

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů

Reverzní transport cholesterolu stanovený in vivo

Diplomová práce



Bc. Martina Coufalíková

Praha 2009

Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Rudolf Poledne, CSc.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně za použití zdrojů uvedených v seznamu použité literatury a vlastních experimentálních výsledků.

Martina Coufalíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala v první řadě svému školiteli, Prof. Ing. Rudolfu Polednemu, CSc., za odbornou pomoc při psaní této práce a cenné rady. Velký dík patří také RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za pomoc při řešení experimentů, MUDr. Ivaně Králové Lesné, Ph.D a kolektivu Laboratoře pro výzkum aterosklerózy.

Dále bych ráda poděkovala dobrovolným dárcům krve – RNDr. Janu Kovářovi, Csc., Danuši Körberové, Prof. Ing. Rudolfu Polednemu, CSc. a Mgr. Lukáši Schmiedtovi – a všem lidem, kteří mě po celou dobu podporovali.

Diplomová práce byla vypracována za podpory grantu MŠMT 1M0510 Centra výzkumu chorob srdce a cév.

Název práce: **Reverzní transport cholesterolu stanovený in vivo**
Autor: **Bc. Martina Coufalíková**
Katedra: Katedra fyziologie živočichů
Vedoucí diplomové práce: **Prof. Ing. Rudolf Poledne, CSc.**
E-mail školitele: rupo@ikem.cz
Abstrakt:

Pražský hereditárně hypercholesterolemický (PHHC) potkan je kmen vysoce citlivý na dietní cholesterol. Práce se zabývá charakteristikou nascentních VLDL částic a zavedením metody měření reverzního transportu cholesterolu *in vivo* na potkanech.

Charakteristika nascentních VLDL částic

Produkce VLDL částic byla porovnána u potkanů PHHC a Wistar po podání dvou kontrolních a 1% cholesterolové diety po dobu 3 týdnů. VLDL částice byly izolovány ze séra získaného 2 hodiny po *i.v.* aplikaci Tritonu WR 1339. Podávání cholesterolu v dietě nemělo u potkanů Wistar vliv na cholesterolémii, zatímco u potkanů PHHC došlo k vzestupu hladiny cholesterolu o 45 %. Po podání Tritonu WR 1339 vzrostla hladina triglyceridů (TG) v séru několikanásobně následkem akumulace VLDL částic. U potkanů Wistar na cholesterolové dietě došlo k mírnému nárůstu cholesterolu ve VLDL částicích a u PHHC potkanů došlo k vysokému obohacení VLDL částic o cholesterol. U PHHC potkanů na cholesterolové dietě jsou v játrech tvořeny nascentní VLDL částice výrazně obohacené cholesterolem.

Měření reverzního transportu cholesterolu in vivo

Primární buněčná kultura makrofágů získaná peritoneální laváží byla inkubována 48 h ³H cholesterolem a intraperitoneálně aplikována potkanům Wistar a PHHC. U potkanů Wistar byla hladina ³H cholesterolu po 24 h vyšší než hladina ³H cholesterolu po 48 h. Potkani vyloučili v době 0 – 24 h a 24 – 48 h přibližně stejné množství ³H cholesterolu. Hladina ³H cholesterolu byla měřitelná v séru i ve stolici. Intraperitoneální aplikací adekvátního množství makrofágů označených ³H cholesterolem lze měřit reverzní transport cholesterolu u potkanů.

Title: **Reverse cholesterol transport determined in vivo**
Author: **Bc. Martina Coufalíková**
Department: Department of Physiology
Supervisor: **Prof. Ing. Rudolf Poledne, CSc.**
Supervisor's e-mail address: rupo@ikem.cz
Abstract:

Prague hereditary hypercholesterolemic (PHHC) rat is a specie, which is very sensitive to a dietary cholesterol. Our study deals with characteristics of nascent VLDL particles and introduces new method for measurements of reverse cholesterol transport in vivo on rats.

Characteristics of nascent VLDL particles

Production of VLDL particles was studied with two different rat species – Wistar and PHHC. VLDL particles were isolated from a serum 2 hours after *i.v.* application of Triton WR 1339. No dependence of cholesterol of the Wistar rats on the diet was observed, while increase of about 45 % of cholesterol of PHHC rats was found. The count of triglycerides (TG) after application of tyloxapol steeply increased as a result of accumulation of VLDL particles. Small increase of cholesterol in VLDL particles was observed assuming Wistar rats on the cholesterol diet, while the same increase was found to be rapidly higher with PHHC rats on the same diet. Liver of PHHC rats on the cholesterol diet therefore products nascent VLDL particles significantly enriched with cholesterol.

Measurements of reverse cholesterol transport in vivo

Primary cell culture of macrophages obtained by the help of peritoneal lavage was incubated for 48 hours with ^3H cholesterol and then intraperitoneally applied to Wistar and PHHC rats. Level of ^3H cholesterol in Wistar rats after 24 hours was found to be higher than that after 48 hours. Rats excreted approximately the same quantity of ^3H cholesterol in time intervals 0–24 hours and 24–48 hours. Level of ^3H cholesterol was measurable both in serum and in excrements. By the intraperitoneal application of sufficient quantum of macrophages labeled with ^3H cholesterol it is possible to measure reverse transport of cholesterol in vivo.

Obsah	
Abstrakt	4
Obsah	6
Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1. Lipoproteiny	10
2.1.2. Cholesterol	10
2.1.3. Triacylglyceroly	11
2.1.4. Fosfolipidy	12
2.1.5. Apoproteiny	13
2.2. Metabolismus lipoproteinů	15
2.2.1. Exogenní cesta	15
2.2.2. Endogenní cesta	16
2.3. Reverzní transport cholesterolu	18
2.3.1. Scavenger Receptory	18
2.3.2. ABCA1 receptory	20
2.3.3. ABCG1 a ABCG4 receptory	20
2.3.4. Mechanismus RTC	21
2.4. Pražský hereditární hypercholesterolemický potkan (PHHC)	21
3. Cíle diplomové práce	24
4. Charakteristika nascentních VLDL částic	25
4.1. Materiál a metodika	25
4.1.1. Použitá zvířata	25
4.1.2. Materiál a chemikálie	25
4.1.2.1. Diety	25
4.1.2.2. Triton WR 1339	26
4.1.2.3. Thiopental sodný	27
4.1.3. Provedení experimentu	27
4.1.4. Statistické hodnocení	28
4.2. Výsledky	29
4.3. Diskuse	34

5. Reverzní transport cholesterolu stanovený in vivo	36
5.1. Materiál a metodika	36
5.1.1. Zvířata	36
5.1.2. Chemikálie a přístroje	36
5.1.2.1. Thioglykolát	36
5.1.2.2. Médium pro primární kulturu makrofágů	36
5.1.2.3. Izotop	37
5.1.2.4. Přístroje	37
5.2. Provedení experimentu 1	37
5.3. Výsledky experimentu 1	39
5.4. Diskuse 1	41
5.5. Provedení experimentu 2	41
5.6. Výsledky 2	43
5.7. Diskuse 2	43
6. Závěr	44
7. Seznam použité literatury	45
8. Použité učebnice	52

Seznam použitých zkratk:

apo	apoprotein
B	bottom
C	standardní laboratorní dieta
CETP	cholesterolestertransferprotein
FCS	fetal calf serum
HDL	high density lipoproteins
HF	kontrolní tuková dieta
HFHC	cholesterolová dieta
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
i.p.	intraperitoneální
i.v.	intravenózní
IDL	intermediate density lipoproteins
L-G	L-glutamin
LCAT	lecithin-cholesterolacyltransferáza
LDL	low density lipoproteins
LPL	lipoproteinová lipáza
LRP	receptor related protein
LVA	laboratoř pro výzkum aterosklerózy
LXR	jaterní receptory X
m	hmotnost potkanů
PBS	phosphate buffered saline
PHHC	Pražský hereditární hypercholesterolemický potkan
PLTP	fosfolipid transfer protein
RTC	reverzní transport cholesterolu
RXR	retinoidní X receptory
SR	scavenger receptory
T	top
TG	triacylglycerol
UC	ultracentrifugace
VLDL	very low density lipoproteins
VMK	volné mastné kyseliny

1. Úvod

Hypercholesterolemie je jedním z hlavních faktorů pro vznik aterosklerózy. Podobně jiným patofyziologiím je třeba k jejímu studiu vhodný zvířecí experimentální model. Velmi využívaný zvířecí model, laboratorní potkan, byl však pro výzkum hypercholesterolemie nevhodný. Lze u něj indukovat hypercholesterolemii pouze toxickými dávkami thyroxinu či kyseliny cholové.

V Laboratoři pro výzkum aterosklerózy (IKEM) se z kmene Wistar podařilo vyselektovat Pražského hereditárně hypercholesterolemického potkana (PHHC), který má v porovnání s potkany Wistar zvýšenou hladinu bazální cholesterolemie a lze u něj snadno indukovat hypercholesterolemii podáváním dietního cholesterolu. Přes několikanásobně vyšší hladinu cholesterolu v séru při dlouhodobém podávání dietního cholesterolu nebyly u potkanů PHHC pozorovány aterosklerotické změny na cévách.

U PHHC potkanů není dosud objasněna příčina jejich rezistence vůči aterosklerotickým procesům.

Jedním z faktorů, který se může podílet na odolnosti PHHC potkanů vůči aterogenezi je reverzní transport cholesterolu (RTC). Metoda měření RTC *in vivo* nebyla dosud u potkanů popsána.

Tato práce se bude zabývat zavedením metody pro měření RTC *in vivo* na potkanech a metabolismem lipoproteinových částic u PHHC potkana.

2. Literární přehled

2.1. Lipoproteiny

Lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin, alkoholů a jejich derivátů. Jsou zdrojem energie pro všechny buňky organismu, mají stavební a ochrannou funkci. Lipidy jsou ve vodném prostředí nerozpustné. V krevní plazmě jsou transportovány pomocí lipoproteinů. Lipoproteiny jsou micelární částice s nepolárním lipidovým jádrem tvořeným hydrofobními komponenty (triacylglyceroly, estery cholesterolu). Zevní vrstva je tvořena amfifilními komponenty (fosfolipidy, neesterifikovaný cholesterol a apoproteiny). Lipoproteiny transportují lipidy z místa syntézy do míst jejich odbourání či přeměně v intravasálním prostoru. Lipoproteiny se liší hustotou, velikostí, složením lipidů, místem syntézy a apoproteiny. Můžeme je rozdělit do pěti tříd na chylomikrony, very low density lipoproteins (VLDL), intermediate density lipoproteins (IDL), low density lipoproteins (LDL) a high density lipoproteins (HDL) (viz tab. 2.1).

	Chylomikrony	VLDL	IDL	LDL	HDL
Proteiny*	1–2	6–10	10–12	18–22	45–55
Fosfolipidy*	3–6	5–20	25–27	18–24	26–32
Tryglyceridy*	80–95	45–65	25–30	4–8	2–7
Volný cholesterol*	1–3	4–8	8–10	6–8	3–5
Esterifikovaný cholesterol*	2–43	6–11	32–35	45–50	5–20
Apoproteiny*	A-I, A-II, A-IV, A-V B48	A-V B100	- B100	- B100	A-I, A-II, A-IV, A-V -
	C-I, C-II, C-III E	C-I, C-II, C-III E	C-I, C-II, C-III E	- -	C-I, C-II E

* Složení je vyjádřeno v procentech

Tab. 2.1 Lipoproteiny plazmy (Korporaal, 2006).

2.1.2. Cholesterol

Název cholesterol pochází z řeckého cholé – (žluč), stereos – (pevný) a chemické přípony – ol (pro alkohol). Cholesterol ($C_{27}H_{45}OH$) je znám již od roku 1784, kdy jej prvně objevil François Poulletier de la Salle ve žlučových kamenech.

Cholesterol jako derivát cyklo-perhydrofenantrenu se skládá ze čtyř benzenových jader. Jeho hydroxylová skupina má slabý antipatický charakter. Neobsazená OH skupina volného cholesterolu umožňuje interakci s vodou, proto je volný cholesterol částečně hydrofilní. Esterifikovaný cholesterol má na OH skupině navázanou mastnou kyselinu, je proto zcela hydrofobní (viz obrázek 2.1).

