateroskleróza, při které dochází k usazování aterosklerotického plaku ve stěnách cév. Tato nemoc je patologickým základem pro vznik řady kardiovaskulárních onemocnění, jako je například infarkt myokardu nebo mrtvice. Se zvýšenou hladinou cholesterolu v krvi je spojena i familiární hypercholesterolemie. Špatná funkce žlučových kyselin nebo jejich nedostatek se může projevit vznikem onemocnění, jako jsou nealkoholická tuková jaterní choroba (NAFLD), která vzniká nadměrnou akumulací tuku v játrech, a nealkoholická steatohepatitida (NASH), která mohou vést k cirhóze, a dokonce i k rakovině jater.

V biochemii se pro stanovení cholesterolu využívají fluorometrické a kolorimetrické enzymatické testy. V rámci rutinních krevních testů je stanovován celkový cholesterol společně s HDL a LDL cholesterolem a triacylglyceroly. Respektive se může stanovit jen celkový cholesterol, HDL cholesterol a triacylglyceroly a LDL cholesterol může být stanoven nepřímou pomocí výpočtu. Enzymatické testy se používají i pro stanovení obsahu cholesterolu v potravinách. Mezi další možnosti stanovení cholesterolu v potravinách patří klasické chemické metody nebo analytické instrumentální metody jako je plynová a kapalinová

chromatografie. Stanovení žlučových kyselin se v dnešní době provádí také analytickými instrumentálními metodami.

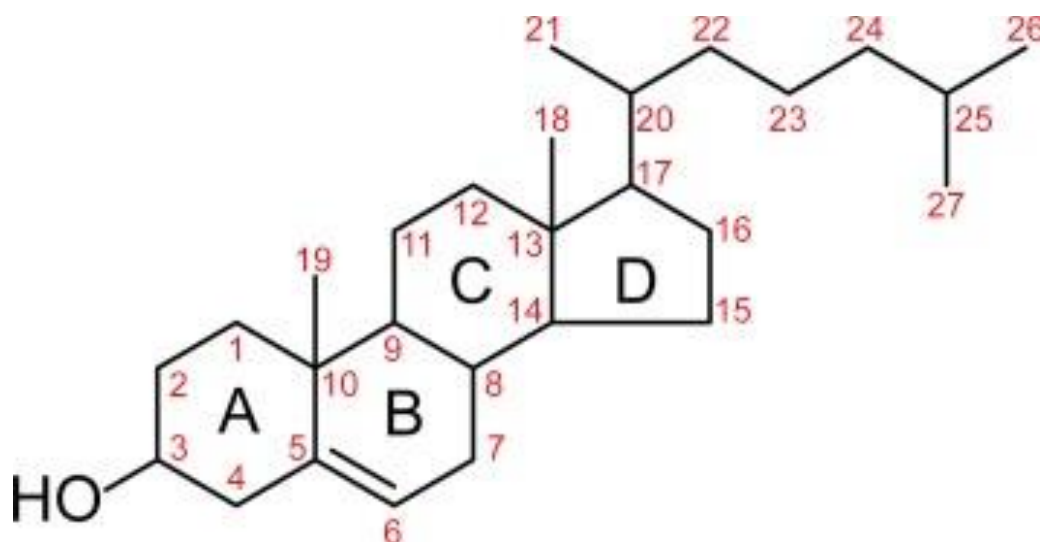
# 1 CHOLESTEROL

## 1.1 Objev cholesterolu

Jako první cholesterol izoloval A. Green ze žluče v roce 1788. První syntéza cholesterolu v laboratoři byla provedena v roce 1951 R. B. Woodwardem a R. Robinsonem. První izolaci cholesterolu ve formě, v jaké ho známe dnes, připisujeme Francouzům A. F. de Fourcroy a Poullietierovi de la Salle. Oba vědci popsali substanci izolovanou ze žlučových kamenů jako krystalickou látku. V roce 1816 bylo navrženo, aby se tato látka označovala jako „cholesterine“ z řečtiny, kde „chole“ znamená žluč a „stereos“ pevný. Francouzský chemik M. Berthelot pak v roce 1859 navrhl změnu názvu na „cholesterol“, a to po zjištění, že jde o látku, která obsahuje hydroxyskupinu [1; 2].

## 1.2 Struktura cholesterolu

Cholesterol je přírodní látka, která sestává ze čtyř uhlovodíkových kruhů a postranního řetězce obsahujícího osm uhlíků. Chemicky je cholesterol organickou sloučeninou patřící do skupiny steroidů. Hydroxy-skupina ho řadí do podskupiny sterolů, konkrétně jde o zoosterol. Jeho sumární vzorec je  $C_{27}H_{46}O$ . V čistém stavu je to bílá, krystalická látka, která je bez zápachu a bez chuti. Cholesterol je vosková látka, přítomna v krevní plazmě, živočišných tkáních a v malých množstvích v některých rostlinách (zejména v chloroplastech) a bakteriích [3; 4]. Strukturální vzorec cholesterolu je znázorněn na obrázku 1.



**Obrázek 1:** Strukturální vzorec cholesterolu; převzato a upraveno z: [5].

### **1.3 Vlastnosti cholesterolu**

V organismu se cholesterol vyskytuje jako volný nebo ve formě esterů s mastnými kyselinami. Volný cholesterol je součástí buněčných membrán [6]. Estery cholesterolu tvoří zásobu cholesterolu ve většině tkání [7].

Cholesterol plní v těle mnoho důležitých funkcí. Organismus ho potřebuje na stavbu buněčných membrán, jako izolační vrstvu nervových buněk a na vytvoření žlučových kyselin, které se účastní procesů trávení lipidů. Je také nezbytný pro syntézu vitamínu D a je prekurzorem veškerých steroidů v těle [7; 8]. Přeměna cholesterolu na vitamin D a veškeré steroidní látky probíhá na vnitřní straně mitochondrií [9].

### **1.4 Zdroj cholesterolu**

Cholesterol je do organismu přijímán ve stravě. Potraviny s jeho vysokým obsahem jsou zejména maso, vaječný žloutek, játra a mozek. Je vstřebáván v zažívacím traktu, nebo je syntetizován de novo z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA). Zhruba polovina cholesterolu v těle pochází ze syntézy. V játrech je syntetizováno asi 10 % z celkové produkce cholesterolu u člověka, ve střevě asi 15 % a zbyvajícím podíl v kůži. Cholesterol může být syntetizován prakticky ve všech tkáních [7; 6].

### **1.5 Cholesterol v krvi**

V krvi je cholesterol vázaný na lipoproteiny a krevním řečištěm je transportován do periferních tkání těla. Podle typu lipoproteinu, který slouží k transportu cholesterolu a triacylglycerolů, rozdělujeme cholesterol na HDL, LDL a VLDL cholesterol [4]. Fyziologické hodnoty cholesterolu v krvi jsou uvedeny v tabulce 1.

HDL cholesterol je cholesterol, který je v krvi nesen lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL). Ten tvoří asi 20–30 % cholesterolu v krvi. HDL částice transportují přebytečný cholesterol z periferních tkání do jater, kde je žlučí odstraněn z těla. Vysoká hladina HDL cholesterolu v plazmě zřejmě chrání před aterosklerózou a snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. To je důvod, proč je HDL cholesterol označován jako „dobrý“ cholesterol [10; 11].

LDL cholesterol je cholesterol, který je transportován lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL). Jeho hlavní úlohou je transport cholesterolu krevním řečištěm z jater do extrahepatálních tkání a do buněk, které nesou LDL receptory [12]. Když je v krvi vysoká hladina LDL cholesterolu, může docházet k jeho usazování ve stěnách tepen, které zásobují srdce a nervovou tkáň. To je



důvod, proč je LDL cholesterol často nazýván „špatným“ cholesterolem [8]. Mezi hladinou LDL cholesterolu a mírou kardiovaskulárních onemocnění existuje přímý vztah [13].

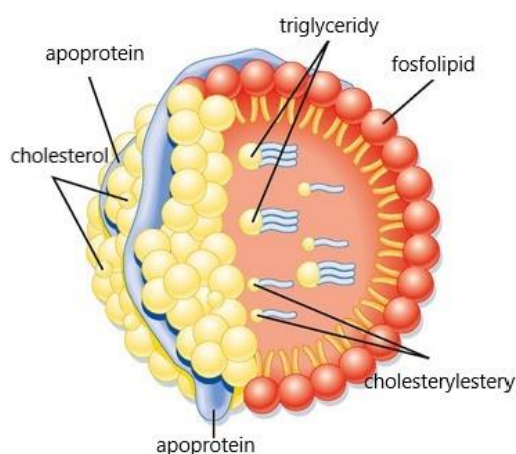
VLDL cholesterol je cholesterol, který je transportován pomocí lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL). Tyto částice tvoří asi 15–20 % celkového cholesterolu v krvi spolu s většinou triacylglycerolů [10].

**Tabulka 1:** Fyziologické hodnoty cholesterolu v krvi nalačno; převzato a upraveno z: [14].

Celkový cholesterol (mmol/L)	3,8 – 5,2
HDL cholesterol (mmol/L)	0,9 – 1,5
LDL cholesterol (mmol/L)	2,0 – 3,0
Poměr celkový cholesterol/HDL cholesterol	3,0 – 4,8
Triacylglyceroly (mmol/L)	0,8 – 2,6

### 1.5.1 Lipoproteiny

Lipoproteiny jsou makromolekulární látky, které jsou složeny z lipidů a bílkovin. Jejich jádro, které je tvořeno estery cholesterolu a triacylglycerolů, je hydrofobní. Amfipatický obal je tvořen fosfolipidy a volným cholesterolem. Bílkovinná složka lipoproteinu je označována jako apolipoprotein (zkráceně apoprotein). Struktura lipoproteinu je znázorněna na obrázku 2. Celková velikost lipoproteinu se pohybuje v rozmezí od 8 do 1200 nm [12].



**Obrázek 2:** Struktura lipoproteinu; převzato a upraveno z: [15]

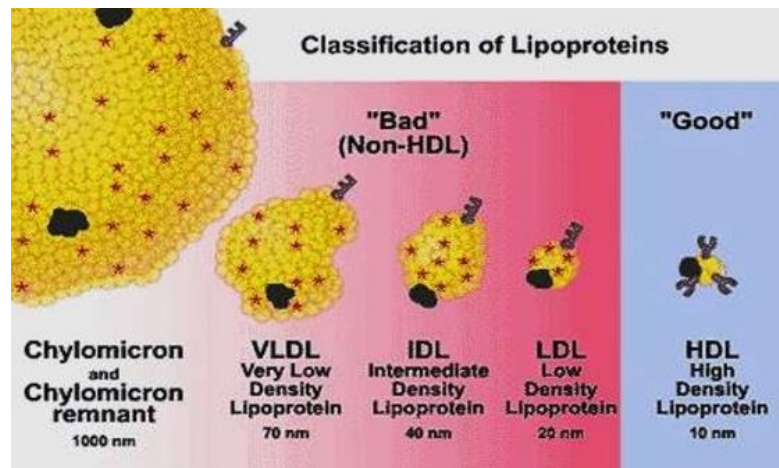
Hlavní funkcí lipoproteinů je transport cholesterolu a ostatních lipidů v plazmě [12]. Podílejí se také na jiných biologických procesech, jako například koagulaci, regeneraci tkání a imunitních reakcích. Lipoproteiny můžeme členit podle řady hledisek, např. podle zastoupení tuků nebo podle typu apolipoproteinu. Nejrozšířenější je rozdělení podle jejich hustoty, kdy rozlišujeme chylomikrony (CH), lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL), lipoproteiny o střední hustotě (IDL), lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) a lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL) [16; 17]. Jejich základní biochemické a fyzikální vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 2. Rozdělení a rozdíl velikosti lipoproteinů je naznačen na obrázku 3.