Cholesterol je základní strukturální součástí plasmatických membrán všech buněk, endoplasmatického retikula a endocytárních váčků (Chesterton, 1968). Určuje jejich viskozitu a zajišťuje stabilitu membrán při změnách tělesné teploty. V organismu je nezbytný pro syntézu některých hormonů a žlučových kyselin, dále je hlavním prekurzorem při syntéze vitamínu D, steroidních hormonů včetně kortizolu a aldosteronu (Vyroubal, 2008), pohlavních hormonů – progesteronu, estrogeneru, testosteronu. Cholesterol je důležitý pro vstřebávání tuků samotných, vitamínů rozpustných v tucích (A, E, D, K) a dalších látek. Většina cholesterolu je syntetizována de novo v buňkách lidského organismu, především v játrech, část se do organismu dostává exogenní cestou – potravou. Z organismu je cholesterol vylučován výhradně žlučí, buď v nezměněné formě nebo ve formě žlučových kyselin (kyselina cholová a chenodesoxycholová) (Kuhajda, 2006).

V lipoproteinech je z celkového množství cholesterolu 25 – 40 % cholesterolu neesterifikovaného a 60– 75 % je cholesterol esterifikovaný nenasycenými mastnými kyselinami. Esterifikovaný cholesterol je transportní a zásobní formou cholesterolu. Při diagnostice se tyto dvě formy cholesterolu nerozlišují, obvykle stanovujeme pouze celkový cholesterol (Banaszak, 1991).

Cholesterol hraje klíčovou roli v mnoha procesech probíhajících v lidském organismu, ale nejvíce je znám jeho vztah k ateroskleróze a kardiovaskulárním onemocněním.



Obr. 2.1 Volný a esterifikovaný cholesterol.

2.1.3. Triacylglyceroly

Triacylglyceroly (TG) neboli triglyceridy jsou látky vznikající vazbou 3 mastných kyselin na glycerol. TG mohou obsahovat tři shodné acylové zbytky, nebo může být každá hydroxyskupina esterifikována rozdílnými kyselinami. Obvykle obsahují směs dvou až tří různých mastných kyselin.

TG získáváme zejména z potravy (80–170 mmol/den), ale mohou vznikat i endogenně. Syntéza TG „de novo“ probíhá především v játrech, tukové tkáni a částečně i v enterocytech. Zvýšená koncentrace TG v krvi je často reakcí na nadměrný přísun energie v potravě. Lipoproteiny bohaté na TG jsou chylomikrony a VLDL. TG jsou hydrolyzovány působením lipáz a žlučových kyselin na glycerol a mastné kyseliny (Jaworsky, 2007).

TG jsou jedním ze základních energetických substrátů a hlavní zásobní formou energie. V adipocytech tvoří TG až 90 % objemu. Tukovou tkáň můžeme rozdělit na podkožní a viscerální. Podkožní tuková tkáň má význam v regulaci tělesné teploty a také jako zásobní vrstva. Viscerální tuk v přiměřeném množství chrání vnitřní orgány před otřesy a výkyvy teplot a je významnou zásobárnou energie. Na druhé straně je viscerální tuk více metabolicky aktivní tkáň a je metabolizován zcela odlišně než podkožní tuk. TG jsou portální žilou odváděny přímo do jater. Tím dochází ke hromadění TG ve tkáních jako jsou játra, pankreas a kosterní svaly. Narušená funkce a metabolismus těchto orgánů vede ke zvýšení sekrece VLDL a LDL částic a k nárůstu hladiny glykémie (Bülow, 1999; Frayn, 1992).

Se vzrůstajícím množstvím viscerálního tuku se výrazně zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob a diabetu mellitu II. typu.

2.1.4. Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou složeny z hydrofilní polární skupiny a hydróbní části. Hydrofilní polární část obsahuje zbytek kyseliny fosforečné, která je esterifikována glycerolem. Dále je pak esterifikována cholinem, ethanolaminem, serinem, inositolem či opět glycerolem. Hydrofóbní část obsahuje dva řetězce nasycených či nenasycených mastných kyselin, které se váží na glycerol.

Fosfolipidy hrají nezastupitelnou roli v buněčných membránách a na povrchu lipoproteinů. Je to dáno jejich amfifilním charakterem, kdy hydrofóbní část směřuje do nitra buňky a hydrofilní fosfátová část k jejímu povrchu.

Nejčastější fosfolipidy jsou fosfatidylcholin (jinak také lecitin), sfingomyelin a další. Fosfatidylcholin je obsažen především v buněčných membránách, sfingomyelin především v nervové tkáni. Oba tyto fosfolipidy jsou zastoupeny v lipoproteinech, kde umožňují transport TG a esterifikovaného cholesterolu ve vodném prostředí (Brown, 2000).

2.1.5. Apoproteiny

Bílkovinnou část lipoproteinů tvoří apoproteiny (apo), které jsou strukturními elementy lipoproteinů, jsou kofaktory enzymů účinných v metabolismu lipoproteinů, zprostředkují vazbu lipoproteinové částice na specifické receptory a účastní se přenosu nebo výměny lipidových částic mezi jednotlivými lipoproteiny. Dělíme je na několik tříd označovaných velkými písmeny a jejich podtřídy značené čísly (tab. 2.2).

Hlavní plasmatické apoproteiny					
Apoproteiny	koncentrace v plasmě		distribuce v lipoproteinech (%)		
	mg/dl	HDL	LDL	IDL	VLDL
apo A-I	130	100			
apo A-II	40	100			
apo A-IV	18				
apo B48	0.2				>70
apo B100	80		88	6	6
apo C-I	6	97		1	2
apo C-II	3	60		10	30
apo C-III	12	60	10	10	20
apo D	10	100		20	
apo E	5	50	10		20

Tab. 2.2 Přehled apoproteinů (Scriver, 1999).

Apoprotein A

Apoproteiny A jsou převážně syntetizované v buňkách střevního epitelu a částečně v játrech.

Apo A-I a apo A-II tvoří přibližně 90 % celkových proteinů HDL částic. Poměr mezi apo A-I a apo A-II v typických částicích HDL je 3:1. Apo A-I obsahuje 258 – 267 aminokyselin (Frank, 2000) a je kofaktorem lecitin-cholesterolacyltransferázy (LCAT), enzymu zodpovědného za formování esterů cholesterolu v plazmě, a má významnou roli v reverzním transportu cholesterolu (RTC) (Breslow, 1982). Apo A-II obsahuje dva polypeptidové řetězce po 77 aminokyselinách. Existují některé důkazy o tom, že apo A-II inhibuje LCAT a aktivuje triglyceridovou lipasu (Knott, 1985).

Apoprotein A-IV je syntetizovaný pouze ve střevě. Jeho velikost je 46 kDa (Liu, 2003). Největší význam má jako ligand pro vazbu HDL a jako aktivátor LCAT.

Apoprotein B

Apoprotein B existuje ve dvou formách: apo B-100 a apo B-48. Oba dva proteiny jsou translačním produktem jednoho genu. V mRNA pro apo B-100 ve střevních buňkách se v pozici 2153 mění C na U a tím kodon pro glutamin na stop kodon a vzniká apo B-48.

Apo B-100 je jeden polypeptidový řetězec o velikosti 513 kDa a patří k největším apoproteinům (Innerarity, 1990). Apo B-100 se syntetizuje v játrech a do plasmy se dostává jako součást VLDL. Apo B-100 je hlavním apoproteinem LDL částic, konečného produktu katabolismu VLDL. Každá molekula VLDL obsahuje jednu molekulu apo B-100. V době lačnění převážná většina apoproteinů B v plazmě je apo B-100. Apo B-100 nemůže přecházet z jednoho lipoproteinu na druhý. Apo B-100 je rozpoznáván LDL receptorem jaterní a periferní tkáně a umožňuje tak internalizaci LDL částic.

Apo B-48 je homolog apo B-100 o velikosti 214 kDa a je identický s aminoterminální částí apo B-100 (Albers, 1989). Apo B-48 je syntetizován ve střevě a je hlavní součástí chylomikronů.

Apoprotein C

Apoproteiny C-I, C-II a C-III se vyskytují ve všech lipoproteinech kromě LDL. Apo C-I je nejmenší z apoproteinů C a obsahuje 57 aminokyselin. Apo C-I aktivuje LCAT *in vitro*. Apo C-II je polypeptidový řetězec složený ze 79 aminokyselin. Hraje důležitou roli v metabolismu lipoproteinů bohatých na TG aktivací lipoproteinové lipasy (LPL). Apo C-III je také polypeptidový řetězec složený ze 79 aminokyselin (Olivieri, 2002). Existuje minimálně ve třech polymorfních formách (Mahley, 1984). Apo C-III inhibuje LPL a aktivuje LCAT.

Poměr apo C-II/apo C-III je rozhodující pro regulaci LPL.

Apoprotein D

Apo D je glykoprotein o velikosti 29 kDa. Můžeme ho nalézt pouze v HDL částicích. Apo D je exprimován mnoha tkáněmi, zejména ve slezině, varlatech a mozku. Pravděpodobně se váže s LCAT a cholesterolestertransferproteinem (CETP) (Rassart, 2000).

Apoprotein E

Apoprotein E je glykoprotein s molekulovou hmotností 34 kD. Je syntetizovaný v játrech a mozku. Apoprotein E je součástí všech lipoproteinů mimo LDL částic. Jeho základní funkcí je vázat chylomikronové a VLDL remnanty, jako ligand s vysokou afinitou pro apo B a apo E receptory (Jawien 2004).

Gen pro apoprotein E se běžně vyskytuje ve třech alelách označovaných $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, které kódují odpovídající izoformy proteinu označované E2, E3, E4. Isoformy se navzájem odlišují aminokyselinovým složením v pozicích 112 a 158 (Hořejší, 2000).

Nejběžnější izoformou apolipoproteinu E je apo E3, která je charakterizována přítomností aminokyseliny cysteinu v pozici 112 a Arg v pozici 158. Isoforma apo E2 je charakterizována cysteinem v pozicích 112 i 158, isoforma apo E4 argininem v pozicích 112 i 158 (Eichner, 2002).

„Nové“ apoproteiny

Apoprotein A-V

Apo A-V byl objeven v roce 2001, obsahuje 367 aminokyselin a je syntetizován v játrech. Role apo A-V v metabolismu lipoproteinů spočívá v regulaci plasmatických TG a pravděpodobně i v intracelulárním metabolismu TG (Nelbach, 2008).

Za zmínku stojí alespoň v přehledu uvést další nově objevené apoproteiny, jejichž funkce ještě není zcela objasněna (tab. 2.3).

Nové apoproteiny	Koncentrace v plazmě (mg/dl)	Výskyt v lipoproteinech	Molekulární váha
Apo F	< 5	HDL	30000
Apo G	< 5	VLDL	72000
Apo H	15 - 30	CM	55000
Apo J	7/1/20	HDL	70000
Apo L	< 1	HDL	39000
Apo M	< 1	HDL	26000

Tab. 2.3 Přehled „nových“ apoproteinů.

2.2. Metabolismus lipoproteinů

Lipoproteinový metabolismus lze rozdělit na exogenní a endogenní metabolickou cestu.

2.2.1. Exogenní cesta

V enterocyty se ze vstřebaných lipidů a cholesterolu syntetizují velké částice - nascentní chylomikrony, jejichž charakteristickým integrálním apoproteinem je apo B-48. Chylomikrony z 90 % obsahují TG, dále apo A-I, A-II a A-IV, které spolu s fosfolipidy a s menším podílem volného cholesterolu pokrývají povrch chylomikronu. Po vstupu do lymfatického řečiště dochází k jejich obohacení o apoproteiny C-II, C-III a apo E z částic HDL.

Základní funkcí chylomikronů je transportovat dietou přijaté TG, další lipidy a cholesterol exogenní cestou do jater. Po požití jídla s vysokým obsahem lipidů se chylomikrony dostávají exocytózou do střešní lymfy a čirá lymfa se mění na zakalený chylus. Přes ductus thoracicus se chylus spojuje s krevním oběhem (Redgrave, 1970).

Apoprotein C-II nacházející se na povrchu chylomikronů aktivuje LPL. LPL odštěpuje volné mastné kyseliny (VMK) z chylomikronových TAG, ale vyvolává i odštěpování VMK z fosfolipidů (Škottová, 1995). VMK se okamžitě vážou na albuminy a jsou transportovány k tukovým a svalovým buňkám, kde jsou využity jako zdroj energie.

Degradační činností se chylomikrony deformují a zmenšují, povrchové součásti chylomikronu apo A-I, A-II, A-IV a apo C-II, C-III, fosfolipidy a volný cholesterol se předávají zpět částicím HDL (Ostlund-Lindqvist, 1983). Někdy dojde k odštěpení větších částí chylomikronu, ze kterých rovnou vznikají nové částice HDL. Ze zbytku chylomikronu zbývá remnant (chylomikronový zbytek), který je bohatý na apo E a estery cholesterolu. Apoprotein E se váže na receptory hepatocytu a chylomikronový remnant je pohlcen a degradován (Cooper, 1997).

Hlavní funkcí chylomikronů je dopravit mastné kyseliny z TG z potravy do tkání, především svalové a tukové, a cholesterol z potravy do jater.

V malé míře se v enterocytu syntetizují i částice VLDL. Jejich metabolismus je analogický s metabolismem chylomikronů.

2.2.2. Endogenní cesta

VLDL částice (Very Low Density Lipoproteins) jsou syntetizovány v játrech. VLDL jsou velké částice, které obsahují kolem 65 % TAG a estery cholesterolu. Zevní obal VLDL částic obsahuje fosfolipidy, apo B-100, velmi malá množství apo C-I, C-II, C-III a apo E. VLDL částice jsou také obohacovány o apoproteiny z HDL. Vysoký obsah TG a cholesterolu ve VLDL částicích je štěpen LPL (analogicky metabolismu chylomikronů) a uvolněné volné mastné kyseliny jsou odbourávány ve všech extrahepatálních tkáních.

VLDL částice jsou postupně štěpeny LPL až na VLDL remnanty (VLDL zbytky) bohaté na apo E a estery cholesterolu, které označujeme jako IDL (Intermediate Density Lipoproteins). Část IDL částic může být zachycena v hepatocytu LDL receptorem nebo receptorem pro chylomikronové remnanty. IDL jsou pak hydrolyzovány jaterní lipázou. Z druhé části vznikají LDL (Low Density Lipoproteins) nebo „small dense“ LDL částice.

Základní funkcí VLDL částic je transport TG k periferním tkáním. Zvýšená syntéza VLDL částic je stimulována u jedinců s nadměrným příjmem energie, nadváhou a inzulínovou

rezistencí a naopak jejich rychlost tvorby se snižuje při adaptaci na zvýšenou fyzickou aktivitu, redukci hmotnosti a snížení příjmu alkoholu.

Částice VLDL dělíme na VLDL1 a VLDL2 částice. VLDL1 cirkulují v oběhu déle, mají delší poločas rozpadu a jsou zdrojem VLDL2 částic, IDL a prekurzorem tzv. „small dense“ LDL částic. VLDL2 částice jsou podobné VLDL1 částicím, jsou však menší, obsahují méně TG, mají kratší poločas rozpadu a jsou zdrojem IDL částic a hlavním prekurzorem LDL částic (Adiels, 2007; Kearney, 2001).

LDL částice (Low Density Lipoproteins) jsou výsledným produktem štěpení a přeměny VLDL a IDL částic. Obsahují pouze apo B-100 a 60 – 80 % cholesterolu. Jsou dále obohacovány o estery cholesterolu, které získávají od HDL částic. Částice LDL se pomocí apo B-100 váží na LDL receptory. Na LDL receptory periferních tkání se váže až 70 % LDL částic, zbytek je vychytáván na povrchu hepatocytů (Galeano, 1998). Po proniknutí do buňky se LDL částice štěpí na aminokyseliny, VMK a cholesterol.

Základní funkcí LDL částic je transport cholesterolu do extrahepatálních buněk, které si nejsou schopny vytvořit endogenní cholesterol vlastní syntézou. K dostatečnému přívodu extracelulárního cholesterolu do každé buňky stačí celková koncentrace cholesterolu v séru kolem 3,5 mmol/l a všechny vyšší koncentrace jsou z tohoto důvodu zbytečné.

„Small dense“ LDL částice jsou menší než normální LDL částice. Obsahují více apo B-100, mají sníženou afinitu k LDL receptorům (Galeano, 1994) a velice snadno se oxidují. Proto jsou tyto částice vysoce aterogenní (Packard, 2003).

HDL částice (High Density Lipoproteins) jsou syntetizované v tenkém střevě a v játrech. Jsou syntetizované ve formě lipid poor apo A-I. Tato forma je chudá na fosfolipidy a cholesterol a snaží se tyto látky ihned přijmout přes ABCA1 – zprostředkovaný výlev cholesterolu a fosfolipidů z jater a extrahepatálních tkání, a také z chylomikronů a LDL částic, které jsou degradovány LPL. Po obohacení lipid poor apo A-I částic vznikají nascentní HDL částice, obsahující fosfolipidovou dvojvrstvu a volný cholesterol. Tyto částice mají tvar disku a obsahují apo A-I a A-II. Tyto nascentní HDL částice také mohou vznikat přímo při katabolismu chylomikronů a VLDL částic odštěpením většího množství fosfolipidů, cholesterolu a apoproteinů najednou (Lewis, 2005; Rader, 2006).

Přítomnost apo A-I v HDL částicích je důležitá pro aktivaci LCAT. Nascentní HDL částice interagují s LCAT, která je zodpovědná za esterifikaci cholesterolu. V nascentních HDL částicích se po esterifikaci vytváří z esterů cholesterolu hydrofobní jádro, částice se postupně přeměňují na sférické částice HDL₃. Jejich jádro je dále obohacováno o estery cholesterolu a tvar se mění na kulovitý. Přenosem z jiných lipoproteinů se povrch HDL

obohacuje o volný cholesterol, fosfolipidy a apoproteiny C-II, C-III a E, čímž vzniká podtřída HDL₂. Teprve ta je schopna být donorem esterů cholesterolu a apoproteinů C a E pro chylomikrony a VLDL částice.

Apoprotein A-I je hlavním apoproteinem HDL částic a hlavní příjemce neesterifikovaného cholesterolu z periferních buněk (von Eckardstein, 1993; Forte, 1993). Další důležitou součástí jsou fosfolipidy. Dle množství fosfolipidů je můžeme rozdělit na tzv. lipid poor Apo A-I (apoprotein A-I s malým množstvím fosfolipidů) a na tzv. lipid free Apo A-I. Lipid free Apo A-I je méně stabilní, neboť v plazmě snadno a rychle asociuje se zralými HDL částicemi.

Základní funkcí HDL částic je přenos cholesterolu z periferních tkání zpět do jater. Tento proces se nazývá reverzní transport cholesterolu (RTC), kde je částice HDL schopná vázat cholesterol z periferních buněk (Funke, 1997).

Částice HDL jsou velmi heterogenní. Obsahují lipidovou složku, apoproteiny, proteiny a enzymy zprostředkující výměnu lipidů mezi lipoproteiny jako LCAT, která katalyzuje esterifikaci volného cholesterolu a CETP, umožňující vzájemnou výměnu nepolárních lipidů mezi jednotlivými lipoproteiny.

2.3. Reverzní transport cholesterolu

Reverzní transport cholesterolu je důležitý pro udržení rovnováhy cholesterolu v buňkách, neboť tvoří protiváhu transportu cholesterolu do buněk zprostředkovaného LDL částicemi. RTC zajišťuje transport cholesterolu z periferie do jater, kde je degradován a odváděn žlučí. Významnou roli v RTC má HDL částice a její klíčový apoprotein A-I. Další významnou úlohu v RTC mají makrofágy, které jsou schopny za fyziologických podmínek fagocytovat a odstraňovat LDL částice z cévních stěn. Transport cholesterolu z nitra buňky přes membránu je zajištěn ABCA1 receptory, SR-BI či volnou difuzí cholesterolu.

2.3.1. Scavenger Receptory

Scavenger receptory (SR) jsou glykoproteiny na povrchu buněk, které vážou široké spektrum látek, např. modifikované proteiny, polysacharidy, polyribonukleotidy, fosfolipidy a mnoho dalších molekul.

Pomocí biochemických a molekulárních metod byly identifikovány a charakterizovány tři strukturálně odlišné třídy SR: SR-A, SR-B a SR-C.

Třidu SR-A dále dělíme na tři podtřídy, které se vyskytují zejména u savců, třídu SR-C pak na podtřídy, které byly objeveny u makrofágů *Drosophily melanogaster*. Všechny

podtřída SR-A a třída SR-CI váží mnoho rozmanitých látek např. modifikované proteiny, polysacharidy, mikrobiální toxiny či polynukleotidy (Krieger, 2001). Široká vazebná specifita SR na makrofázích má zřejmě vliv na patologické procesy, kterých se makrofágy účastní.

Významnou úlohu v metabolismu lipidů mají SR třídy BI (SR-BI). Jsou lokalizovány na povrchu hepatocytů a makrofágů. SR-BI vážou modifikované lipoproteiny, sérový albumin, fosfolipidy a apoptické buňky (Krieger, 2001). SR-BI také váže HDL, LDL a VLDL částice s vysokou afinitou (Acton, 1996). SR-BI je molekula, která je schopna zprostředkovat selektivní přesun HDL cholesterolu, který je velmi důležitý při metabolismu lipoproteinů, zahrnující transport cholesterolu z HDL částic do hepatocytů či jiných tkání bez narušení a degradace HDL částic (Glass, 1983).

SR-BI usnadňuje buněčný přenos cholesterolu hlavně ve formě esterů. Ty jsou přeneseny z hydrofóbního jádra lipoproteinů na povrch buňky. SR-BI může přenášet i neesterifikovaný cholesterol a fosfolipidy mezi HDL částicemi a buňkami. Selektivní přenos zahrnuje účinný transport esterů cholesterolu z hydrofóbního jádra bez apoproteinů na povrchu (Krieger, 2001).

Mnoho studií nahlíží na SR-BI z různých pohledů a poskytují řadu důkazů o významu těchto receptotů v metabolismu HDL částic. Výzkum se zabývá zejména vazbou HDL částic na SR - BI, afinity a selektivního přenosu cholesterolu, exprese SR-BI v játrech, placentě či žloutkovém vaku a také vlivu SR-BI v jiných tkáních (Acton, 1996; Landschulz, 1996; Hatzopoulos, 1998; Rigotti, 1996).

V procesu aterogeneze mají SR-BI jednoznačnou úlohu. Receptory SR-BI umožňují obousměrný tok cholesterolu, který závisí na koncentračním gradientu cholesterolu uvnitř a vně buněk (Eck, 2005). SR-BI jsou zřejmě zodpovědné za přeměnu monocytů na makrofágy a následnou přeměnu makrofágů na pěnové buňky (Lesná, 2006). SR-BI mají tedy proaterogenní účinek, neboť mohou vázat oxidované či acylované LDL a VLDL částice na periferních tkáních. Tyto modifikované částice se pak ukládají ve stěně endotelu cév a jsou důležité pro tvorbu pěnových buněk během aterogeneze (Steinberg, 1997).

Zároveň však mají SR-BI receptory i protiaterogenní účinek. SR-BI receptory přítomny na hepatocytech na sebe vážou HDL částice, odebírají jim nadbytečný cholesterol, který je z jater odváděn žlučí do stolice. Jejich exprese na pěnových buňkách v aterosklerotických plátech zajišťuje přenos cholesterolu mezi buňkami a HDL částicemi a brání tím akumulaci cholesterolu v endotelu cév (Trigatti, 2003).

2.3.2. ABCA1 receptory

ABCA1 receptor patří do rodiny ATP-binding cassette receptorů, které transportují molekuly skrz buněčnou membránu. ABCA1 receptor je integrální protein složený ze dvou transmembránových domén, kdy každá z nich obsahuje 6 α -helixů. Uprostřed každé z domén je kanál, kterým může procházet cholesterol, fosfolipidy, vitamíny A, E a K, interleukin-1 β a anionty (von Eckardstein, 2001). Na intracelulární cytosolové straně jsou dvě nukleotidové vazebné domény obsahující Walker A a Walker B motivy (Cavalier, 2006). Na extracelulární straně se nacházejí dvě smyčky, vysoce glykosylované a spojené jednou či více cysteinovými vazbami (Oram, 2003). ABCA1 je produkován mnoha tkáněmi, nejvyšší exprese byla objevena ve tkáních fétu, placentě, játrech, plicích a makrofázích. Role ABCA1 receptorů v metabolismu lipoproteinů byla objevena ve spojení s Tangierskou nemocí (Bodzioch, 1999). Pacienti postižení touto nemocí mají velmi nízkou hladinu plasmatických HDL a dochází u nich k akumulaci cholesterolu a esterů cholesterolu v makrofázích a pěnových buňkách v tonsilách, játrech, slezině a dalších tkáních (Brooks-Wilson, 1999). Exprese genu kódujícího ABCA1 receptor je řízena jaterními receptory X (LXR) a retinoidními X receptory (RXR). Regulace je závislá na celkovém množství cholesterolu v buňkách. Při zvýšené koncentraci dochází ke zvýšené expresi ABCA1 receptorů.