**Tabulka 2:** Vlastnosti lipoproteinů; převzato z: [17].

	<b>Chylomikrony</b>	<b>VLDL</b>	<b>IDL</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>
<b>Hustota [g/ml]</b>	< 0,95	0,95 – 1,006	1,006 – 1,019	1,019 – 1,063	1,063 – 1,210
<b>Velikost [nm]</b>	75 – 1200	30 – 80	25 – 35	18 – 25	5 – 12
<b>Proteiny [%]</b>	1 – 2	8	19	22	47
<b>Triacylglyceroly [%]</b>	86	55	23	6	4
<b>Cholesterol [%]</b>	5	19	38	50	19
<b>Fosfolipidy [%]</b>	7	18	20	22	30

Tyto třídy lipoproteinů netvoří zcela homogenní skupinu a můžeme je ještě dále rozdělovat. Částice LDL se dělí podle svojí velikosti a hustoty. Se zvyšující se hustotou klesá velikost těchto částic. Podle hustoty jsou LDL částice ještě rozdělovány na čtyři hlavní skupiny LDL-I, LDL-II, LDL-III a LDL-IV. U rozdělení založeného na průměru částic jsou klasifikovány dvě hlavní skupiny: skupina A a skupina B. LDL částice skupiny A mají průměr 25,5 nm nebo větší. Průměr částic skupiny B je menší než 25,5 nm. U LDL částic skupiny B byl zjištěn vyšší obsah triacylglycerolů a cholesterolu ve srovnání s LDL částicemi skupiny A [12].

Stejně jako LDL, jsou i HDL částice heterogenní skupinou. Podle hustoty je rozdělujeme na HDL-2, které jsou velké, lehké a bohaté na lipidy, a HDL-3, které označujeme jako malé, husté a bohaté na proteiny. Tyto dvě skupiny se podle rostoucí hustoty a klesající velikosti dají dále rozdělit do 5 podtříd, a to na HDL-2b, HDL-2a, HDL-3a, HDL-3b a HDL-3c. Kromě různých fyzikálních vlastností se liší i aterogenním potenciálem. HDL částice poskytují účinnou ochranu LDL před oxidativním poškozením volnými radikály, což vede k inhibici oxidace LDL částic. Obecně platí, že HDL-3 částice jsou v tomto případě účinnější než HDL-2 částice [18].



**Obrázek 3:** Rozdělení lipoproteinů podle hustoty; převzato z [19].

### 1.5.2 Apolipoproteiny

Proteinové části lipoproteinů jsou označovány jako apolipoproteiny. Tyto apolipoproteiny jsou amfipatické povahy a obsahují polární a nepolární aminokyselinové zbytky, které pomáhají solubilizovat a stabilizovat nerozpustné lipidy obsažené v lipoproteinových částicích. Existuje více typů apolipoproteinů, z nichž každý má specifické funkce a relativně konstantní složení [17].

HDL částice mohou obsahovat několik typů proteinů, jako je apolipoprotein A (Apo A), Apo E a Apo D [17]. Ale hlavní složkou HDL je Apo A, který můžeme ještě rozdělit na další podtřídy: Apo AI, Apo AII a Apo AIV. Apo AI je hlavní HDL apolipoprotein, který představuje zhruba 60–75 % Apo A v HDL lipoproteinu a je nezbytný pro jeho tvorbu. Apo AI je syntetizován v játrech a tenkém střevě. Má značné antiaterogenní vlastnosti a také je zodpovědný za aktivitu lecithin-cholesterolacyltransferázy (LCAT), což je enzym, který katalyzuje esterifikaci cholesterolu před jeho katabolismem a vylučováním z jater [20; 18].

Apo AII je také syntetizován v játrech. Především je spojený s velkými částicemi HDL, tedy s částicemi HDL-2. Experimenty na transgenních myších ukazují, že Apo AII z HDL částic vytěšňuje Apo AI a také antioxidantní enzym paraoxonázu 1 (PON 1). Apo AIV je syntetizován ve střevní sliznici a vylučován na chylomikronech. Studie *in vitro* ukázala, že pouze bezlipidová forma Apo AIV vykazovala antiaterogenní vlastnosti podobné vlastnostem Apo AI [18].

Apolipoprotein B je hlavní proteinová složka chylomikronů a LDL lipoproteinů, u kterých tvoří asi 90–95 %. Apo B je smíšená skupina proteinů vyskytujících se v plazmě ve dvou hlavních formách: Apo B48 a Apo B100. Apo B48 je syntetizován výlučně ve střevě, Apo B100 je

syntetizován v játrech. Oba apolipoproteiny B jsou rozpoznávány receptorem LDL, a proto hrají rozhodující úlohu v katabolismu LDL [20; 21].

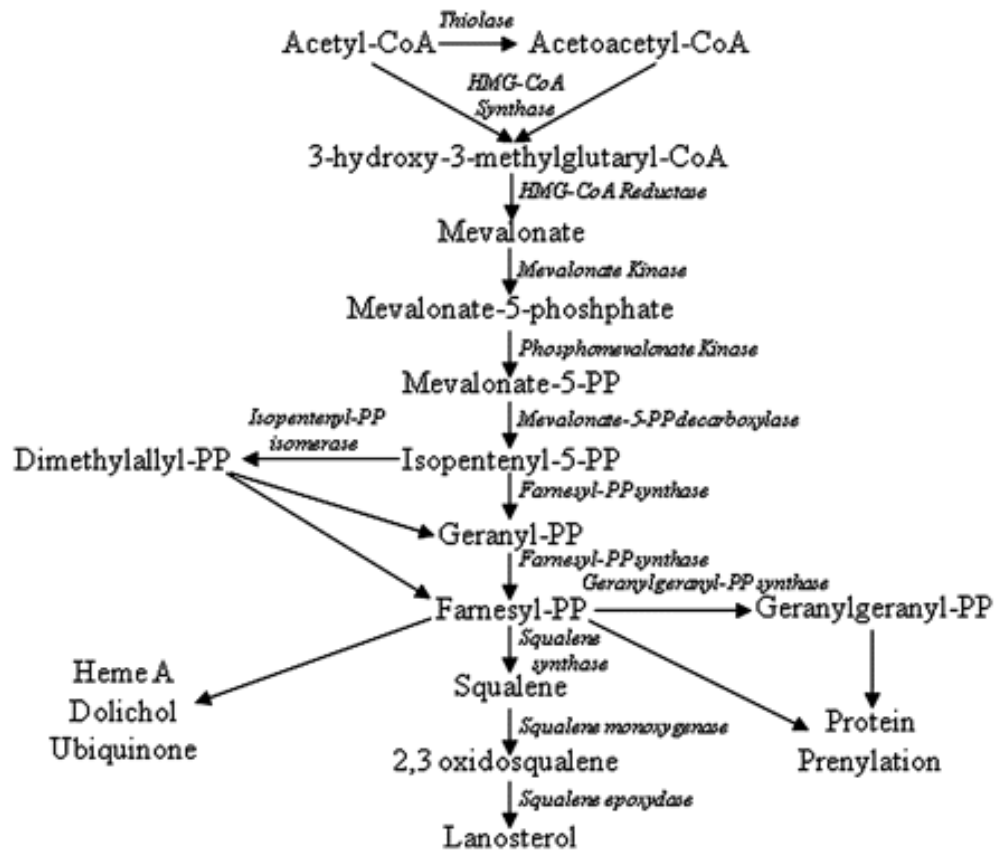
## 1.6 Syntéza cholesterolu

Biosyntéza cholesterolu je jeden z nejsložitějších mechanismů, který byl předmětem dlouhého zkoumání. Přesto však zůstávají některé detaily neobjasněné. Podle Blocha rozdělujeme biosyntézu cholesterolu do několika fází. Nejdříve z acetátu vznikají izoprenové jednotky, a poté dochází k vytvoření intermediárního skvalenu. Jeho cyklizací vzniká lanosterol a z něj následně dochází k tvorbě cholesterolu [22; 23]. Dnes je známo, že z acetátu nejdříve vzniká mevalonát a až z něj pomocí několika enzymů dochází k vytvoření izoprenoidů [24]. Syntéza cholesterolu z acetátu až do fáze lanosterolu je znázorněna na obrázku 4. Přeměna lanosterolu na cholesterol je uvedena na obrázku 5.

Výchozí látkou a hlavní zdrojem uhlíku pro biosyntézu cholesterolu je acetyl-CoA. Pomocí acetoacetyl-CoA thiolázy dochází ke kondenzaci dvou acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA. Zároveň dochází k uvolnění CoASH [25; 24]. Kondenzací acetoacetyl-CoA s další molekulou acetyl-CoA vzniká 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) pomocí enzymu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntázy (HMGS). Dále dochází k redukci 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA pomocí 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktázy (HMGR) za vzniku kyseliny mevalonové. HMGR je enzym, který reguluje rychlost biosyntézy cholesterolu. Za přítomnosti mevalonát kinázy a ATP probíhá fosforylace a z kyseliny mevalonové vzniká fosfomevalonát. Ten je dále přeměňován na difosfomevalonát působením fosfomevalonát kinázy. Nakonec probíhá dekarboxylace mevalonát difosfát dekarboxylázou a z difosfomevalonátu vzniká izopentyl difosfát [23; 24].

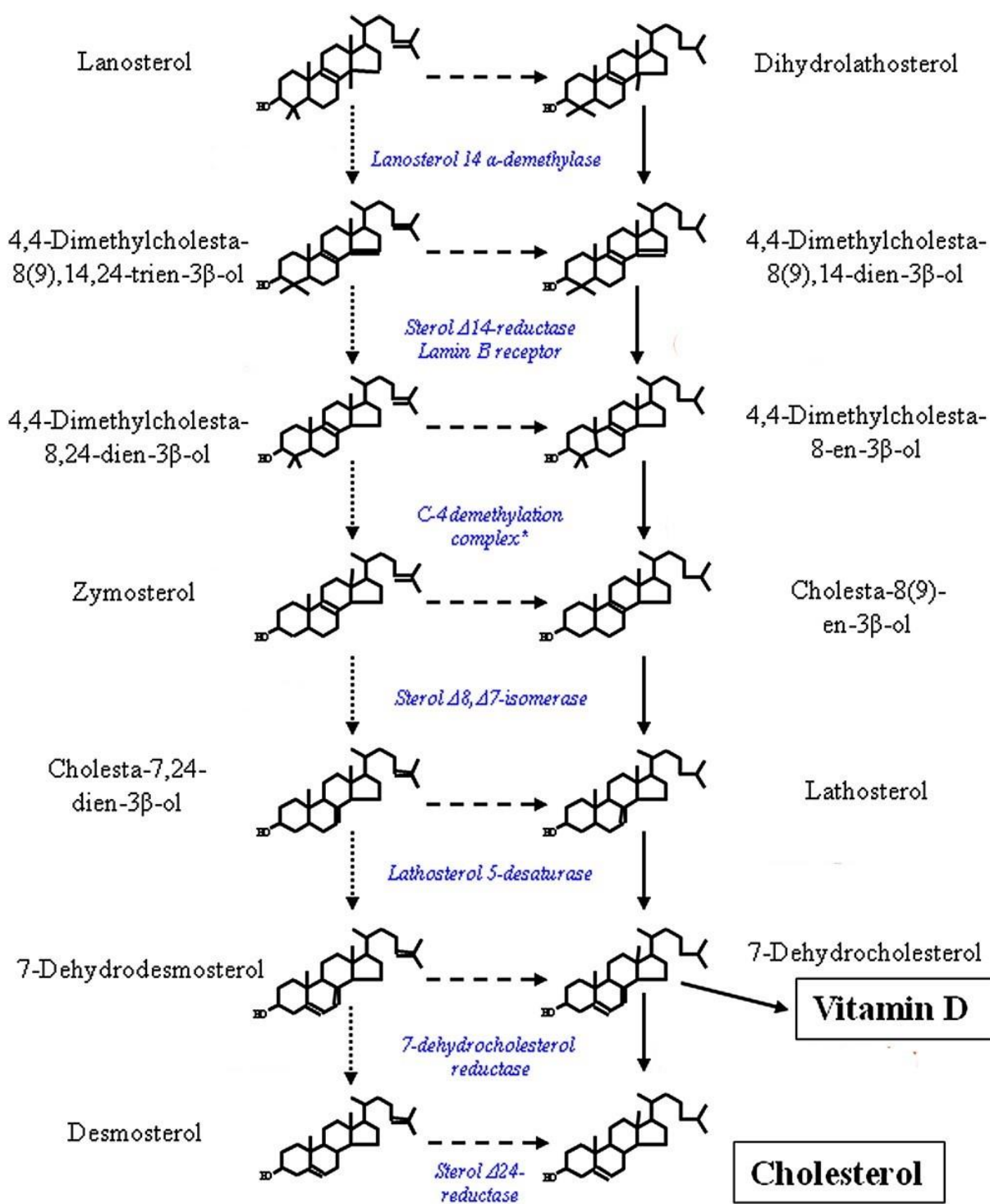
Pro vznik skvalenu je potřeba, aby proběhla izomerace izopentyl difosfátu, protože samotný není dostatečně reaktivní. Proto nejprve probíhá jeho izomerace, následně dochází ke kondenzaci a vzniká formgeranyl difosfát za katalýzy geranyl difosfát syntázou. Znovu probíhá kondenzace s izopentyl difosfátem za vzniku farnesyl difosfátu. Dvě molekuly farnesyl difosfátu následně kondenzují difosfátovými konci za vzniku polyenskvalenu C<sub>30</sub> pomocí skvalen syntázy [23; 22].