Základní funkcí ABCA1 receptoru je zajištění přenosu volného cholesterolu a fosfolipidů z buněk přes buněčnou membránu. Tyto látky se pak váží na malé HDL částice, tzv. lipid poor apo A-I. ABCA 1 receptory reagují pouze s těmito malými HDL částicemi.

2.3.3. ABCG1 a ABCG4 receptory

Aktivní transport cholesterolu na zralé částice HDL zajišťují další receptory z rodiny ATP-binding cassette receptorů – tzv. ABCG1 a ABCG4. Receptory ABCG1 a ABCG4 zajišťují přenos fosfolipidů a cholesterolu z buněk na částice HDL, které již byly alespoň částečně obohaceny fosfolipidy a cholesterolem. Obvykle tyto HDL částice obsahují cholesterol a fosfolipidy, které získaly přes ABCA1 – zprostředkovaný výlev cholesterolu a fosfolipidů z jater či chylomikronů a VLDL částic. Receptory ABCG1 jsou přítomny zejména na makrofázích. Receptory ABCG4 se vyskytují na makrofázích v menším množství, ale vždy jsou přítomny ve velké míře v mozku (Lesná, 2006).

2.3.4. Mechanismus RTC

První fází RTC je hydrolýza esterů cholesterolu pomocí cholesterol ester hydrolázy v cytoplazmě buňky. Po hydrolýze je volný cholesterol transportován k membráně buňky (Ghosh, 2000). Transport přes membránu je zajištěn ABCA1 receptory, SR-BI či volnou difuzí cholesterolu. Transport pomocí ABCA1 je aktivní a vyžaduje dodání energie ve formě ATP. Transport pomocí SR-BI či volné difuze je pasivní a nevyžaduje dodání energie.

Po navázání lipid free apo A1 částic na receptory nejprve dojde k jejich obohacení o fosfolipidy a tím vytvoření stabilnějších lipid poor apo A1. Poté dojde k přenosu cholesterolu na lipid poor apo A1. Vznikají tak pre β -HDL částice (Von Eckardstein, 2001).

V následném kroku RCT je cholesterol esterifikován pomocí LCAT. Původně polární molekuly volného cholesterolu pokrývající povrch HDL částice se mění na hydrofóbní estery, které se přesouvají do jádra částice. Tím vzniká sférická částice HDL₃ obsahující nepolární jádro (Lesná, 2006).

Částice HDL₃ jsou dále obohacovány o cholesterol a fosfolipidy z VLDL a chylomikronů. Ty jsou přenášeny pomocí fosfolipid transfer proteinu (PLTP). Vznikají tak částice HDL₂. V plazmě se na HDL₂ váže CETP. CETP zajišťuje výměnu esterů cholesterolu z HDL s TG z lipoproteinů obsahujících apo B (Fielding, 1995). V závěrečné fázi RTC se HDL₂ vychytávají v játrech, kde se vážou na SR-BI. Po odebrání cholesterolu se částice uvolní a je opět schopná vázat lipidy. HDL₂ se také mohou vázat na LDL receptor related protein (LRP), který vychytává lipoproteiny, jež na sobě nesou apoprotein E (Hertz, 1988). Ten je obsažen i v HDL částicích. LRP také odstraňují cholesterol obsažený v lipoproteinech, které se účastnily výměny esterů cholesterolu a TG pomocí CETP. Kombinací CETP a jaterní lipázy je HDL₂ částice regenerovaná na částice HDL₃, pre β -HDL, lipid poor apo A1 a lipid free apo A1 (Berti, 2005).

2.4. Pražský hereditární hypercholesterolemický potkan (PHHC)

Hypercholesterolemie jako jeden z hlavních faktorů vzniku aterosklerózy je celá desetiletí v popředí lékařského výzkumu. Pro tento výzkum bylo důležité nalézt vhodný experimentální model. Hypercholesterolemie je snadno indukovatelná u zvířat jako jsou např. experimentální králíci a holubi. Laboratorní potkan, dosud nejvyužívanější experimentální zvířecí model spolu s myši, je však pro výzkum hypercholesterolemie nevhodný. Lze u něj indukovat hypercholesterolemii pouze toxickými dávkami thyroxinu či kyseliny cholové. Významným posunem ve výzkumu hypercholesterolemie a aterosklerózy

by bylo vyselektovat kmen laboratorního potkana vykazujícího zvýšenou hladinu cholesterolu.

V laboratoři pro výzkum aterosklerózy (LVA), IKEM pod vedením Prof. Poledne se roku 1975 začalo se selekcí laboratorního potkana vhodného pro výzkum hypercholesterolémie. Jako výchozí model byli použiti dospělí jedinci kmene Wistar. Těmto potkanům byla po 2 týdny podávána standardní laboratorní dieta s obsahem 2 % cholesterolu rozpuštěného v 5 % hovězím tuku. Hladina cholesterolu byla změřena před a po podání diety. Jako generace 0 bylo vybráno 8 samic a 4 samci s nejvyšší hladinou cholesterolu. U generace 1 bylo postupováno stejně. Po podání diety byli vybráni jedinci s nejvyšší hladinou cholesterolu a křížení bratr – sestra až po generaci 10 (viz graf 2.4.1).

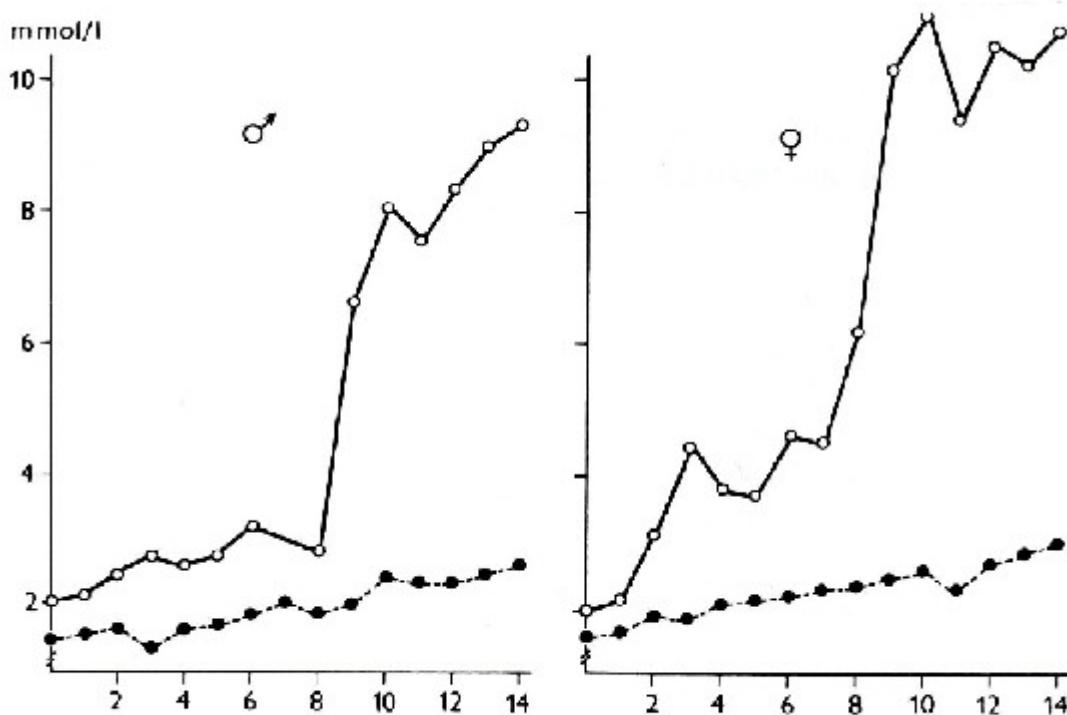


Fig.1. Basal ●--● and stimulated ○—○ cholesterolemia development

Graf 2.4.1 Selekcce potkanů PHHC z kmene Wistar

Stimulovaná cholesterolémie u generace 0 byla velmi nízká. U generace 3 již došlo k mírnému zvýšení hladiny u samců a větší u samic. K významné změně hladiny cholesterolu došlo u samic v generaci 8 a u samců v generaci 9. Mezi 7 až 9 generací došlo k dvojnásobnému nárůstu stimulované cholesterolémie. Cholesterolémie se stabilizovala na hladině 8 – 10 mmol/l. Basální cholesterolémie postupně narůstala až na dvojnásobné hodnoty v generaci 12 ve srovnání s hodnotami generace 0.

Zajímavé u PHHC potkanů je i rozložení jednotlivých lipoproteinových frakcí. U Wistar potkanů převažuje ze 70 % frakce HDL. Rozložení lipoproteinových frakcí u PHHC potkanů je velmi podobné rozložení lipoproteinů u lidí. U PHHC potkanů je nejvíce zastoupena frakce LDL částic, dále VLDL a teprve pak HDL částice. Lipoproteinové spektrum není však zcela známo.

Pro značně odlišné vlastnosti PHHC potkanů, vykazující hypercholesterolémii po podání dietního cholesterolu bez jiných stimulačních látek, věříme, že tento kmen je velmi vhodný pro výzkum hypercholesterolémie.

3. Cíle diplomové práce

Z přehledu literatury vyplývá, že PHHC potkani představují nové možnosti ve výzkumu hypercholesterolemie, která je jedním z hlavních rizikových faktorů pro vznik aterosklerózy. Dodnes není u PHHC potkanů plně objasněn metabolismus lipoproteinů.

A. V první části diplomové práce se budu zabývat složením lipoproteinů u PHHC potkanů, zejména charakteristikou nascentních VLDL částic u PHHC potkanů.

Dosud nebylo publikováno měření reverzního transportu cholesterolu *in vivo* na potkanech. Veškerá měření RTC jsou popsána na myších s komerčně dodávanými makrofágy.

B. Úkolem druhé části diplomové práce je zavést metodu pro měření reverzního transportu cholesterolu *in vivo* na PHHC potkanech bez použití komerčně dodávaných makrofágů.

4. Charakteristika nascentních VLDL částic

4.1. Materiál a metodika

4.1.1. Použitá zvířata

K experimentu bylo použito 18 samců potkanů kmene PHHC z vlastního chovu IKEM a jako kontrolní skupina 18 samců potkanů kmene Wistar dodaných firmou Anlab. Potkani vážili 350 - 400g a byli chováni v označených plastických nádobách po třech za standardních podmínek (20°C, 12 h světlo:12 h tma).

Potkani kmene Wistar a PHHC byli rozděleni do 3 skupin, kterým byly podávány 3 různé typy diet (tab. 2.1.1).

4.1.2. Materiál a chemikálie

4.1.2.1. Diety

Pro experiment byly připraveny 3 typy diet:

- standardní laboratorní dieta (chow)
- kontrolní tuková dieta – standardní dieta + 5 % palmový olej (HF)
- cholesterolová dieta – standardní dieta + 1 % cholesterol a 5 % palmový olej (HFHC)

skupina	Wistar	PHHC
1	chow	chow
2	HF	HF
3	HFHC	HFHC

Tab.2.1.1 Rozdělení potkanů Wistar a PHHC do skupin podle diet.

Zvířatům byly jednotlivé diety podávány po dobu 3 týdnů. Voda byla podávána *ad libitum*.

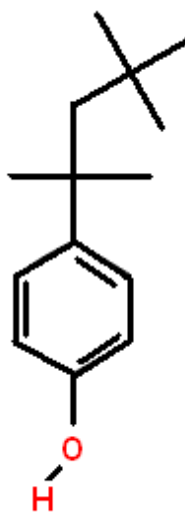
Cholesterolová dieta byla připravena rozpuštěním 1 % cholesterolu v 5 % palmovém oleji a tato směs byla přimíchána do standardní diety. Kontrolní tuková dieta byla zařazena k posouzení, jak 5 % palmový olej ovlivňuje lipidový metabolismus. Již z dřívějších pokusů prováděných na našem pracovišti při měření genové exprese u PHHC potkanů se ukázalo, že palmový olej v 5 % koncentraci v potravě nijak neovlivňuje genovou expresi u PHHC potkanů. Z tohoto důvodu jsme zvolili právě palmový olej. Standardní laboratorní dieta byla zvolena jako kontrolní.

4.1.2.2. Triton WR 1339

Triton WR 1339 neboli tyloxapol je 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) fenol polymer s formaldehydem a oxiranem (obr. 2.1.2.2). V klinické praxi se používá jako povrchově aktivní látka na rozpouštění a odstraňování bronchopulmonálních sekretů. Při *intraperitoneálním* (*i.p.*) nebo *intravenózním* (*i.v.*) funguje jako detergent, který na povrchu lipoproteinů inhibuje lipoproteinovou lipázu a tím zabraňuje utilizaci lipoproteinů bohatých na TG. Dochází tak k nárůstu cholesterolu a TG v cirkulaci.

Hyperlipidemický a hypercholesterolemický efekt Tritonu WR 1339 poprvé pozorovali Kellner, Correl a Ladd na králících. Následovaly další studie využívající účinek Tritonu WR 1339 na psech, opicích a v neposlední řadě na myších a potkanech (Abe, 2007; Yamamoto, 1984; Edelstein, 1985).

Po *i.v.* podání Tritonu WR 1339 dochází k lineárnímu nárůstu koncentrace TG a cholesterolu po dobu 3 h (Otway, 1966). Pro design našeho pokusu jsme následně zvolili dobu působení Tritonu WR 1339 na 2 hodiny. Práce Friedmana et al. (1952) se zabývá vhodným množstvím *i.v.* podané dávky Tritonu WR 1339 a následným rozvojem hypercholesterolemie. Jako vhodnou dávku pro jednorázové *i.v.* podání Tritonu WR 1339 jsme se rozhodli aplikovat 100 mg na jednoho potkana.



Obr. 4.1.2.2 Triton WR 1339 (tyloxapol).

4.1.2.3. Thiopental sodný

Thiopental sodný je krátkodobé barbiturátové nitrožilní anestetikum, které snadno přestupuje hematoencefalickou bariérou. Postrádá analgetický a relaxační účinek a má antikonvulzivní působení. Usínání je rychlé a klidné, probouzení postupné.

Thiopental sodný obvykle volíme při méně náročných zákrocích v maximální délce trvání 180 minut. Thiopental sodný je dodáván v práškové formě lyofilizované soli v balení 0,5 g. Před použitím se ředí 5 ml fyziologického roztoku. Podávaná dávka při *i.p.* podání činila 25 mg na 1 kg hmotnosti zvířete.

4.1.3. Provedení experimentu

Po 3 týdnech jsme potkanům v čase 0 odebrali vzorek venózní krve z ocasu (0,75 ml) do mikrozkušavek Eppendorf. Vzorek jsme ponechali 30 minut stát při laboratorní teplotě (20 °C) a poté jej odstředili na centrifuze Allegra X-12R firmy Beckman při 3500 otáčkách/min po dobu 15 minut při 4 °C. Získané sérum jsme použili pro stanovení hladin TG a celkového cholesterolu v séru v lipidové laboratoři. Lipidová laboratoř je součástí LVA IKEM, kde jsem se seznámila s postupy pro stanovení hladin všech lipidů. Hodnoty celkového cholesterolu a TG byly měřeny na autoanalyzátoru s použitím komerčních enzymatických kitů.

Následně jsem potkany uvedla do anestezie *i.p.* aplikací Thiopentalu sodného. Zvíře jsem zafixovala v poloze na zádech a zajistila průchodnost dýchacích cest. Za pomoci mikrochirurgických nástrojů jsem obnažila *venu juguláris*, do které jsem zavedla katetr. Po zajištění průchodnosti katetru jsem aplikovala 1 ml 10 % Tritonu WR 1339. Katetr jsem následně propláchla fyziologickým roztokem a vyjmula. Potkany jsem ponechala 2 hodiny na boku za kontroly průchodnosti dýchacích cest a hloubky anestezie. Po uplynutí 2 hodin jsme potkany usmrtili vykvrvením.

Krev získanou vykvrvením potkanů 2 hodiny po aplikaci Tritonu WR 1339 jsme také ponechali 30 minut stát při laboratorní teplotě (20 °C) a poté odstředili na centrifuze při 3500 otáčkách/min po dobu 15 minut při 4 °C. Vzorek ze získaného séra (0,3 ml) jsme předali lipidové laboratoři pro stanovení hladin TG a celkového cholesterolu. Zbylé sérum jsme použili pro izolaci VLDL částic ultracentrifugací na L7-55 ultracentrifuze od firmy Beckman.

Izolace VLDL částic ultracentrifugací:

Ultracentrifugace (UC) je metoda, za pomoci které separujeme jednotlivé lipoproteiny z krevního séra. Využíváme rozdílné hustoty, při které se jednotlivé lipoproteiny separují. Při UC se vzorek rozdělí na dvě frakce: horní frakci T (top) a dolní frakci B (bottom). Ultracentrifugací při hustotě 1,006 g/ml získáme v horní frakci T 06 VLDL částice a v dolní

frakci B 06 částice IDL, LDL, HDL a proteiny. Vezme-li frakci B 06 a upravíme hustotu na 1,019 g/ml, získáme ultracentrifugací v horní frakci T 19 částice IDL a v dolní frakci B 19 částice LDL, HDL a proteiny. Dalším postupem můžeme separovat i částice LDL a HDL, viz. tab. 4.1.3.

Hustotu upravujeme pomocí fyziologického roztoku ($\rho = 1,006 \text{ g.ml}^{-1}$) nebo roztoku KBr ($\rho = 1,3436 \text{ g.ml}^{-1}$).

Izolované LP	Hustota g.ml^{-1}	Frakce UC	Složení frakcí
VLDL	1.006	T 06	VLDL
		B 06	IDL, LDL, HDL, proteiny
IDL	1.019	T 19	IDL
		B 19	LDL, HDL, proteiny
LDL	1.063	T 63	LDL
		B 63	HDL, proteiny
HDL	1.210	T 210	HDL
		B 210	proteiny

Tab. 4.1.3 Separace lipoproteinů ultracentrifugací při rozdílných hustotách.

Částice VLDL jsme izolovali při hustotě $1,006 \text{ g.ml}^{-1}$. Do ultracentrifugačních zkumavek o objemu 6,5 ml jsme dali sérum ze 2 vzorků stejné skupiny potkanů, na zkumavky nasadili kovové kloboučky a injekční stříkačkou jsme převrstvili fyziologickým roztokem do celého objemu a zašroubovali. Poté jsme pečlivě zkontrolovali, zda ve zkumavce nezůstala žádná vzduchová bublina.

Vzorky jsme vložili do rotoru 50.4 a nechali separovat při 39 000 otáčkách/min po dobu 18 hodin při 8°C .

Po 18 hodinách jsme sesbírali jednotlivé frakce. Po prvním točení při hustotě $1,006 \text{ g.ml}^{-1}$ se VLDL částice nacházely v horní vrstvě zkumavky. Makroskopicky jsme mohli pozorovat v horní části zkumavky mléčné zakalení u kovového kloboučku. Pomocí nože jsme oddělili horní část zkumavky ve 2/3 a horní frakci jsme odsáli. V dolní části zkumavky nám zůstaly zbylé lipoproteiny (IDL, LDL, HDL) a proteiny.

4.1.4. Statistické hodnocení

Výsledky jsme statisticky zpracovali v programu MS Excel. Pro zjištění signifikance jsme použili dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylu. Hodnoty $P < 0.001$ jsme považovali za statisticky významné.

4.2. Výsledky

Během pokusu došlo k úhynu 2 zvířat po *i.p.* aplikaci Thiopentalu. Po první aplikaci anestetika potkani adekvátně nereagovali na podanou dávku a po opětovném podání došlo k úhynu. Dále došlo k úhynu 3 zvířat po *i.v.* podání Tritonu WR 1339 následkem výrazné dechové nedostatečnosti.

V tab. 4.2.1 a 4.2.2 jsou uvedeny jednotlivé hodnoty hladin celkového cholesterolu a TG v séru před a 2 hodiny po podání Tritonu WR 1339 u potkanů Wistar a PHHC v jednotlivých skupinách dle diety. Uhynulá zvířata jsou označena křížkem.

Vliv podání tyloxapolu na koncentraci cholesterolu a TG u potkanů Wistar

čas (min)	chol	chol	TG	TG
	0	120	0	120
W-C				
2	1,3	1,98	0,78	5,95
13	1,47	2,3	1,64	7,54
22	1,33	1,94	0,88	6,79
23	1,26	1,91	0,89	6,32
30	X	X	X	X
31	1,13	X	0,83	X
průměr	1,30	2,03	1,00	6,65
SD	0,12	0,18	0,36	0,69
W-HF				
5	1,45	2,14	1,2	6,7
6	1,75	2,43	0,69	7,57
14	1,37	2,08	0,74	7,11
15	1,42	1,81	0,5	7,51
34	2,08	2,22	0,78	5,3
35	1,66	2,21	1,34	8,4
průměr	1,62	2,15	0,88	7,10
SD	0,27	0,20	0,32	1,05
W-HFHC				
9	1,47	2,76	0,47	4,63
10	1,58	3,32	0,93	5,03
18	1,22	3,6	0,91	7,91
19	1,21	3,01	0,62	5,15
26	1,99	4,45	1,36	6,64
27	1,73	4,24	1,08	6,62
průměr	1,53	3,56	0,90	6,00
SD	0,30	0,67	0,32	1,26

Tab.4.2.1 Hladiny celkového cholesterolu a TG v séru v čase 0 a 2 hodiny po podání Tritonu WR 1339 u potkanů Wistar.

Vliv podání tyloxapolu na koncentraci cholesterolu a TG u potkanů PHHC

čas (min)	chol	chol	TG	TG
	0	120	0	120
PHHC-C				
3	2,25	2,84	0,78	7,62
4	2,05	3,04	1,04	9,42
24	2,52	3,04	0,84	7,92
25	2,17	2,86	1,00	8,01
32	1,97	2,65	0,77	7,11
33	2,22	X	0,80	X
průměr	2,20	2,89	0,87	8,02
SD	0,19	0,16	0,12	0,86
PHHC-HF				
7	2,53	3,46	0,85	8,40
16	2,81	3,32	1,38	9,12
17	2,24	2,99	0,71	8,97
36	2,64	3,24	1,04	7,44
37	2,11	X	1,28	X
38	X	X	X	X
průměr	2,47	3,25	1,05	8,48
SD	0,29	0,20	0,28	0,76
PHHC-HFHC				
11	2,77	5,91	0,99	4,33
12	2,98	6,97	1,22	6,55
20	3,36	8,92	1,39	8,10
21	3,96	9,25	1,03	7,01
28	2,98	8,15	1,08	7,73
29	3,32	8,05	1,15	7,45
průměr	3,23	7,88	1,14	6,86
SD	0,42	1,25	0,15	1,35

Tab.4.2.2 Hladiny celkového cholesterolu a TG v séru v čase 0 a 2 hodiny po podání Tritonu WR 1339 u potkanů PHHC.

Hodnoty hladin cholesterolu u potkanů Wistar v čase 0 min se na všech třech dietách průměrně pohybovaly kolem 1,5 mmol/l a hladiny TG byly kolem 0,9 mmol/l.