Skvalen podléhá oxidaci působením skvalen epoxidázy. Vzniká 2,3-oxidoskvalen, který může být cyklizován oxidoskvalen cyklázou, čímž dochází ke vzniku lanosterolu [26].



**Obrázek 4:** Syntéza cholesterolu z acetyl-CoA po lanosterol; převzato z: [27].

Přeměna lanosterolu na cholesterol, která je uvedena na obrázku 5, zahrnuje postupné odstranění tří methylových skupin v 10 enzymatických reakcích za přítomnosti devíti různých enzymů, které se nacházejí v endoplazmatickém retikulu. V tomto případě byly popsány dvě cesty, které se navzájem protínají. Volba jedné z drah je určena stupněm, ve kterém dochází na pozici C<sub>24</sub> v postranním řetězci lanosterolu k redukci dvojné vazby. Pokud se tato dvojná vazba zachová do poslední reakce, syntéza cholesterolu probíhá přes desmosterol. Tuto cestu označujeme jako tzv. Blochovu cestu. Pokud však dochází k redukci dvojné vazby na pozici C<sub>24</sub> hned na začátku přeměny lanosterolu, syntéza cholesterolu dále probíhá přes 7-dehydrocholesterol. Tato cesta biosyntézy cholesterolu je označována jako Kandutsch-Russellova cesta. Předpokládá se, že z hlediska kinetiky je upřednostňována cesta Kandutsch-Rusellova. Hlavní kontrolní body v syntéze cholesterolu jsou před vznikem skvalenu pomocí 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktázy a po tvorbě skvalenu [28; 23].



**Obrázek 5:** Přeměna lanosterolu na cholesterol; převzato a upraveno z: [27].

## 2 ŽLUČOVÉ KYSELINY

### 2.1 Objev žlučových kyselin

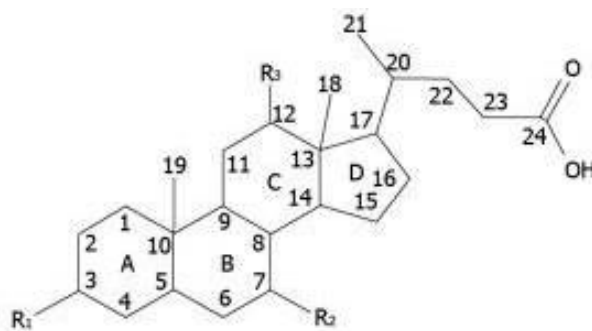
První zmínka o žlučových kyselinách je z roku 1848, kdy byla ve žluči objevena kyselina cholová (CA). Poté byly prováděny další studie, díky kterým se podařilo identifikovat další žlučové kyseliny, konkrétně kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA), kyselinu lithocholovou (LCA), kyselinu ursodeoxycholovou (UCDA), kyselinu deoxycholovou (DCA) a kyselinu muricholovou (MCA), která se však nachází pouze u myši. Zásoba žlučových kyselin a jejich relativní koncentrace v organismu se může zásadně měnit a také ovlivňovat procesy závislé na žlučových kyselinách [29].

### 2.2 Struktura žlučových kyselin

Žlučové kyseliny tvoří skupinu strukturně podobných molekul. Struktura žlučových kyselin je odvozena od nasyceného tetracyklického uhlovodíkového cyklopentan perhydrofenanthrenu, který se označuje jako steroidní jádro, na které je vázán krátký alifatický řetězec. Jádro je složeno ze tří šestičlenných kruhů (A, B, C) a jednoho pětičlenného kruhu (D). V závislosti na cis- nebo trans-konfiguraci mezi kruhy A a B má jádro buď zakřivenou nebo plochou strukturu. Cis-konfigurace se vyskytuje zpravidla u vyšších obratlovců a trans-konfigurace u nižších obratlovců [30; 31]. Mezi hlavní lidské žlučové kyseliny patří kyselina cholová, kyselina chenodeoxycholová, kyselina deoxycholová, kyselina ursodeoxycholová, kyselina lithocholová [30].

Žlučové kyseliny se dělí na primární a sekundární. Mezi primární žlučové kyseliny řadíme například kyselinu cholovou (CA) a kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA). Mezi hlavní sekundární žlučové kyseliny patří kyseliny deoxycholová (DCA) a kyselina lithocholová (LCA) [32].

Žlučové kyseliny se liší ve struktuře postranního řetězce, stereochemii A/B kruhu a distribuci, počtu, polohách a stereochemii hydroxylových skupin ve steroidním jádru (viz obr. 6) [31].



název	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
cholanová kyselina	H	H	H
cholová kyselina	OH	OH	OH
chenodeoxycholová kyselina	OH ( $\alpha$ )	OH ( $\alpha$ )	H
deoxycholová kyselina	OH	OH	OH
ursodeoxycholová kyselina	OH ( $\alpha$ )	OH ( $\beta$ )	H
lithocholová kyselina	OH	H	H

**Obrázek 6:** Struktura žlučových kyselin; převzato a upraveno z: [30].

Pojmy „žlučové kyseliny“ či „žlučové soli“ se obecně používá pro označení kyselin, které obsahují 24 uhlíků. Tyto kyseliny se vyskytují převážně u vyšších obratlovců a tvoří hlavní část lidské žluči, ve které jsou téměř všechny v konjugaci s taurinem nebo glycinem. Existují však i žlučové kyseliny s 25-27 uhlíkovými atomy, které označujeme jako „primitivní“. Tyto žlučové kyseliny se nacházejí u nižších obratlovců (např. plazů a obojživelníků) [30].

### 2.3 Vlastnosti žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou amfipatické molekuly, které vznikají v játrech jako produkty metabolismu cholesterolu [33]. Primární žlučové kyseliny jsou syntetizovány z cholesterolu v játrech buď klasickou nebo alternativní cestou (viz kapitola 2.5). Sekundární žlučové kyseliny vznikají z primárních žlučových kyselin ve střevě pomocí bakteriálních enzymů. Tyto enzymy se nachází v endoplazmatickém retikulu, mitochondriích, cytosolu a peroxisomech [33; 32].

Počet a složení žlučových kyselin v organismu je ovlivněno mnoha faktory, jako například stravou, léky, hormony, střevní mikroflórou, patologickými stavy a cirkadiálními rytmy. Na těchto faktorech je také závislá rychlost syntézy žlučových kyselin a její regulace [34].



## 2.4 Funkce žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou důležité pro exkreci cholesterolu a fosfolipidů z těla. Napomáhají hydrolýze lipidů při trávení pomocí pankreatických enzymů, jako je pankreatická kolipáza a lipáza. Zároveň omezují proliferaci nežádoucích bakterií a jejich nadměrný růst ve střevech [35].

Žlučové kyseliny považujeme za biologické detergenty, které napomáhají k absorpci lipidů a vitamínů rozpustných v tucích ve střevech tím, že s nimi vytváří smíšené micely. Tvorba těchto micel je důležitá pro solubilizaci cholesterolu ve žluči, která omezuje krystalizaci cholesterolu a tím předchází tvorbě žlučových kamenů. Žlučové kyseliny jsou důležité pro regulaci správného toku žluči, metabolismu lipidů a udržování glukózové a energetické homeostázy [33].

Působí také jako signální molekuly, což znamená, že regulují enzymy, zprostředkovatele metabolismu a transport léků. Jejich signalizační schopnosti se týkají především aktivace FXR (farnesoid X receptoru), VDR (vitamín D receptoru), PPAR- $\alpha$  (receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem), M-BAR (receptoru membránového typu pro žlučové kyseliny) a některých dalších receptorů. Žlučové kyseliny mají řadu dalších fyziologických funkcí. Například vážou kationty těžkých kovů, jako je zinek, železo či měď, které jsou vylučovány do žlučového traktu [35; 36].

## 2.5 Syntéza žlučových kyselin

Biosyntéza žlučových kyselin je vícestupňový enzymaticky katalyzovaný proces, který probíhá v játrech. Tento proces zahrnuje nejméně 17 enzymů a různých transportních proteinů, které se nachází v buněčných organelách, jako například v cytosolu, mitochondriích a peroxisomech. Tyto reakce vedou ke změnám struktury cholesterolu a dochází ke vzniku primárních žlučových kyselin [32; 37]. Syntéza probíhá dvěma hlavními cestami, které označujeme jako cestu klasickou (nebo neutrální) a cestu alternativní (označovanou také jako kyselou). Existují ještě dvě méně časté dráhy, cesta Yamasaki a 25-hydroxylační cesta. Všechny dráhy se od sebe liší enzymy a metabolickými meziprodukty, které se na nich podílejí [37]. Jednotlivé dráhy jsou popsány v kapitolách 2.5.1 až 2.5.4 a jejich průběh je znázorněn na obrázcích 7 a 8.

### 2.5.1 Klasická dráha syntézy žlučových kyselin

Prvním krokem klasické dráhy syntézy žlučových kyselin je hydroxylace cholesterolu na  $7\alpha$ -hydroxycholesterol, kterou katalyzuje mikrozomální enzym  $7\alpha$ -hydroxyláza (CYP7A1), který je zároveň enzymem regulujícím rychlost této biosyntetické dráhy. Regulace jeho aktivity je velmi významná pro udržení homeostázy cholesterolu a žlučových kyselin [32].

Nejdříve dochází k modifikaci steroidního kruhu, a teprve poté proběhne oxidační zkrácení alifatického postranního řetězce.  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid oxidoreduktáza (HSD3B7) převádí  $7\alpha$ -hydroxycholesterol na 3-oxo- $\Delta^4$ -formu. Poté dochází k redukci  $\Delta^4$ -dvojitě vazby pomocí  $\Delta^4$ -3-oxosteroid-5 $\beta$ -reduktázy (AKR1D1). Zároveň dochází ke konfiguraci s 5 $\beta$ -vodíkem. Poslední modifikací steroidní struktury je redukce 3-oxo skupiny na 3 $\alpha$ -alkohol, kterou katalyzuje 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenáza (AKR1C4). Jestliže dojde k hydroxylaci na pozici C<sub>12</sub> pomocí sterol 12-hydroxylázy (CYP8B1), konečným produktem bude kyselina cholová (CA). Pokud k hydroxylaci nedojde, vznikne touto reakcí kyselina chenodeoxycholová (CDCA) u lidí nebo kyselina muricholová u myší [37; 32].

Dalšími kroky biosyntézy jsou oxidace a zkrácení alifatického postranního řetězce. Pomocí sterol 27-hydroxylázy (CYP27A1) vzniká na pozici C<sub>27</sub> nejdříve hydroxylová a poté karboxylová skupina. Po oxidaci dochází k transportu oxidovaných meziproductů z mitochondrií do peroxisomů. Zde probíhá zkrácení postranního řetězce o tři koncové uhlíky řadou reakcí, které jsou obdobné reakcím podílejícím se na  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. Tento proces se nazývá peroxisomální  $\beta$ -oxidace a účastní se ho několik peroxisomálních enzymů, jako například acyl-CoA oxidáza (ACOX2),  $\alpha$ -methylacylCoA racemáza (AMACR) a D-bifunkční protein (DBP) [32].

### 2.5.2 Alternativní dráha syntézy žlučových kyselin

U alternativní neboli kyselé dráhy syntézy žlučových kyselin nejdříve dochází k vytvoření C<sub>27</sub>-karboxylové kyseliny, poté proběhne modifikace steroidního kruhu, a nakonec dojde ke zkrácení postranního řetězce. K vytvoření C<sub>27</sub>-karboxylové kyseliny dochází pomocí sterol 27-hydroxylázy (CYP27A1). Následuje  $7\alpha$ -hydroxylace, kterou katalyzuje enzym oxysterol- $7\alpha$ -hydroxyláza (CYP7B1). K dokončení modifikace steroidní struktury dochází pomocí stejných enzymů jako u cesty klasické. Alternativní cesta je dominantní u kojenců a produkuje hlavně kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA), zatímco klasická cesta je významnější až později v životě [38; 37]. V případě onemocnění jater se alternativní dráha syntézy žlučových kyselin stává hlavní biosyntetickou cestou pro jejich tvorbu [30].

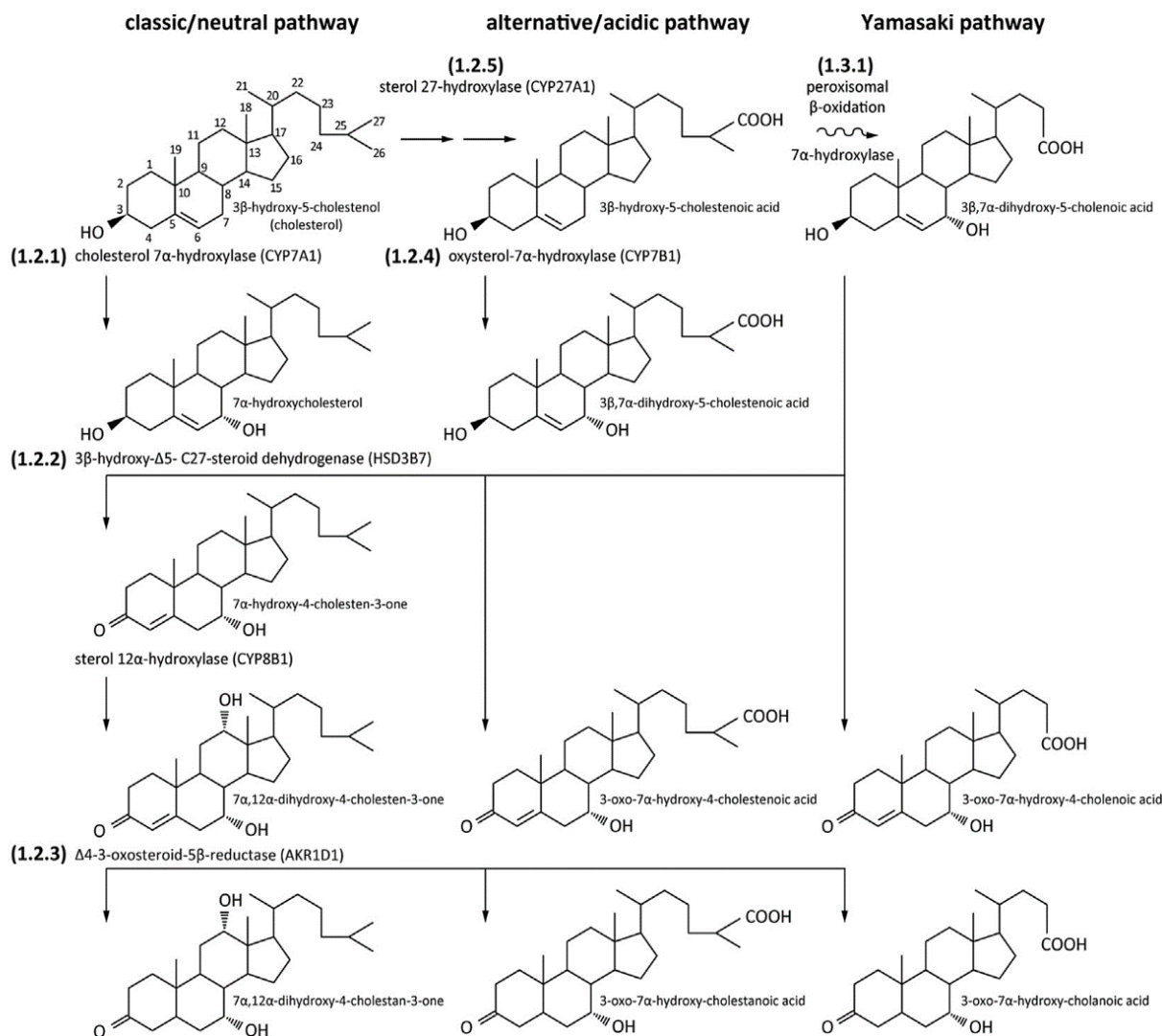
### **2.5.3 Yamasaki cesta syntézy žlučových kyselin**

U této dráhy syntézy žlučových kyselin se první kroky shodují s kyselou cestou. Nejdříve dochází k oxidaci postranního řetězce za vzniku C<sub>27</sub>-karboxylové kyseliny a následně ke zkrácení o tři uhlíky pomocí peroxisomální  $\beta$ -oxidace. Předpokládá se, že u lidí před nebo po peroxisomální  $\beta$ -oxidaci probíhá 7 $\alpha$ -hydroxylace, kterou vzniká 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -dihydroxy-5-cholelová kyselina. Tyto reakce mají za následek vznik kyseliny chenodeoxycholové (CDCA) a pravděpodobně je to hlavní produkt Yamasaki cesty. Dosud není zcela jasné, jak velký podíl na syntéze žlučových kyselin má Yamasaki cesta. Vzhledem k přítomnosti monohydroxidů žlučových kyselin ve žluči plodu, plodové vodě a vysoké hladině těchto žlučových kyselin v meconiu se předpokládá, že je tato cesta důležitá během vývoje [37].

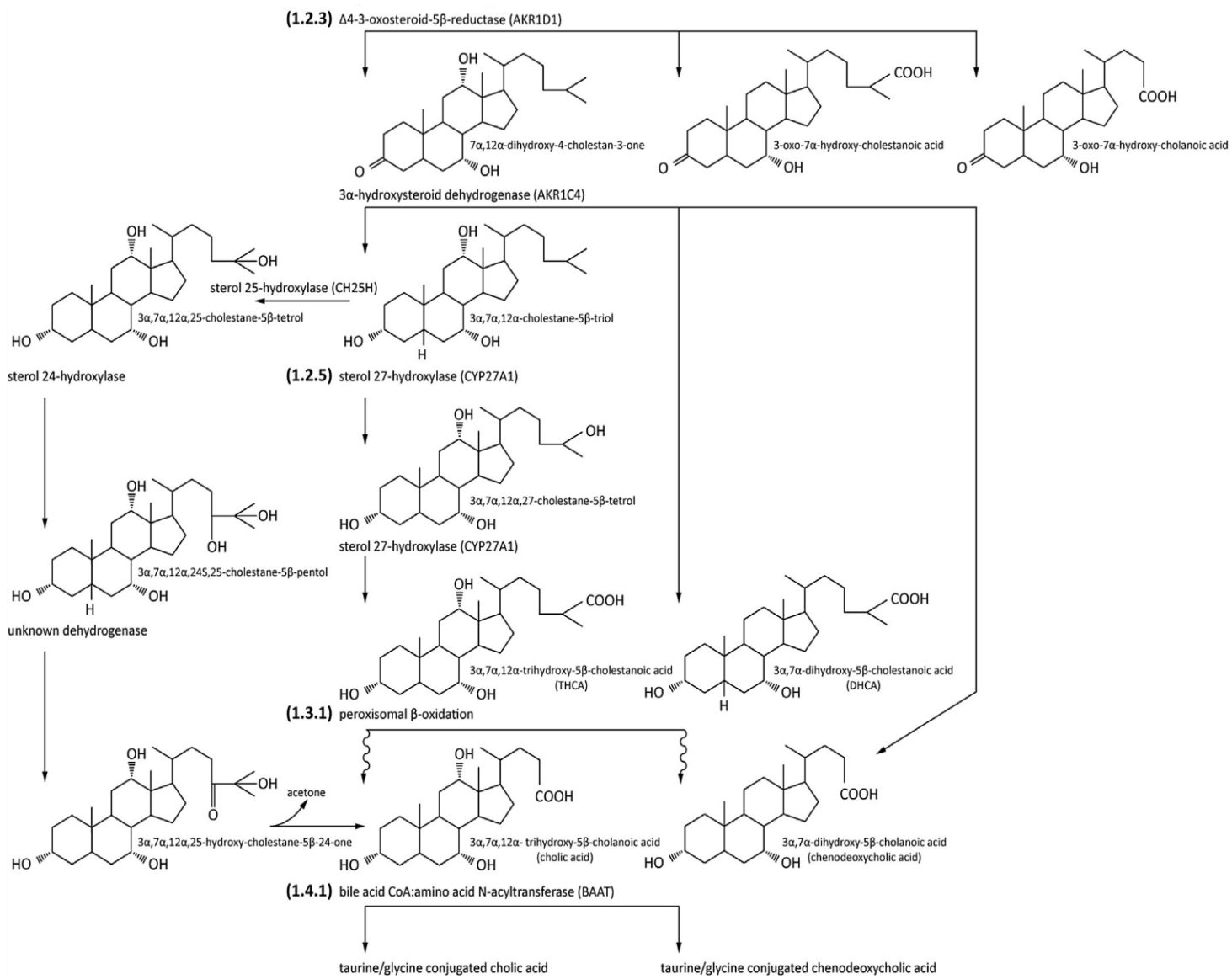
### **2.5.4 25-hydroxylační cesta syntézy žlučových kyselin**

Tato cesta syntézy žlučových kyselin je další způsob, jak získat žlučové kyseliny bez nutnosti 27-hydroxylace a následné peroxisomální  $\beta$ -oxidace. Modifikace steroidní struktury probíhá stejně jako u klasické dráhy. Po ní dochází pomocí mikrosomální sterol 25-hydroxylázy (CH25H) ke vzniku 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ , 25-cholestan-5 $\beta$ -tetrolu. Ten je znovu hydroxylován v poloze C<sub>24</sub>, a poté dojde k dehydrogenaci na 24-oxo-terol. Posledním krokem je štěpení, při kterém vzniká kyselina cholová (CA) a aceton [37].

25-hydroxylation pathway



Obrázek 7: Syntéza žlučových kyselin; převzato a upraveno z: [37].