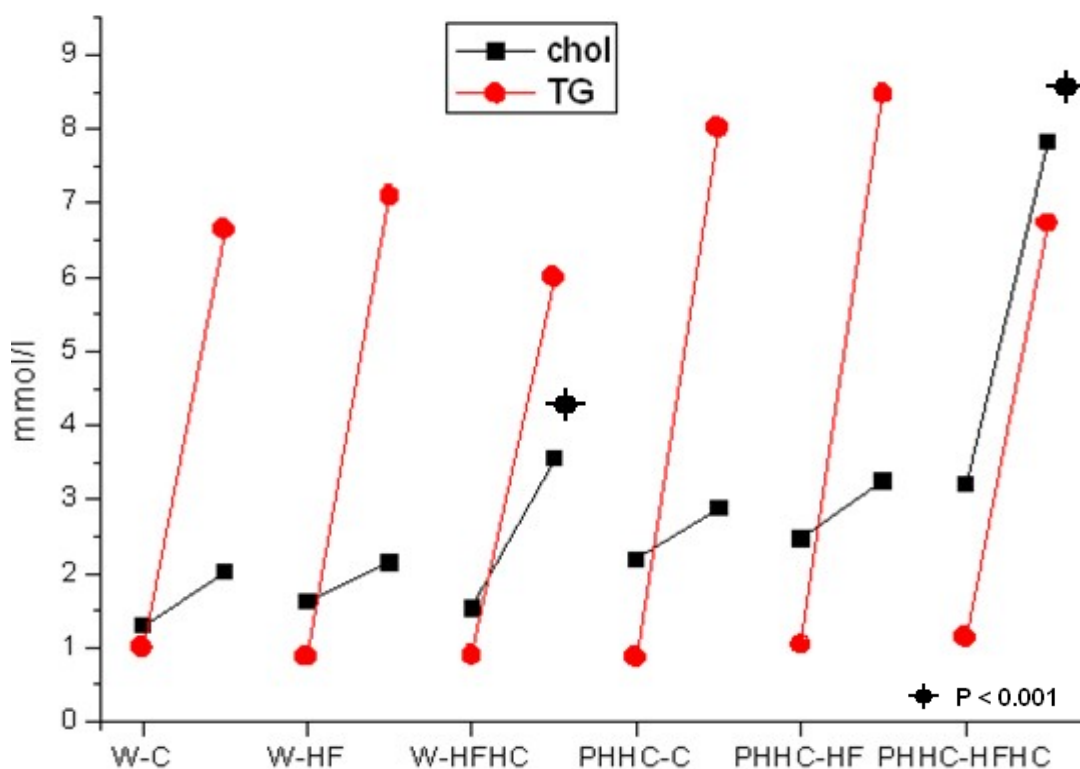
2 hodiny po podání Tritonu WR 1339 došlo u potkanů Wistar na standardní dietě (C) k nárůstu cholesterolu o 0,73 mmol/l a hladina TG stoupla o 5,65 mmol/l. U potkanů Wistar na kontrolní tukové dietě (HF) se hladina cholesterolu zvýšila o 0,53 mmol/l a hladina TG stoupla o 6,22 mmol/l. U potkanů Wistar na cholesterolové dietě (HFHC) došlo k většímu nárůstu hladiny cholesterolu oproti předchozím skupinám, a to o 2,03 mmol/l, hladina TG narostla o 5,1 mmol/l.

Hladiny cholesterolu v čase 0 min u potkanů PHHC na standardní (C) a kontrolní tukové dietě (HF) se pohybovaly kolem 2,34 mmol/l a hladina TG kolem 0,96 mmol/l. PHHC

potkaní na cholesterolové dietě (HFHC) měli vyšší průměrnou hladinu cholesterolu 3,23 mmol/l a průměrná hladina TG byla 1,14 mmol/l.

U potkanů PHHC 2 hodiny po podání Tritonu WR 1339 na standardní dietě (C) došlo k nárůstu cholesterolu o 0,69 mmol/l a hladina TG stoupla o 7,15 mmol/l. U potkanů PHHC na kontrolní tukové dietě (HF) se hladina cholesterolu zvýšila o 0,78 mmol/l a hladina TG stoupla o 7,43 mmol/l. U potkanů PHHC na cholesterolové dietě (HFHC) došlo k významnému nárůstu hladiny cholesterolu, a to o 4,65 mmol/l, hladina TG narostla o 5,72 mmol/l.

V grafu 4.2.1 je vynesena nárůst průměrných koncentrací hladin celkového cholesterolu a TG v séru u potkanů Wistar a PHHC po podání Tritonu WR 1339.



Graf 4.2.1 Nárůst koncentrace cholesterolu a TG v séru 2 hodiny po podání Tritonu WR 1339.

Nárůst hladiny cholesterolu v séru u potkanů Wistar a PHHC na cholesterolové dietě (HFHC) byl oproti nárůstu cholesterolu u potkanů Wistar a PHHC na standardní (C) a kontrolní tukové (HF) dietě statisticky významný ($P < 0,001$). Rozdíl mezi skupinou potkanů Wistar a PHHC na cholesterolové dietě (HFHC) byl také statisticky významný ($P < 0,001$).

Změny hladin TG nebyly mezi skupinami statisticky významné ($P > 0,001$).

Hodnoty cholesterolu, TG a jejich poměr u potkanů Wistar a PHHC jsou uvedeny v tab. 4.2.3.

	VLDL-C	VLDL-TG	V_C/TG
W-C			
A	1,27	6,04	0,210
K	1,20	6,62	0,181
průměr	1,24	6,33	0,196
SD	0,05	0,41	0,021
W-HF			
C	1,21	6,36	0,190
G	1,05	7,00	0,150
Q	1,25	7,02	0,178
průměr	1,17	6,79	0,173
SD	0,11	0,38	0,021
W-HFHC			
E	2,04	4,24	0,481
I	2,55	6,54	0,390
M	3,35	6,47	0,518
průměr	2,65	5,75	0,463
SD	0,66	1,31	0,066
PHHC-C			
B	1,63	8,56	0,190
L	1,52	7,08	0,215
průměr	1,58	7,82	0,203
SD	0,08	1,05	0,017
PHHC-HF			
D	1,54	8,35	0,184
H	1,66	9,26	0,179
R	1,50	6,80	0,221
průměr	1,57	8,14	0,195
SD	0,08	1,24	0,023
PHHC-HFHC			
F	4,70	4,97	0,946
J	7,43	8,06	0,922
N	6,03	7,16	0,842
průměr	6,05	6,73	0,903
SD	1,37	1,59	0,054

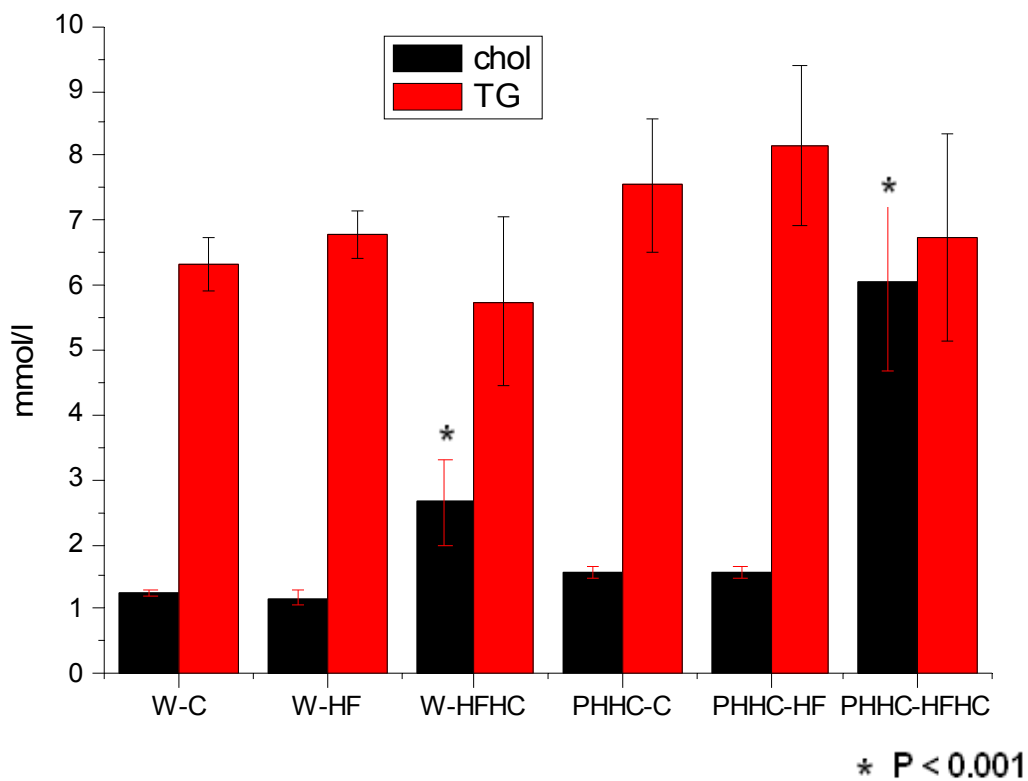
Tab. 4.2.3 Hodnoty koncentrace cholesterolu, TG a jejich poměr ve VLDL částicích u potkanů Wistar a PHHC.

VLDL částice u potkanů Wistar na standardní dietě (C) 2 hodiny po podání Tritonu WR 1339 obsahovaly $1,24 \pm 0,05$ mmol/l cholesterolu a $6,33 \pm 0,41$ mmol/l TG. Na kontrolní tukové dietě (HF) obsahovaly $1,17 \pm 0,11$ mmol/l cholesterolu a $6,79 \pm 0,38$ mmol/l TG. Na cholesterolové dietě (HFHC) obsahovaly větší množství cholesterolu, a to $2,65 \pm 0,66$ mmol/l a $5,75 \pm 1,31$ mmol/l TG.

Složení VLDL částic u potkanů PHHC bylo následující: na standardní dietě (C) VLDL částice obsahovaly $1,58 \pm 0,08$ mmol/l cholesterolu a $7,82 \pm 1,05$ mmol/l TG. Na kontrolní tukové dietě (HF) se VLDL částice skládaly z $1,57 \pm 0,08$ mmol/l cholesterolu a

8,14 ± 1,24 mmol/l TG. Na cholesterolové dietě (HFHC) obsahovaly VLDL částice vysoké množství 6,05 ± 1,37 mmol/l cholesterolu a 6,73 ± 1,59 mmol/l TG.

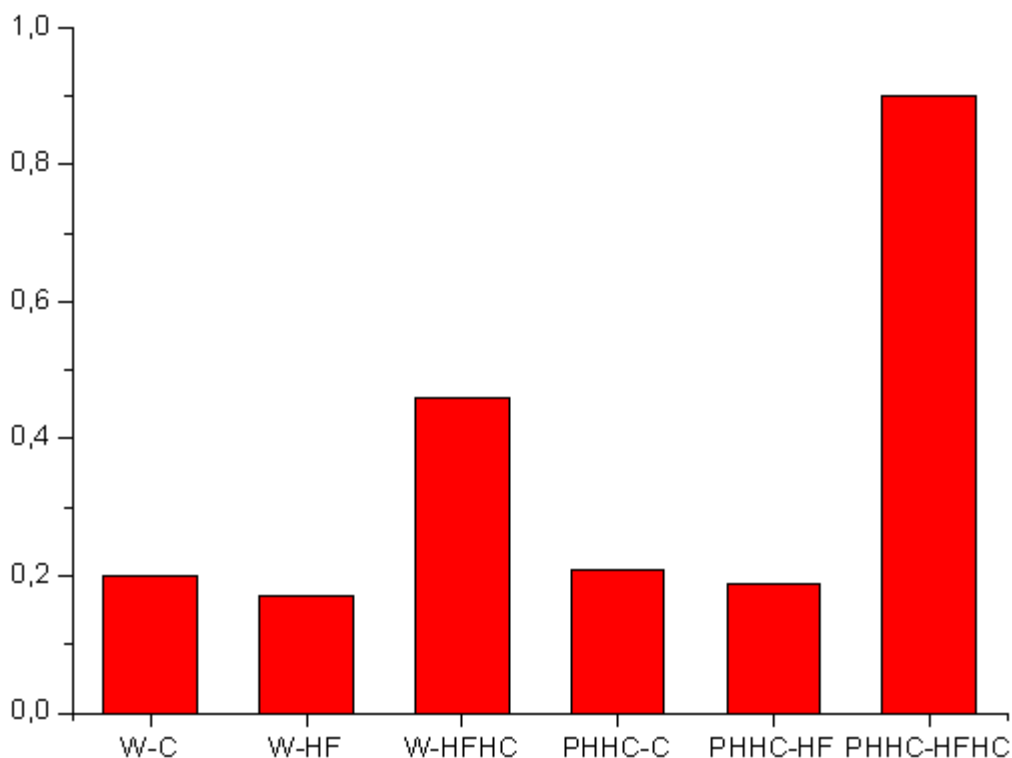
Složení VLDL částic u potkanů Wistar a PHHC 2 hodiny po podání Tritonu WR 1339 je znázorněno na grafu 4.2.2.



Graf 4.2.2 Složení VLDL částic u potkanů Wistar a PHHC.

Ve složení VLDL částic se potkani Wistar a PHHC na standardní (C) a kontrolní tukové (HF) dietě mezi sebou statisticky nelišili. U potkanů Wistar na cholesterolové dietě (HFHC) došlo ke statisticky významnému nárůstu cholesterolu ($P < 0,001$), stejně tak i u potkanů PHHC na cholesterolové dietě (HFHC).

Poměr VLDL-cholesterol/VLDL-TG u potkanů Wistar a PHHC je znázorněn na grafu 2.2.3.



Graf 4.2.3 Poměr VLDL-cholesterol/VLDL-TG ve VLDL částicích u potkanů Wistar a PHHC.