**Obrázek 8:** Syntéza žlučových kyselin; převzato a upraveno z: [37].

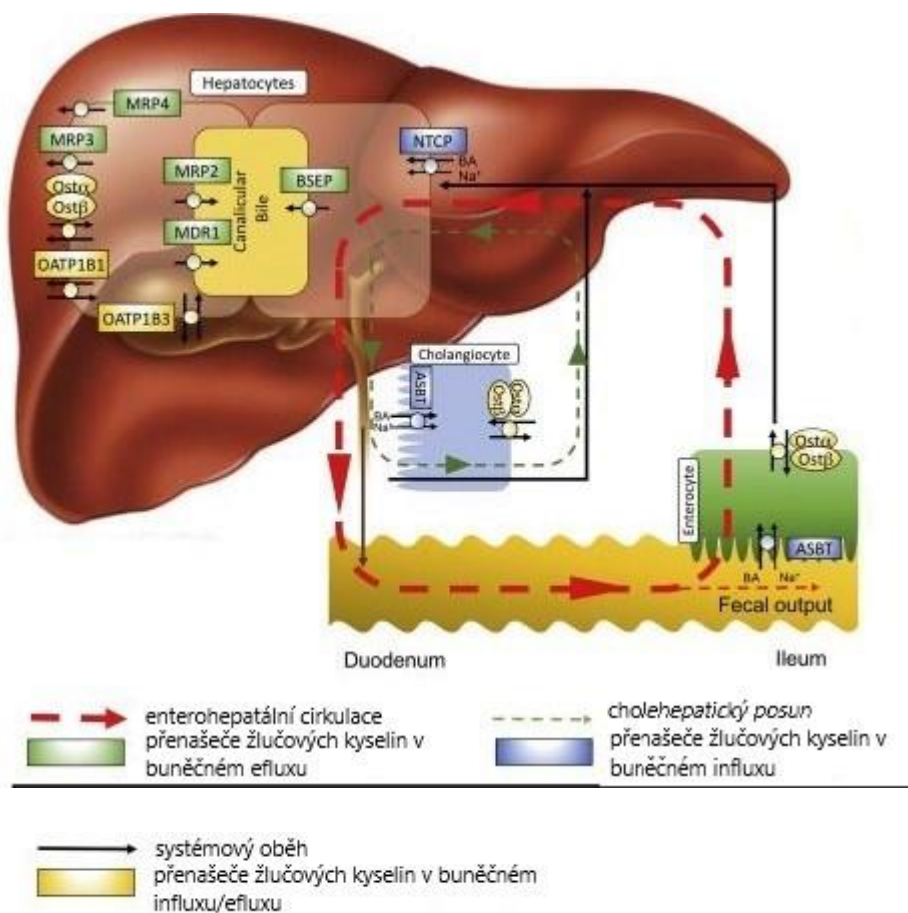
## **3 FUNKCE CHOLESTEROLU A ŽLUČOVÝCH KYSELIN PŘI METABOLICKÝCH POCHODECH**

### **3.1 Enterohepatální oběh**

Kyseliny cholová (CA) a chenodeoxycholová (CDCA) jsou syntetizovány v játrech. Po jejich produkci dochází pomocí jaterních buněk ke konjugaci žlučových kyselin s glycinem nebo taurinem. Tím vznikají odpovídající aminové konjugáty, které jsou označovány jako soli žlučových kyselin. Tuto reakci katalyzuje N-acyltransferáza (BAAT), která je vysoce účinná a zajišťuje konjugaci více než 98 % žlučových kyselin vylučovaných játry [32]. BAAT je enzym, který se nachází v peroxisomech a v nepatrném množství také v cytosolu. V peroxisomech se podílí na konjugaci nově vytvořených primárních žlučových kyselin [30].

Poměr, ve kterém se vytváří taurinové a glycinové konjugáty, závisí na dostupnosti taurinu, protože BAAT má pro něj větší afinitu. Konjugace snižuje toxicitu žlučových kyselin, čímž je zabráněno pasivní reabsorpci z enterohepatálního oběhu. Žlučové soli, fosfolipidy a ostatní žlučové složky jsou po konjugaci transportovány pomocí žlučových kanálků do žlučníku, kde je žluč skladována [32; 33].

Po každém jídle dochází ke kontrakci žlučníku, kterou vyvolává peptidový hormon cholecystokin, díky kterému se vyloučí žlučové soli do dvanáctníku. Zde soli žlučových kyselin napomáhají při trávení lipidů a vitamínů rozpustných v tucích. Část žlučových solí je modifikována pomocí střevních bakterií za vzniku sekundárních žlučových kyselin a volných primárních žlučových kyselin. Primární i sekundární žlučové kyseliny se reabsorbují v terminálním ileu, a poté jsou transportovány zpět do jater pomocí portální žíly. Jaterní buňky přijímají žlučové kyseliny a ty jsou znovu připravené na vyloučení. Tento proces se označuje jako enterohepatální oběh (viz obr. 9). Enterohepatální cyklus probíhá 4 až 12krát denně, zajišťuje maximální trávení lipidů a zabraňuje vstupu žlučových kyselin do buněk tenkého střeva. Tím se minimalizuje ztráta žlučových kyselin [37; 33].



**Obrázek 9:** Enterohepatální oběh: BSEP (žlučová exportní pumpa), MRP2 a MDR1 (kanalikulární transportéry žlučových kyselin), NTCP, MRP3, MRP4, OST $\alpha$  a OST $\beta$  (transportéry přenašející žlučové kyseliny přes membránu hepatocytů), OATP1B1 a OATP1B3 (membránové glykoproteiny transportující žlučové kyseliny); převzato a upraveno z: [39].

Ne všechny žlučové kyseliny však mohou být transportovány zpět do jater. Zhruba 5 % žlučových kyselin je vylučováno stolicí. Denní ztráta žlučových kyselin je pak kompenzována de novo syntézou z cholesterolu v játrech. Tím je zaručena homeostáza žlučových kyselin [35; 33].

### 3.2 Reverzní transport cholesterolu (RCT)

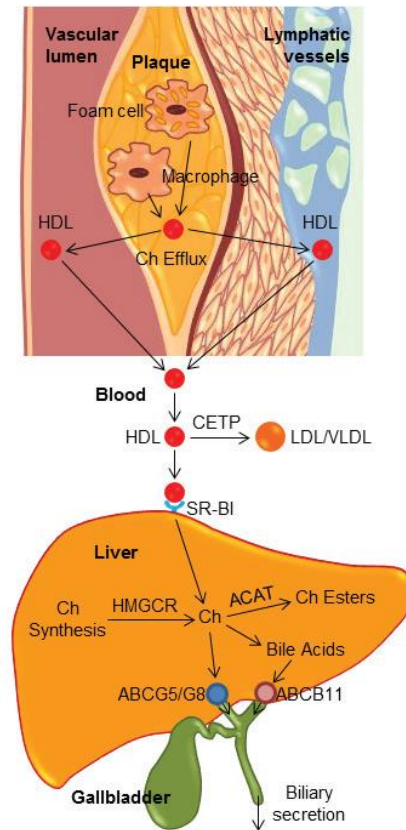
Reverzní transport cholesterolu (viz. obr. 10) je proces, při kterém dochází k odstranění přebytečného cholesterolu nahromaděného v periferních tkáních pomocí HDL částic. Tyto částice transportují cholesterol do jater, odkud je vylučován žlučí [40]. Cholesterol může být vylučován ve dvou formách: ve formě neutrálních sterolů (cholesterol a jeho metabolity) a ve formě žlučových kyselin [41].

Částice HDL jsou nejmenší lipoproteinové částice a obsahují nejvyšší podíl apolipoproteinů v porovnání s ostatními lipoproteiny. V extracelulárním prostoru vzniká HDL spojením apoproteinu Apo AI s fosfolipidy, který váže volný neesterifikovaný cholesterol. Tyto diskovité částice jsou vylučovány játry a střevem a cholesterol získávají z buněčných membrán a jiných lipoproteinů [17; 40]. Tyto tzv. „nascentní“ HDL částice jsou dobrým substrátem pro lecitin-cholesterol acyltransferázu (LCAT), která hraje důležitou roli při zrání HDL cholesterolu a její aktivita je pro správné fungování metabolismu HDL klíčová [42; 17]. Po vazbě na HDL, které obsahují tři až čtyři apo AI na částici, dojde k enzymem katalyzované esterifikaci volného cholesterolu přenesením mastné kyseliny z lecitinu na molekulu cholesterolu. Díky té se cholesterol stává hydrofobním a je odváděn od skupin polárních konců fosfolipidů do prostoru zabraného acylovými řetězci mastných kyselin fosfolipidů. Díky této akumulaci cholesterol esteru vzniká lipidové jádro, které transformuje HDL částici z tvaru disku na tvar koule (HDL-3) [17].

Prostřednictvím proteinu pro přenos cholesterol esteru (CETP) a proteinu pro přenos fosfolipidů (PLTP) získává částice HDL-3 triacylglyceroly a více cholesterol esteru. Poté dochází k výměně cholesterol esteru za triacylglyceroly prostřednictvím CETP mezi HDL a lipoproteiny s vyšším obsahem triacylglycerolů. PLTP získává fosfolipidy z povrchu lipoproteinů, které obsahují apo B. Tento proteinový transfer je reverzibilní proces. Poté dochází k přenosu lipidů ve směru již existujících koncentračních gradientů, pomocí kterých se výsledná zralá částice HDL, označovaná jako HDL-2, transportuje do jater, kde je vystavena působení jaterní lipázy (HL). Interakce HDL-2 částice s jaterní lipázou napomáhá hydrolýze triacylglycerolů. Následně dochází k pasivnímu přenosu fosfolipidů, selektivnímu přenosu cholesterol esteru do jater a ztrátě Apo AI, který je znovu k dispozici pro syntézu nových HDL částic. Po interakci s jaterní lipázou se částice HDL-2 podobá počáteční sférické částici HDL-3 [17].

Cholesterol je z hepatocytů vylučován jednak v lipoproteinových částicích, a potom také do žluči buď jako volný cholesterol nebo po konverzi ve formě žlučových kyselin. Biliární exkrece je poslední krok RCT k odstranění cholesterolu a fosfolipidů z těla [41; 42].





**Obrázek 10:** Reverzní transport cholesterolu: ACAT (acyl-CoA-cholesterol acyltransferáza), CETP (protein pro přenos cholesterol esteru), Ch (cholesterol), HMGCR (HMG-CoA reductáza), SR-BI (HDL receptor), ABCG5/G8 (transportéry regulující exkreci jaterního cholesterolu), ABCB11 (transportér regulující jaterní exkreci žlučových kyselin); převzato z: [40].

### 3.2.1 Cholesterol ester transportní protein (CETP)

CETP je hydrofobní glykoprotein, který je důležitý pro metabolismus lipoproteinů a cholesterolu. Podporuje rovnováhu a redistribuci hydrofobních lipidů mezi HDL a lipoproteiny obsahujícími Apo B v lipoproteinovém jádru tím, že usnadňuje přenos cholesterol esteru z HDL na lipoproteiny obsahující Apo B [42].

Byly navrženy dva mechanismy působení CETP. V prvním mechanismu CETP slouží jako rozpustný nosič cholesterol esteru a triacylglycerolu, což zvyšuje rychlost jeho difúze po koncentračním gradientu mezi různými lipoproteiny. V tomto modelu musí CETP-lipidový komplex existovat jako stabilní meziprodukt této přenosové reakce. Ve druhém mechanismu CETP tvoří část komplexu mezi molekulami donoru (HDL) a akceptoru (LDL). CETP působí jako molekulární „pojídlo“, čímž se rozšíří spojení HDL a LDL částice, a tím se usnadní přenos

lipidů mezi povrchy daných lipoproteinových částic. Vzhledem k nejistotě ohledně skutečných koncentrací esterů cholesterolu a triacylglycerolů vázaných na lipoproteinech je obtížné tyto dva mechanismy kineticky rozlišit [17].

### **3.2.2 Niemann-Pick C2 (NPC2)**

NPC2 je protein vázající cholesterol, který se podílí na intracelulárním přenosu cholesterolu v hepatocytech, ale může být také vylučován do žluči. Nedávné studie u myší se změnou jaterní exprese Niemann-Pick C2 (NPC2) odhalily, že NPC2 může pozitivně regulovat biliární sekreci cholesterolu, což bylo podpořeno zjištěním vzájemného vztahu mezi hladinami NPC2 a cholesterolu [41].

## **3.3 Homeostáza buněčného cholesterolu**

Buňky udržují obsah sterolů v různých membránách na odlišných úrovních i přesto, že mezi nimi dochází k rozsáhlému transportu. Buňky také mohou zvyšovat hladinu cholesterolu v závislosti na aktuální potřebě prostřednictvím biosyntézy cholesterolu, hydrolýzy cholesterol esterů nebo endocytózou prostřednictvím LDL receptoru [43; 44].

Většina buněčného cholesterolu se nachází v plazmatické membráně, zatímco většina homeostatických aparátů pro regulaci cholesterolu se nachází v endoplazmatickém retikulu. Hlavní transkripční faktory v homeostáze cholesterolu jsou proteiny vázající sterolový regulační prvek (SREBP) a jejich přidružené regulační proteiny. Mezi ně patří SCAP, protein aktivující štěpení SREBP, který v případě nízké hladiny cholesterolu vytváří komplex s SREBP v membráně endoplazmatického retikula a tento komplex se následně transportuje do Golgiho aparátu pro proteolytickou aktivaci. Dalším přidruženým regulačním proteinem je INSIG, inzulinem indukovaný gen, který udržuje SCAP v endoplazmatickém retikulu v případě, že hladiny buněčného cholesterolu jsou dostatečné nebo jsou v nadbytku. Posledními známými přidruženými proteiny jsou ERLIN-1 a ERLIN-2, které interagují s INSIGEM, aby pomáhaly udržet komplex SCAP-SREBP v endoplazmatickém retikulu v případě vysoké hladiny cholesterolu [45]. Komplexy INSIG-SCAP-SREBP jsou jedním z nejdůležitějších mechanismů kontroly hladin sterolu [43].

Endoplazmatické retikulum je místem syntézy cholesterolu, proto je zde přítomná i většina enzymů, které se na této syntéze podílejí, včetně důležitého enzymu HMGR regulující rychlost syntézy cholesterolu. Dalším důležitým enzymem, který se nachází v endoplazmatickém retikulu je acyl-CoA-cholesterol acyltransferáza (ACAT), která esterifikuje nadbytečný cholesterol, který je následně skladován ve formě lipidových kapének [43; 45].

## 4 ONEMOCNĚNÍ SPOJENÁ SE ŠPATNOU FUNKCÍ CHOLESTEROLU A ŽLUČOVÝCH KYSELIN

### 4.1 Nedostatek primárních žlučových kyselin

K nedostatku primárních žlučových kyselin dochází zejména v případě poruch v biosyntéze žlučových kyselin. Typickým projevem nedostatku žlučových kyselin je snížená absorpce živin v gastrointestinálním traktu, která má za následek vylučování velkého množství lipidů stolicí. Dalším typickým projevem je nedostatek vitaminů rozpustných v tucích. Nedostatek vitamínu K způsobuje koagulační defekty. Projevem nedostatku vitamínu D může být například svalová slabost a zvýšené riziko zlomenin. V případě dlouhodobého nedostatku vitamínu D u dětí může dojít až k retardaci růstu [37].

Pokud neprobíhá syntéza žlučových kyselin, dochází k narušení toku žluči nebo k jeho úplnému přerušení. V oběhu pak dochází k hromadění metabolitů, které jsou běžně vylučovány žlučí. Kvůli nedostatku žlučových kyselin dochází ke stimulaci transkripce  $7\alpha$ -hydroxylázy a  $12\alpha$ -hydroxylázy, které stimulují biosyntézu žlučových kyselin. Tento proces vede k hromadění meziproduktů syntézy žlučových kyselin v plazmě nebo v moči. Meziprodukty mohou být také roznášeny do extrahepatálních tkání, kde může docházet k jejich další metabolizaci a k dalším problémům tím způsobených. Typickým příkladem je hromadění cholestanolu ve žluči a mozku při onemocnění zvaném cerebrotendinózní xantomatóza [37].

#### 4.1.1 Cerebrotendinózní xantomatóza

Cerebrotendinózní xantomatóza (CTX) je vzácné, avšak dobře popsané autozomálně recesivní onemocnění. Je způsobené velmi zvýšenou koncentrací cholestanolu v plazmě a v postižených orgánech. Toto onemocnění je charakterizováno tvorbou xantomatózních lézí v mozku, plicích, očních čočkách a šlachách. K jeho typickým klinickým projevům patří šedý zákal, který se může objevit již před šestým rokem dítěte. Bývá však pozorován i u dospělých s potvrzenou CTX. Dalším projevem nemoci je výskyt xantomů na různých místech. Typickým místem výskytu xantomových lézí je Achillova šlacha. Xantomy se však mohou objevit i na prstech nebo tricepsu. Mezi další klinické projevy patří ateroskleróza, chronický průjem v dětství a četné neurologické dysfunkce, jako například paréza, demence, snížená inteligence, epilepsie a psychiatrické poruchy. Tyto příznaky se většinou začínají objevovat v druhém desetiletí života [46; 47]. Nedostatek klinických příznaků v raném věku ztěžuje včasnou diagnózu CTX, která je klíčová k zabránění progresi neurologických symptomů. K diagnostice CTX se používají specifické biochemické testy, například měření cholestanolu v plazmě a žluči [47].

Je pravděpodobné, že CTX je spojená s mutacemi v genu sterol 27-hydroxylázy. To vede k narušení oxidace postranního řetězce cholesterolu při biosyntéze žlučových kyselin, což má za následek sníženou tvorbu kyseliny cholové a kyseliny chenodeoxycholové (CDCA). Léčba je založena na substituční terapii CDCA, která inhibuje alternativní syntézu žlučových kyselin, snižuje koncentraci cholestanolu a tím zpomaluje progresy onemocnění [47].

## **4.2 Nealkoholická tuková jaterní choroba (NAFLD)**

Nealkoholická tuková jaterní choroba (NAFLD) zahrnuje nemoci od steatózy po nealkoholickou steatohepatitidu (NASH). Ta je charakterizovaná přítomností balónové degenerace hepatocytů, nekrotickými záněty a různými stupni fibrózy, které mohou vést k jaterní cirhóze a dále až k rakovině jater [48]. NAFLD vzniká nadměrnou akumulací tuku v játrech (definováno jako více než 5 %) [49; 50].

V současné době je NAFLD jednou z hlavních příčin chronických onemocnění jater, s celosvětovou prevalencí 25 – 30 %, přičemž toto číslo neustále roste [51]. Nicméně je možné, že prevalence je pravděpodobně o něco vyšší, protože pro diagnostiku NAFLD je zapotřebí provést biopsii tkáně. Bylo zjištěno, že NAFLD se asi u 30 % pacientů dále rozvíjí na NASH. Ale vzhledem ke zvyšující se prevalenci NAFLD bude docházet i ke zvýšení prevalence NASH. Hlavní rizikový faktor pro vznik NAFLD a NASH je souhra více metabolických stavů, jako je inzulinová rezistence, hyperglykémie, dyslipidémie, hypertenze a obezita. Zároveň představují riziko vzniku kardiovaskulárních nemocí [49; 50].

Dosud není dobře znám mechanismus, kterým dochází k rozvoji NASH z NAFLD, ale předpokládá se, že zahrnuje více faktorů ovlivňujících játra, gastrointestinální trakt a tukovou tkáň. Je pravděpodobné, že vývoj NAFLD je závislý na opakovaném poškození jater prostřednictvím různých cest. Jako příklad můžeme uvést steatózu, která může začít inzulinovou rezistencí a obezitou způsobující vyšší hladiny lipidů v hepatocytech. To dále vede ke zvýšené náchylnosti k oxidačnímu stresu a buněčnému poškození. Tuková tkáň uvolňuje cytokiny, čímž je také zvýšené riziko zánětu a jaterní fibrózy [49; 48].

Kvůli svým mnoha vlastnostem jsou žlučové kyseliny a jimi ovlivňované regulační dráhy předmětem výzkumu léčby a prevence NAFLD a NASH. Dnes se díky nízké dostupnosti léčiv proti těmto nemocem snaha omezit jejich výskyt zaměřuje na snížení tělesné hmotnosti. Již bylo vyvinuto několik léků jejichž úspěšnost bohužel nebyla dostatečně prokázána. Z tohoto důvodu je třeba provést další výzkum pro vyvinutí spolehlivějších terapií [49; 50; 51].

Další terapeutickou možností léčby steatózy a NASH je bariatrická chirurgie, jejíž podstatou je obnovení energetické bilance a zlepšení metabolické homeostázy. Meta-analýza vícenásobných studií bariatrické chirurgie ukázala, že zlepšení projevující se u 92 % pacientů bylo zároveň doprovázeno zlepšením případné steatohepatitidy u 81 % pacientů a jaterní fibrózy u 66 % pacientů [50].

### **4.3 Familiární hypercholesterolemie**

Hypercholesterolemie je dědičné onemocnění, které způsobuje hromadění lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) v plazmě v důsledku sníženého příjmu LDL částic játry. Vede k předčasnému vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Nejčastější dědičnou poruchou je autozomálně dominantní familiární hypercholesterolemie (FH), která je charakterizována mutacemi buď v LDL receptoru (LDL-R), Apo B nebo v proproteinu konvertázy subtilin/kexin typ 9 (PCSK9). Toto onemocnění se projevuje u homozygotů (mutace v každé alele) i u heterozygotů (mutace pouze v jedné alele) [52; 53].

Mutace v LDL-R jsou zodpovědné za přibližně 85 až 90 % případů klinické hypercholesterolemie. Mezi běžné mutace v genu LDL-R patří delece, inserce a další změny, které ovlivňují všechny hlavní kroky ve funkci LDL-R. Méně častá je mutace v Apo B, která vede ke špatné interakci s LDL-R. Mutace v Apo B je fenotypově nerozeznatelná od klasické FH způsobené mutací v LDL-R, s výjimkou méně výrazného zvýšení LDL cholesterolu. Další méně častou mutací je mutace v PCSK9, která souvisí s LDL-R a zajišťuje jeho lysozomální degradaci. Tato mutace spočívá v zesílení funkce PCSK9, která vede ke zvýšeným hladinám LDL cholesterolu v plazmě [52].

FH je klinicky diagnostikována na základě rodinné anamnézy předčasné ischemické srdeční choroby, zvýšené hladiny LDL cholesterolu v plazmě a přítomnosti xantomů šlach a rohovkového arkuusu [52].

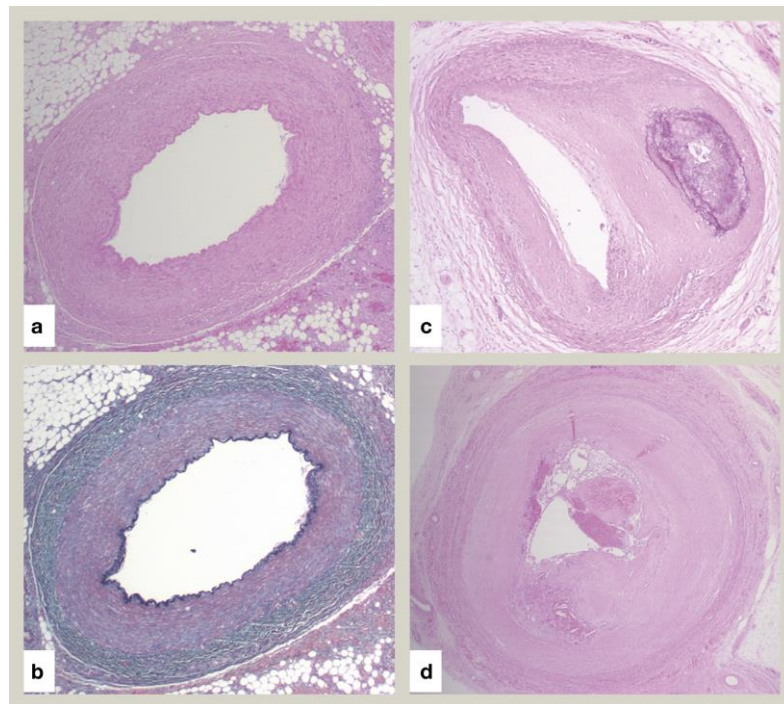
Neléčení pacienti s FH jsou vystaveni vysokému riziku předčasného kardiovaskulárního onemocnění a smrti. Toto riziko se odhaduje přibližně 20krát vyšší než u léčených pacientů. U neléčených pacientů se kardiovaskulární onemocnění vyskytuje přibližně u 50 % mužů před dosažením věku 50 let a u 30 % žen před dosažením věku 60 let [53; 52].

Současná léčba se zaměřuje na podávání statinů a léků snižujících hladinu lipidů. Současně se zahájením terapie by měli být pacienti poučeni o změnách životního stylu zahrnující pravidelné cvičení, vyhýbání se kouření a přijímání stravy, která má nízký obsah trans a nasycených tuků, cholesterolu a rafinovaných cukrů [52].

## 4.4 Ateroskleróza

Ateroskleróza je komplexní onemocnění, které je charakterizováno akumulací aterogenních lipoproteinů v arteriální stěně vedoucí k tvorbě aterosklerotického plaku [54]. Ateroskleróza je patologický základ pro řadu vaskulárních onemocnění, včetně ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu, mrtvice a onemocnění periferních tepen [55; 56].