4.3. Diskuse

V první části diplomové práce bylo cílem objasnit složení lipoproteinů u PHHC potkanů. Zaměřila jsem se na charakteristiku nascentních VLDL částic u PHHC potkanů.

Potvrdili jsme, že podávání rozdílných typů diet u potkanů Wistar nemá žádný efekt na změny hladin cholesterolu a TG. Po *i.v.* podání Tritonu WR 1339 nedošlo k téměř žádnému nárůstu hladin cholesterolu v séru u potkanů Wistar na standardní (C) a kontrolní tukové dietě (HF) a u potkanů na cholesterolové dietě (HFHC) došlo pouze k mírnému nárůstu cholesterolémie. Hladina TG v séru několikanásobně vzrostla následkem akumulace VLDL částic v cirkulaci ve všech 3 skupinách.

U potkanů PHHC na standardní (C) a kontrolní tukové dietě (HF) stejně jako u potkanů Wistar nedošlo k téměř žádnému nárůstu hladin cholesterolu. U potkanů na cholesterolové dietě (HFHC) bylo prokázáno, že podávání 1 % cholesterolu v dietě po dobu 3 týdnů vede k nárůstu cholesterolémie o 45 %, což odpovídá výsledkům z dřívějších experimentů u samců

PHHC potkanů. Data změřená na našem pracovišti LVA IKEM již dříve ukázala, že podávání 2 % cholesterolu v dietě po dobu 2 týdnů způsobí nárůst hladiny cholesterolu v séru až o 150 – 200 %. Hladina TG v séru vzrostla stejně jako u potkanů Wistar několikanásobně následkem akumulace VLDL částic po zablokování jejich utilizace.

Podávání rozdílných typů diet ukázalo, že hladina TG je na dietě nezávislá, zatímco hladina cholesterolu je závislá nejen na dietě, ale i na genetické výbavě potkana.

Složení VLDL částic u potkanů Wistar na standardní dietě (C) a kontrolní tukové dietě (HF) odpovídalo ostatním studiím (Agren, 2002; Guettet, 1991). Poměr VLDL-cholesterol/VLDL-TG byl $0,18 \pm 0,02$. Stejných výsledků jsme dosáhli i u potkanů PHHC na standardní (C) a kontrolní tukové dietě (HF). Poměr VLDL-cholesterol/VLDL-TG byl $0,2 \pm 0,01$.

Ve složení VLDL částic u potkanů Wistar na cholesterolové dietě (HFHC) došlo k mírnému nárůstu cholesterolu. Poměr VLDL-cholesterol/VLDL-TG vzrostl na $0,46 \pm 0,07$. Toto složení VLDL částic je velmi podobné lidským VLDL částicím. U potkanů PHHC na cholesterolové dietě (HFHC) došlo k velmi razantní změně ve složení VLDL částic. Poměr VLDL-cholesterol/VLDL-TG vzrostl až na $0,90 \pm 0,05$.

Tyto hodnoty ukazují, že zvýšený přísun dietního cholesterolu do jater vede k jeho přesunu do VLDL částic. Tento proces je akcentován u PHHC potkanů. Změna složení VLDL částic u potkanů PHHC na cholesterolové dietě (HFHC) velmi pravděpodobně vede ke snížení schopnosti těchto částic se normálně metabolizovat v cirkulaci, jak se ukázalo v dosud nepublikovaných experimentech s částicemi IDL (Kovář, IKEM). To může být jeden z důvodů zvýšené, jak basální, tak i dietním cholesterolem indukované cholesterolémie.

Výsledky pokusu Charakteristika nascentních VLDL částic u PHHC potkanů byly prezentovány formou posteru 11. - 13. 12. 2008 na XII. Kongresu o ateroskleróze ve Špindlerově Mlýně.

5. Reverzní transport cholesterolu stanovený in vivo

5.1. Materiál a metodika

5.1.1. Zvířata

Pro experiment jsem použila 4 potkany kmene Wistar dodaných firmou Anlab. Jednalo se o samice ve věku 22 dnů o hmotnosti cca 82 g. Dále jsem zvolila 2 potkany kmene PHHC, samice ve věku 32 dnů o hmotnosti 118 a 125 g. Pro získání buněčné kultury makrofágů byli použiti 4 potkani, dospělí jedinci (samice) kmene Wistar a 2 dospělí jedinci (samice) kmene PHHC. Potkani byli chováni v označených plastických nádobách po třech, za standardních podmínek chovu (20 °C, 12 h světlo:12 h tma).

5.1.2. Chemikálie a přístroje

5.1.2.1. Thioglykolát

Thioglykolát je fluidní médium používané pro sterilní testování antibiotik, biologických látek a pro kultivaci aerobních a anaerobních organismů. Thioglykolát byl dodán firmou Sigma ve formě prášku. Pro přípravu fluidního média byl zvolen následující doporučený postup od dodavatele.

Prášek jsem za stálého míchání rozpustila v destilované vodě. Pro dokonalé rozpuštění jsem destilovanou vodu přivedla k varu. Vzniklý roztok byl ponechán 2 hodiny při pokojové teplotě, během kterých se výrazně růžově zbarvil. Ochlazený roztok jsem následně sterilovala po dobu 15 minut při 121 °C v autoklávu. Po vychladnutí jsem v horní části lahve pozorovala velmi tenký proužek růžového zbarvení, jinak byl roztok slámově žlutý. Dle pokynů výrobce byl takto zbarvený Thioglykolát již připravený k použití. V případě, že by růžové zbarvení v horní části lahve dosahovalo více jak jedné třetiny, bylo by nutné roztok ještě jednou vysterilovat či nechat projít varem.

S takto připraveným Thioglykolátem jsem dále zacházela jako se sterilní tekutinou pro buněčné kultury.

5.1.2.2. Médium pro primární kulturu makrofágů

V mnoha vědeckých pracích se pro pěstování průmyslově dodávaných buněčných kultur makrofágů používá jak DMEM (Wang, 2007), tak i RPMI médium (Tanigawa, 2007). Po poradě s RNDr. Terezou Tlapákovou, Ph.D. z PřF UK Praha, která se zabývá primárními

kulturami nejen makrofágů, jsem se rozhodla použít RPMI 1640 médium. Médium jsem obohatila o 10 % FCS (fetal calf serum), 2 mM L-glutaminu a 0,5 % Gentamicinu.

Pro oplach buněčné kultury jsem použila PBS (Phosphate buffered saline).

Pro disagregaci přisedlých makrofágů jsem použila roztok EDTA. EDTA je chelatační činidlo, které váže ionty vápníku, což vede k narušení vazby adhezivních buněčných molekul k povrchu.

Vše dodala firma Sigma.

5.1.2.3. Izotop

^3H cholesterol je molekula značená na pozici 4. Byl dodán firmou Sigma rozpuštěný v ethanolu.

5.1.2.4. Přístroje

Laminární box: Práce s primárními buněčnými kulturami byla prováděná v laminárním boxu S@fe flow 1.2 od firmy Bioair, zajišťující sterilní práci s buněčným materiálem. Ventilace zajišťuje recirkulaci proudu vzduchu přes HEPA filtr.

Cell counter: Pro stanovení počtu buněk jsem používala cell counter VI-CELL XR od firmy Beckman. VI-CELL XR cell counter umožňuje přesné měření velikosti, počtu a životaschopnosti buněk.

Analyzátor kapalně scintilace Tricarb 2900 TR: Analyzátor kapalně scintilace Tricarb 2900 TR měří hladinu radioaktivních látek pomocí emise fotonů vznikajících při průchodu alfa či beta částic scintilační tekutinou.

5.2. Provedení experimentu 1

U potkanů Wistar jsem indukovala aseptický intraperitoneální zánět pomocí Thioglykolátu. Místo vpichu jsem ošetřila dezinfekcí a následně *i.p.* aplikovala 2 ml 10 % roztoku Thioglykolátu. Potkany jsem ponechala následující 3 dny za standardních podmínek chovu. Během této doby došlo k nárůstu koncentrace makrofágů vlivem vznikajícího zánětu.

Po 3 dnech jsem zvířata usmrtila dekapitací a následně provedla intraperitoneální laváž za účelem získání kultury makrofágů. Laváž probíhala při maximálním dodržení sterilních postupů. Pro intraperitoneální laváž jsem použila 0,15 M NaCl. Získaný výplach z peritoneální dutiny jsem stočila při 3500 otáčkách/min, 25 °C po dobu 2 minut na centrifuze Allegra X-12R od firmy Beckman. Supernatant jsem odsála a sediment obsahující makrofágy, epiteliální buňky, krevní elementy a další nečistoty jsem resuspendovala v médiu

(RPMI, FCS, L-G, Gentamicin) ohřátém ve vodní lázni na 37 °C. Resuspendované médium jsem rozdělila do kultivačních lahví (4x pro potkany Wistar). Vzorek buněčné kultury jsem ponechala pro stanovení počtu životaschopných buněk na cell countru VI-CELL XR. Kultivační lahve jsem ponechala 2 hodiny v inkubátoru (37 °C). Během této doby došlo k pevnému přisednutí makrofágů.

Po 2 hodinách jsem odsála médium a přisednuté makrofágy 3x opláchla 5 ml roztoku PBS. Odstranila jsem tak případné nečistoty. Následně jsem k makrofágům přidala 5 ml nového média (RPMI, FCS, L-G, Gentamicin).

K připravené primární buněčné kultuře makrofágů jsem přidala značený cholesterol. Použila jsem již zavedenou metodu značení, kterou na našem pracovišti využíváme při měření RTC *in vitro*. Množství přidaného ³H cholesterolu odpovídalo 2,5 μCi/ml média. Takto označené makrofágy jsem inkubovala 48 hodin při 37 °C. Během této doby byl značený cholesterol využíván makrofágy.

Po uplynutí 48 hodin jsem odsála značené médium a zbylé značení 3x opláchla 5 ml chladného roztoku PBS. Pro disagregaci buněk jsem použila roztok EDTA. Na jednu kultivační láhev jsem použila 800 μL 10 mM roztoku EDTA. Po 20 minutách působení při 4 °C jsem dokončila disagregaci pomocí mechanické škrabky. K vzniklému homogenátu jsem přidala 800 μL média (RPMI, FCS, L-G, Gentamicin). Odebrala jsem vzorek homogenátu (100 μL) pro stanovení radioaktivity.

Potkanům Wistar jsem *i.p.* aplikovala 1,5 ml homogenátu, který obsahoval makrofágy označené ³H cholesterolem.

Samice potkanů Wistar jsem ponechala jednotlivě v plastických boxech umístěných v místnosti pro pokusy s radioaktivními látkami na zvířatech.

Po 24 a 48 hodinách jsem potkanům odebrala 0,3 ml krve z ocasu a sesbírala stolici vyloučenou za 0-24 h a 24-48 h. Krev jsem stočila při 3500 otáčkách/minutu, 4 °C po dobu 15 minut na centrifuze Allegra X-12R. Získané sérum jsem přendala do scintilačních lahví a po přidání scintilačního roztoku jsem ponechala 2 hodiny stát a následně změřila radioaktivitu na analyzátoru kapalně scintilace Tricarb 2900 TR. Hodnoty jsem měřila v jednotkách cpm.

Ze stolice jsem extrahovala lipidy pomocí Folchovy metody:

Směs chloroform – metanol v objemovém poměru 2:1 jsem postupně přidávala k homogenizované stolici až k 20-násobnému nadbytku rozpouštědla. Homogenizovanou směs jsem ponechala 6 hodin stát a poté převrstvila 6 ml 2 % Na₃PO₄. Směs jsem ponechala stát přes noc. Druhý den jsem odebrala spodní chloroformovou fázi, ve které se nacházel získaný lipidový extrakt. Ten jsem přendala do scintilačních lahví, přidala scintilační tekutinu,

ponechala 2 hodiny stát a následně změřila radioaktivitu na analyzátoru kapalné scintilace Tricarb 2900 TR. Hodnoty jsem měřila v jednotkách cpm.