Aterosklerotické plaky jsou popsány z hlediska jejich složitosti a stability (viz obr. 11). Složitost se odráží v míře infiltrace zánětlivých buněk, rozsahem nekrózy, ukládání lipidů, kalcifikace a krvácení. Komplexní plaky jsou nestabilní a náchylné k prasknutí, což je proces charakterizovaný strukturální mezerou nebo trhlinou ve vláknitém víčku. Jakmile dojde k prasknutí plaku, vzniklé protrombogenní ateromatózní jádro vytváří akutní trombus. Klinickým projevem trombózy může být infarkt myokardu nebo náhlá srdeční smrt [56; 57].



**Obrázek 11:** Průřez arterií: a) normální koronární tepny, (b) skvrna (černá) prokazující vnitřní pružnou laminu, (c) koronární tepna se stabilním kalcifikovaným aterosklerotickým plakem a hustým vláknitým víčkem, (d) nestabilní roztržený aterosklerotický povlak s akutním a chronickým vznikem trombu a významnou infiltrací lipidů; převzato z: [56].

Mnoho let se předpokládalo, že ateroskleróza je pasivní proces a nevyhnutelný aspekt stárnutí. Nyní je známo, že se jedná o komplexní souhrn lipidového metabolismu, aktivních buněčných interakcí a zánětů. Významným rizikovým faktorem vzniku aterosklerózy je abnormální metabolismus lipidů a hyperlipidemie. Je známo, že vysoké hladiny LDL jsou aterogenní,

zatímco HDL mají zřejmě ateroprotektivní účinek. To je způsobeno funkcí HDL v reverzním transportu cholesterolu [56].

V roce 2012 byla ateroskleróza jednou z hlavních příčin smrti ve většině světa. Mezi související stavy patří, hypertenze, hyperglykémie, diabetes mellitus a hypercholesterolemie. Přijetí zdravého životního stylu a snížení cholesterolu je klíčové opatření k prevenci vzniku aterosklerózy [54; 57].

## **5 METODY STANOVENÍ CHOLESTEROLU A ŽLUČOVÝCH KYSELIN**

### **5.1 Metody stanovení cholesterolu**

V biochemii se pro stanovení cholesterolu využívají fluorimetrické a kolorimetrické enzymatické testy. Abnormální hladiny cholesterolu jsou spojeny se vznikem kardiovaskulárních onemocnění, proto je stanovení hladiny cholesterolu prováděno v rámci rutinních krevních testů, při kterých je stanovován celkový cholesterol společně s HDL a LDL cholesterolem a triacylglyceroly [5].

Zhruba 20 až 25 % cholesterolu v našem těle pochází z potravin živočišného původu, proto je také důležité znát koncentraci cholesterolu v našem dietním příjmu. Vyhodnocení obsahu cholesterolu v potravinách se provádí také pomocí enzymatických testů. Dále pomocí klasických chemických metod jako je například modifikovaná Abell-Kendallova metoda nebo metodami instrumentálními jako je plynová a kapalinová chromatografie [5].

#### **5.1.1 Modifikovaná Abell-Kendallova metoda**

Modifikovaná Abell-Kendallova metoda je standardní referenční metoda stanovení celkového cholesterolu, která je schválená pro klinické použití Národním institutem standardů a technologií (NIST, USA). Jde o vícečetnou klasickou chemickou metodu, která zahrnuje Liebermannovu-Burchardovu reakci na vývoj barev [5].

Tato metoda zahrnuje zmýdelnění esteru cholesterolu pomocí alkoholického hydroxidu draselného, extrakci hydrolyzovaného cholesterolu hexanem, následné odpaření rozpouštědla a na závěr vývoj barvy anhydridem kyseliny octové a koncentrovanou kyselinou sírovou. Pro měření za účelem kvantifikace cholesterolu se běžně používá UV spektrofotometrie ( $\lambda = 410 \text{ nm}$ ). Modifikovaná Abell-Kendallova metoda je sice považována za standardní referenční metodu, ale v současné době se pro rutinní testy nepoužívá, protože je časově náročná a vyžaduje použití korozivních činidel [5].

#### **5.1.2 Enzymatické testy**

Tyto testy jsou založené na reakci vázané na enzym pro stanovení hladiny celkového cholesterolu. Tyto enzymatické testy se běžně používají od roku 1974 a v současnosti jsou hojně využívány pro testovací soupravy a automatické analyzátoři [58; 59].

Nejdříve dochází k hydrolýze esterifikovaného cholesterolu na volný cholesterol pomocí cholesterol esterázy. Volný cholesterol je následně oxidován cholesterol oxidázou na cholest-



4-en-3-on. Jako vedlejší produkt vzniká peroxid vodíku, který je snadno detekován pomocí citlivých kolorimetrických nebo fluorometrických sond. Enzymatické metody pro stanovení cholesterolu jsou tedy založené na měření peroxidu vodíku sondou, která je na něj citlivá. Úspěšnost enzymatické metody závisí na vlastnostech použité sondy, která může být buď chromogenní nebo fluorogenní. Obecně se více využívají sondy fluorogenní, protože mají větší citlivost. Mnoho laboratoří používá pro rutinní analýzu komerční soupravy pro kvantitativní stanovení cholesterolu a automatické analyzátory založené na enzymatických testech [60; 58; 59].

Jako příklad fluorometrického stanovení si můžeme uvést test se substrátem Amplex Red. Reakční směs se vytvoří smícháním vzorku cholesterolu, cholesterol esterázy, cholesterol oxidázy, peroxidázy a substrátu Amplex Red. Kontrolní vzorek se vytvoří vynecháním jednoho z reaktantů ze směsy. Vytvořená reakční směs se inkubuje 30 minut při 37 °C. Poté je měřena intenzita fluorescence pomocí fluorescenční mikrodestičkové čtečky s filtrační sadou pro excitaci a emisi při 560 a 590 nm. Za optimálních podmínek může Amplex Red detekovat 2 až 5 pmol peroxidu vodíku na jamku v 96-jamkovém fluorescenčním mikrodestičkovém testu. Kromě vysoké citlivosti vykazuje test se sondou Amplex Red dobrou linearitu v rozsahu koncentrace cholesterolu od 10 nM do 10 μM [60].

Dalším fluorometrickým stanovením může být test na bázi aminoantipyridinu/fenolu. Reakční podmínky jsou stejné jako u reakce s Amplex Red, který je v této metodě nahrazen směsí aminoantipyridinu a fenolu. Rozsah reakce je detekován měřením zvýšení absorbance při 500 nm pomocí ELISA destičkové čtečky. Detekční limit tohoto testu je zhruba 5 μM, což je mnohem méně než u sondy Amplex Red a vykazuje špatnou linearitu a vysokou interferenci pozadí [60].

### **5.1.3 Plynová (GC) a kapalinová chromatografie (LC)**

Plynová a kapalinová chromatografie se používají pro kvantifikaci cholesterolu v potravinách. V analytické chemii jsou považovány za citlivější, spolehlivější a přesnější než jiné metody díky jejich schopnosti oddělit a kvantifikovat cholesterol z jiných podobných látek [5; 61].

Nejpoužívanější analytickou technikou pro separaci cholesterolu a dalších sterolů byla plynová chromatografie (GC). GC kolony jsou velmi účinné pro separaci cholesterolu, ale někdy trpí překrytím cholesterolu s jinými steroly. Kvůli této nevýhodě je výhodnější použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), zejména HPLC na reverzní fázi. Hlavní výhodou HPLC je její provádění při nízké teplotě, čímž se zabraňuje oxidaci cholesterolu. Nejběžnějším detektorem používaným v HPLC pro detekci cholesterolu je detektor s diodovým

polem. Pro tyto analytické techniky je důležitá příprava vzorku, jako je zmýdelnění a extrakce vzorku. Nejběžněji používaným rozpouštědlem je hydroxid draselný, který se používá k separaci cholesterolu od mastných kyselin, přičemž se zároveň zabrání interferenci triacylglycerolů [61; 5].

## **5.2 Metody stanovení žlučových kyselin**

Vzhledem k významným funkcím žlučových kyselin byly popsány různé analytické metody pro stanovení konjugovaných a nekonjugovaných žlučových kyselin [62].

Analýza žlučových kyselin byla dříve prováděna iontovou chromatografií následovanou plynovou chromatografií (GC) a hmotností spektrometrií (MS) s ionizací elektrosprejem. Velkou nevýhodou těchto metod je potřeba štěpení konjugovaných žlučových kyselin a jejich následná derivatizace za účelem zajištění potřebné těkavosti. Později ionizace nárazem rychlými atomy (FAB – ionizační technika používaná v hmotnostní spektrometrii) umožnila přímo analyzovat nativní žlučové kyseliny a soli s minimální přípravou vzorku. Následně došlo k nahrazení FAB-ionizace ionizací elektrosprejovou (ESI) V současné době se ve většině laboratoří používá ESI-MS (hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem), které předchází separace pomocí kapalinové chromatografie (LC). MS umožňuje detekci a kvantifikaci více než 20 různých žlučových kyselin a jejich meziproductů [37]. Pokud není k dispozici LC-MS, je ke stanovení žlučových kyselin alternativou separace pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí, která má také vysokou účinnost, citlivost a specifitu [62].

## 6 ZÁVĚR

Cholesterol je nezbytný pro správné fungování lidského organismu, pro fungování metabolismu lipidů a udržování jeho homeostázy. Je výchozí látkou pro biosyntézu žlučových kyselin, steroidních hormonů a vitamínu D. Patří mezi základní složku buněčných membrán, kde tvoří jednu z hlavních složek. Do organismu se dostává buď vstřebáváním ze stravy přes trávicí trakt nebo je syntetizován z acetyl-CoA. Krevním řečištěm je cholesterol přenášen pomocí různých typů lipoproteinových částic.

Zvýšená hladina cholesterolu v plazmě může souviset se vznikem různých onemocnění. Nejčastější je vznik aterosklerózy, při které dochází k usazování aterosklerotického plaku ve stěnách cév, a řady kardiovaskulárních onemocnění, jako je infarkt myokardu či mrtvice, pro které je ateroskleróza patologický základ. Se zvýšenou hladinou cholesterolu v krvi je spojená i hypercholesterolemie, která je ovšem dědičná.

Žlučové kyseliny jsou nezbytné pro exkreci cholesterolu a fosfolipidů z těla. Jsou důležité pro hydrolýzu lipidů při trávení pomocí pankreatických enzymů. Žlučové kyseliny jsou syntetizovány v játrech z cholesterolu. Po jejich syntéze jsou transportovány přes membránu hepatocytů do žluči a uloženy v žlučníku. Po každém jídle dochází k jejich uvolnění do střevního traktu, kde se účinně reabsorbují a vracejí zpět do jater pomocí portální žíly, aby mohly být znovu vyloučeny do žluči. Tento proces se označuje jako enterohepatální cyklus. Schopnost žlučových kyselin působit jako signální molekuly je důležitá pro regulaci enzymů, které zprostředkovávají transport léků a zajišťují správné fungování metabolismu.

Nedostatek nebo špatná funkce žlučových kyselin se může projevit vznikem onemocnění, jako jsou nealkoholická tuková jaterní choroba (NAFLD) a nealkoholická steatohepatitida (NASH), které mohou vést k cirhóze, a dokonce i k rakovině jater.

Pro stanovení hladin cholesterolu v biochemii se používají fluorometrické a kolorimetrické enzymatické testy, které jsou citlivější a méně časově náročnější než metody neenzymatické. Stanovení žlučových kyselin se v dnešní době provádí analytickými instrumentálními metodami jako je plynová a kapalinová chromatografie.

## Bibliografie

- [1] MCNAMARA J., WARNICK G., COOPER G. A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2006, **369**(2), 158-167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.041>. ISSN 0009-8981.
- [2] ZETTERSTRÖM R. The 1964 Nobel Prize for the discovery of the biosynthesis of cholesterol. *Acta pædiatrica (Oslo)*. Scandinavian University Press, 2009, **98**(7), 1223-1227. DOI: [10.1111/j.1651-2227.2009.01282.x](https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01282.x). ISSN 0803-5253.
- [3] STEGLICH W., FUGMANN B., LANG-FUGMANN S. *Choline*. Thieme Medical Publishers Inc, b.r., s. 130. ISBN 978-3-13-117711-7.
- [4] Cholesterol. *Britannica ACADEMIC* [online]. Chicago: Encyclopædia Britannica, 2016 [cit. 2018-06-07]. Dostupné z: <https://academic.eb.com/levels/collegiate/article/cholesterol/82307>
- [5] LI L-H., DUTKIEWICZ E., HUANG Y-Ch., ZHOU H-B., HSU Ch-Ch. Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019, **27**(2), 375-386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.09.001>. ISSN 1021-9498.
- [6] ČEŠKA R. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. 1. vydání. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-725-4738-0.
- [7] MAYES P. Synthesa, transport a vylučování cholesterolu. MURRAY R., GRANNER D., MAYES P., RODWELL V. *Harperova Biochemie*. 4. vydání. Jinočany: H+H, 2002, s. 279-291. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.
- [8] DAINTITH J. *Dictionary of Chemistry (6th Edition)*. Oxford University Press, b.r., 123 s. ISBN 978-0-19-920463-2.
- [9] LANGE Y., STECK T. Active membrane cholesterol as a physiological effector. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2016, **199**, 74-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.02.003>. ISSN 0009-3084.

- [10] CLINIC, Experts, Experts NUTRITION a Experts COMPANY. *Encyclopedia of Foods - A Guide to Healthy Nutrition*. Elsevier, b.r., 64 s. ISBN 978-0-12-219803-8.
- [11] RÖHRL C., STANGL H. HDL endocytosis and resecretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2013, **1831**(11), 1626-1633. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.07.014>. ISSN 1388-1981.
- [12] HARISA G., ALANAZI F. Low density lipoprotein bionanoparticles: From cholesterol transport to delivery of anti-cancer drugs. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2014, **22**(6), 504-515. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.015>. ISSN 1319-0164.
- [13] WADHERA R., STEEN D., KHAN I., GIUGLIANO R., FOODY J. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *Journal of Clinical Lipidology*. 2016, **10**(3), 472-489. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.11.010>. ISSN 1933-2874.
- [14] WATERS D. D., GUYTON J. R., HERRINGTON D. M., MCGOWAN M. P., WENGER N. K., SHEAR Ch. Treating to New Targets (TNT) Study: does lowering low-density lipoprotein cholesterol levels below currently recommended guidelines yield incremental clinical benefit? *The American Journal of Cardiology*. 2004, **93**(2), 154-158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.09.031>. ISSN 0002-9149.
- [15] Lipoprotein structure. In: *Basicmedical Key* [online]. b.r. [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <https://basicmedicalkey.com/hormonal-regulation-of-energy-metabolism/>
- [16] Lipoprotein in cholesterol transport: Highlights and recent insights into its structural basis and. *Chinese Physics B*. 2018, **27**(2), 028702. ISSN 1674-1056.
- [17] WASAN K., CASSIDY S. Role of plasma lipoproteins in modifying the biological activity of hydrophobic drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, 1998, **87**(4), 411-424. DOI: 10.1021/js970407a. ISSN 0022-3549.
- [18] BRITES F., MARTIN M., GUILLAS I., KONTUSH A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clinical*. 2017, **8**, 66-77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2017.07.002>. ISSN 2214-6474.

- [19] Classification of lipoproteins. In: *Health, Fitness, and Happiness Blog*Health [online]. b.r. [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <https://treatingedonline.net/tag/high-density-lipoprotein/>
- [20] WILD D. 9.12.3.6.3 *Clinical Applications*. Elsevier, b.r., s. 823. ISBN 978-0-08-097037-0.
- [21] WILLIAMS Ch., BUTTRISS J. 3.3 *Genetic Influences on the Uptake and Absorption of Cholesterol*. Woodhead Publishing, b.r., s. 53. ISBN 978-0-8493-9208-5.
- [22] BLOCH K. The biological synthesis of cholesterol. *Science*. b.r., **1965**(150), 19-28. ISSN 0036-8075.
- [23] NES W. Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 2011, **111**(10), 6423-6451. DOI: 10.1021/cr200021m. ISSN 0009-2665.
- [24] MIZIORKO H. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011, **505**(2), 131-143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>. ISSN 0003-9861.
- [25] LANGDON R., BLOCH K. THE BIOSYNTHESIS OF SQUALENE AND CHOLESTEROL1. *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 1952, **74**(7), 1869-1870. DOI: 10.1021/ja01127a528. ISSN 0002-7863.
- [26] CHEN N., WANG S., SMENTEK L., HESS B. JR., WU R. Biosynthetic Mechanism of Lanosterol: Cyclization. *Angewandte Chemie International Edition*. John Wiley & Sons, Ltd, 2015, **54**(30), 8693-8696. DOI: 10.1002/anie.201501986. ISSN 1433-7851.
- [27] PORTER F., HERMAN G. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *Journal of Lipid Research*. 2010, **52**(1), 6-34. DOI: 10.1194/jlr.R009548. ISSN 0022-2275.
- [28] MIAO L., NIELSEN M., THEWALT J., IPSEN J., BLOOM M., ZUCKERMANN M., MOURITSEN O. From Lanosterol to Cholesterol: Structural Evolution and Differential Effects on Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*. 2002, **82**(3), 1429-1444. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75497-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75497-0). ISSN 0006-3495.

- [29] DE AGUIAR VALLIM T. Q., TARLING E. J., EDWARDS P. A. Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metabolism*. 2013, **17**(5), 657-669. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013>. ISSN 1550-4131.
- [30] MONTE M., MARIN J., ANTELO A., VAZQUEZ-TATO J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World journal of gastroenterology*. The WJG Press, 2009, **15**(7), 804-816. DOI: 10.3748/wjg.15.804. ISSN 2219-2840.
- [31] MUKHOPADHYAY S., MAITRA U. Chemistry and biology of bile acids. *Current Science*. 2004, **87**(12), 1666-1683.
- [32] MARTINOT E., SÈDES L., BAPTISSART M., LOBACCARO J-M., CAIRA F., BEAUDOIN C., VOLLE D. Bile acids and their receptors. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017, **56**, 2-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.006>. ISSN 0098-2997.
- [33] CHIANG J. Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Research*. Rootstown, 2009, **2009**, 1-15. DOI: 10.1155/2009/501739. ISSN 1687-4757.
- [34] CHIANG J. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Research*. 2017, **1**(1), 3-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livres.2017.05.001>. ISSN 2542-5684.
- [35] WATSON R., PREEDY V. *54.3 Hypercholesterolemia and Atherosclerosis*. Elsevier, b.r., s. 701. ISBN 978-0-12-802189-7.
- [36] SHIFFKA S., KANE M., SWAAN P. Planar bile acids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2017, **1859**(11), 2269-2276. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.08.019>. ISSN 0005-2736.
- [37] VAZ F., FERDINANDUSSE S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017, **56**, 10-24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.003>. ISSN 0098-2997.
- [38] CHIANG J. Regulation of bile acid synthesis. *Frontiers in Bioscience*. 1998, **3**(4), 176-193. DOI: 10.2741/A273. ISSN 10939946.

- [39] LI J., DAWSON P. Animal models to study bile acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2019b, **1865**(5), 895-911. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.011>. ISSN 0925-4439.
- [40] WANG H. H., GARRUTI G., LIU M., PORTINCASA P., WANG D. Q-H. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport. *Annals of Hepatology*. 2017, **16**, 27-42. DOI: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5495>. ISSN 1665-2681.
- [41] VAN DER WULP M. Y., VERKADE H. J., GROEN A. K. Regulation of cholesterol homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013, **368**(1), 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.007>. ISSN 0303-7207.
- [42] ONO K. Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection. *Journal of Cardiology*. 2012, **60**(5), 339-343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2012.07.014>. ISSN 0914-5087.
- [43] MAXFIELD F. R., VAN MEER G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 2010, **22**(4), 422-429. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.004>. ISSN 0955-0674.
- [44] STECK T. L., LANGE Y. Cell cholesterol homeostasis: Mediation by active cholesterol. *Trends in Cell Biology*. 2010, **20**(11), 680-687. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.007>. ISSN 0962-8924.
- [45] HOWE V., SHARPE L. J., ALEXOPOULOS S. J., KUNZE S. V., CHUA N. K., LI D., BROWN A. J. Cholesterol homeostasis: How do cells sense sterol excess? *Chemistry and Physics of Lipids*. 2016, **199**, 170-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.02.011>. ISSN 0009-3084.
- [46] MENKES J., SCHIMSCHOCK J., SWANSON P. Cerebrotendinous Xanthomatosis: The Storage of Cholestanol Within the Nervous System. *JAMA Neurology*. 1968, **19**(1), 47-53. DOI: [10.1001/archneur.1968.00480010065004](https://doi.org/10.1001/archneur.1968.00480010065004). ISSN 2168-6149.
- [47] MOGHADASIAN M. H. Cerebrotendinous Xanthomatosis: Clinical Course, Genotypes and Metabolic Backgrounds. *Clinical and Investigative Medicine*. 2004, **2004**(27), 42-50. ISSN 0147958X.



- [48] MOLINARO A., WAHLSTRÖM A., MARSCHALL H-U. Role of Bile Acids in Metabolic Control. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2018, **29**(1), 31-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.002>. ISSN 1043-2760.
- [49] CHOW M., LEE Y-H., GUO G. The role of bile acids in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017, **56**, 34-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.04.004>. ISSN 0098-2997.
- [50] ESLER W., BENCE K. Metabolic Targets in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.04.007>. ISSN 2352-345X.
- [51] POLYZOS S., KOUNTOURAS J., MANTZOROS Ch. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019, **92**, 82-97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014>. ISSN 0026-0495.
- [52] SNIDERMAN A. D., TSIMIKAS S., FAZIO S. The Severe Hypercholesterolemia Phenotype: Clinical Diagnosis, Management, and Emerging Therapies. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014, **63**(19), 1935-1947. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.01.060>. ISSN 0735-1097.
- [53] FARNIER M., BRUCKERT E. Severe familial hypercholesterolaemia: Current and future management. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2012, **105**(12), 656-665. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2012.05.011>. ISSN 1875-2136.
- [54] SHAH P. K. Inflammation, infection and atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.01.004>. ISSN 1050-1738.
- [55] TALEB S. Inflammation in atherosclerosis. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2016, **109**(12), 708-715. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2016.04.002>. ISSN 1875-2136.
- [56] WANG T., BUTANY J. Pathogenesis of atherosclerosis. *Diagnostic Histopathology*. 2017, **23**(11), 473-478. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2017.11.009>. ISSN 1756-2317.

- [57] WANG T., PALUCCI D., LAW K., YANAGAWA B., YAM J., BUTANY J. Atherosclerosis: pathogenesis and pathology. *Diagnostic Histopathology*. 2012, **18**(11), 461-467. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2012.09.004>. ISSN 1756-2317.
- [58] OWEN W. E., THATCHER M. L., CRABTREE K. J., GREER R. W., STRATHMANN F. G., STRASESKI J. A., GENZEN J. R. Body fluid matrix evaluation on a Roche cobas 8000 system. *Clinical Biochemistry*. 2015, **48**(13), 911-914. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.05.012>. ISSN 0009-9120.
- [59] ALLAIN Ch. C., POON L. S., CHAN C. S. G., RICHMOND W., FU P. C. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical Chemistry*. 1974, **20**(4), 470.
- [60] AMUNDSON D. M., ZHOU M. Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1999, **38**(1), 43-52. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(98\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(98)00036-0). ISSN 0165-022X.
- [61] ALBUQUERQUE T. G., OLIVEIRA M. B. P. P., SANCHES-SILVA A., COSTA H. S. Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2016, **193**, 18-25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.109>. ISSN 0308-8146.
- [62] TSAI S-J. J., ZHONG Y-S., WENG J-F., HUANG H-H., HSIEH P-Y. Determination of bile acids in pig liver, pig kidney and bovine liver by gas chromatography-chemical ionization tandem mass spectrometry with total ion chromatograms and extraction ion chromatograms. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(3), 524-533. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.062>. ISSN 0021-9673.