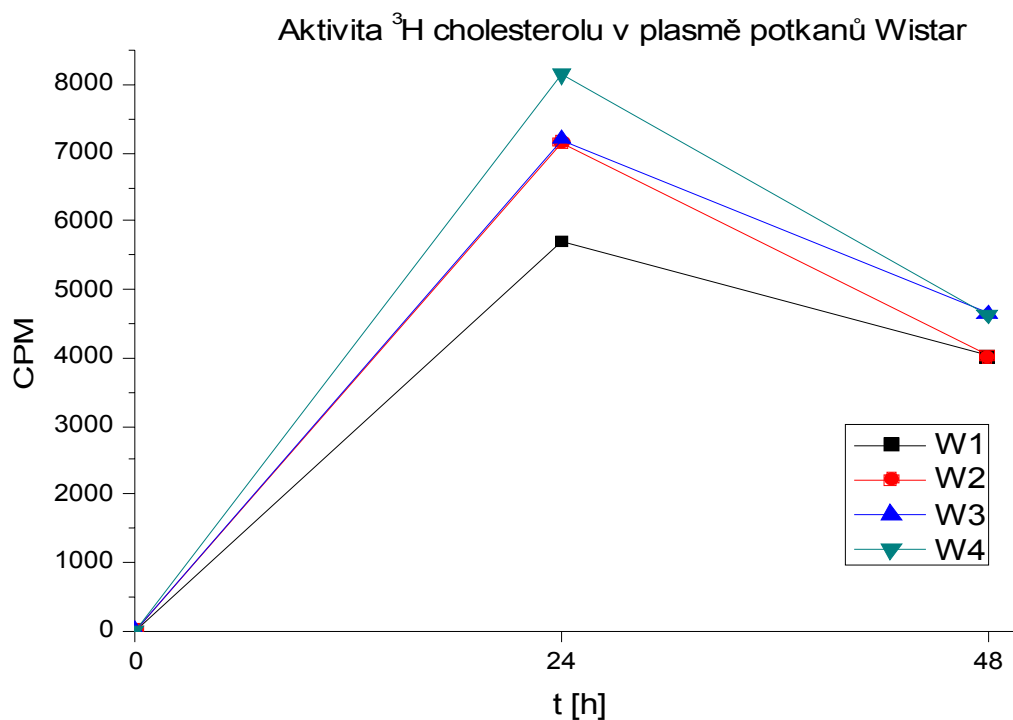
5.3. Výsledky 1

V tab. 3.2.1 jsou uvedeny hmotnosti jednotlivých zvířat (m), hodnoty celkových aktivit aplikovaných *i.p.*, počet buněk, hodnoty radioaktivit změřených v plasmě po 24 a 48 h a celková aktivita ve stolici za 0-24 h a 24-48 h.

<i>Potkani Wistar - samice</i>	<i>1</i> <i>m= 82g</i>	<i>2</i> <i>m=85g</i>	<i>3</i> <i>m=86g</i>	<i>4</i> <i>m=72g</i>	<i>průměrné</i> <i>hodnoty ± SD</i>
celková aktivita aplikovaná <i>i.p.</i> (cpm)	742×10^3	762×10^3	826×10^3	736×10^3	$766 \times 10^3 \pm 41 \times 10^3$
počet buněk	$0,30 \times 10^6$	$0,30 \times 10^6$	$0,30 \times 10^6$	$0,30 \times 10^6$	$0,30 \times 10^6 \pm 0$
cpm / ml plasmy po 24 h	5700	7150	7200	8150	7050 ± 1011
cpm / ml plasmy po 48 h	4020	4020	4640	4620	4325 ± 352
celková aktivita ve stolici 0-24h (cpm)	1710	1650	1780	1850	1748 ± 87
celková aktivita ve stolici 24-48h (cpm)	1700	1680	1620	1810	1703 ± 79

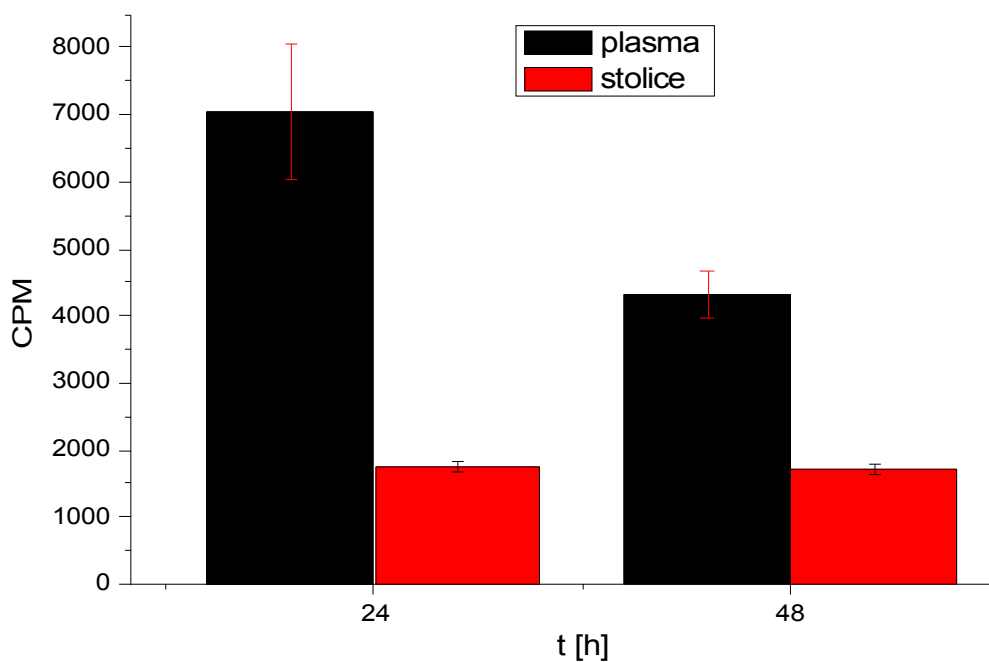
Tab. 3.2.1 Naměřené hodnoty RTC u potkanů Wistar.

V grafu 3.2.1 jsou vyneseny hodnoty radioaktivity v séru jednotlivých potkanů Wistar po 24 a 48 h.



Graf 3.2.1 Radioaktivita v séru potkanů po 24 h a 48 h.

V grafu 3.2.2 je znázorněna aktivita ^3H cholesterolu v séru a ve stolici po 24 a 48 h.



Graf 3.2.2 Radioaktivita v séru a ve stolici po 24 a 48 h.

5.4. Diskuse 1

Ve druhé části diplomové práce jsem se zabývala měřením reverzního transportu cholesterolu *in vivo* na potkanech Wistar.

Dosud nebyla publikována práce, která by se zabývala měřením RTC *in vivo* na potkanech. Všechny práce při měření RTC *in vivo* používaly zvířecí model – laboratorní myš. Jedním z hlavních důvodů byla zřejmě tělesná hmotnost, protože měření RTC spočívá v aplikaci značeného cholesterolu do makrofágů v takovém množství, aby po aplikaci do zvířete byl značený cholesterol uvolňovaný z makrofágů detekovatelný v plasmě a stolicí. Ve většině publikací také pracovali s komerčně dodávanými makrofágy J 774 (Zhang, 2003).

V pokusu jsem získala primární buněčnou kulturu makrofágů peritoneální laváží po předchozí indukci aseptického peritoneálního zánětu Thioglykolátem. Data získaná na cell countru VI-CELL XR ukázala, že peritoneální laváží jsem získala dostatečné množství buněk, jejichž životaschopnost byla průměrně 73 %.

Pro měření RTC na potkanech Wistar jsem zvolila zvířata s nižší tělesnou hmotností. Jednalo se o mláďata ve věku 22 dnů. Získané výsledky ukazují, že množství značeného cholesterolu, který se uvolňoval z makrofágů byl u potkanů Wistar detekovatelný.

U potkanů Wistar jsem naměřila po 24 hodinách vyšší hodnoty značeného cholesterolu v plasmě než po 48 hodinách. Dochází tedy k rychlejšímu uvolňování značeného cholesterolu z makrofágů v prvních 24 hodinách. Výlev pak postupně klesá.

Množství vyloučeného cholesterolu stolicí u potkanů Wistar je v době 0-24 h a 24-48 h přibližně stejné.

5.5. Provedení experimentu 2

V řadě publikovaných prací (Zhang, 2003; Naik, 2006; Wang, 2007) přidávali při značení makrofágů modifikované LDL částice ke zvýšení utilizace ³H cholesterolu makrofágy v průběhu značení. Při měření reverzního transportu cholesterolu na PHHC potkanech jsem se rozhodla porovnat přidání modifikovaných LDL částic k makrofágům oproti přidání pouze značeného ³H cholesterolu do média.

Příprava LDL částic:

Lidskou krev získanou od dobrovolných dárců jsem ponechala 30 minut stát a následně stočila při 3500 otáčkách/minutu, 4 °C po dobu 15 minut na centrifuze Allegra X-12R. Ze získaného séra jsem pomocí ultracentrifugace (viz kap. 4.1.3.) odseparovala VLDL částice, které se nacházely po prvním točení při $\rho=1,006$ g/ml v horní části ultracentrifugační zkumavky. Dolní frakci UC jsem přemístila do nových ultracentrifugačních zkumavek,

hustotu upravila pomocí KBr na 1,063 g/ml a nechala 24 hodin točit v ultracentrifuze při rychlosti 39 000 otáček/min a teplotě 8 °C. LDL částice se nacházely v horní frakci UC, kterou jsem sesbírala a uschovala po dobu 4 dnů v chladničce (4 °C). Vzorek horní frakce UC jsem odeslala do lipidové laboratoře pro stanovení množství LDL částic.

Během procesu ultracentrifugace, kdy jsem upravovala hustotu pomocí KBr a následně uskladnila LDL částice v chladničce, došlo k jejich modifikaci. LDL částice jsou tak snadněji oxidovatelné (Hallberg, 1994). Takto modifikované LDL částice jsem přidala společně se značeným cholesterolem k médiu druhého vzorku při značení makrofágů u PHHC potkanů.

Postup při získávání primární buněčné kultury u PHHC potkanů byl stejný jako u potkanů Wistar. U PHHC potkanů jsem přidala 10 µCi/ml ³H cholesterolu do média při značení prvního vzorku, 20 µCi/ml ³H cholesterolu a 60 µg/ml modifikovaných LDL částic k druhému vzorku. Stejně jako u potkanů Wistar jsem inkubovala buněčnou kulturu 48 hodin. Poté disgregovala a *i.p.* aplikovala samicím potkanů PHHC.

Odběr a měření aktivit v plasmě a stolici se nijak nelišilo od potkanů Wistar.

5.6. Výsledky 2

V tab. 3.3.1 jsou uvedeny hmotnosti jednotlivých zvířat (m), hodnoty celkových aktivit aplikovaných *i.p.*, počet buněk a množství přidaných LDL částic, hodnoty radioaktivit změřených v plasmě po 24 a 48 h a celková aktivita ve stolici za 0-24 h a 24-48 h.

	1 m=118g	2 m=125g
celková aktivita aplikovaná <i>i.p.</i> (cpm)	$10,5 \times 10^6$	$19,2 \times 10^6$
počet buněk	15×10^6	30×10^6
LDL na 1 ml média	0	60 μ g/ml
cpm/ml plasma po 24 h	$61,1 \times 10^3$	$101,3 \times 10^3$
cpm/ml plasma po 48 h	47×10^3	$68,5 \times 10^3$
aktivita ve stolici 0 - 24h (cpm)	25×10^3	$21,9 \times 10^3$
aktivita ve stolici 24 - 48h (cpm)	$17,2 \times 10^3$	$23,3 \times 10^3$

Tab. 3.3.1 RTC *in vivo* měřený na PHHC potkanech.

5.7. Diskuse 2

U potkanů PHHC, kterým jsem *i.p.* aplikovala vyšší množství značených makrofágů, jsem po 24 h naměřila dostatečně vysokou hladinu aktivity značeného cholesterolu v séru a po 48 h jsem již zaznamenala pokles aktivity jako u potkanů Wistar. Množství vyloučeného cholesterolu stolicí u prvního potkana bylo v době 0-24 h nižší než v době 24-48 h, zatímco u druhého potkana se druhý den vyloučilo stolicí větší množství značeného cholesterolu. Tyto rozdílné hodnoty jsou zřejmě dány individuálním metabolismem jednotlivých zvířat a také tím, že tento pilotní pokus jsem prováděla na velmi malém vzorku zvířat, který nelze statisticky hodnotit.

Vliv modifikovaných LDL částic přidaných do média u druhého potkana PHHC jsem nezaznamenala. Při značení primární buněčné kultury makrofágů nedošlo ke změně utilizace ^3H cholesterolu makrofágy.

6. Závěr

Prvním cílem diplomové práce bylo objasnit složení lipoproteinů u PHHC potkanů se zaměřením na charakteristiku nascentní VLDL částic.

6A. U PHHC potkanů na cholesterolové dietě vstupují do cirkulace nascentní VLDL částice výrazně obohacené cholesterolem. Rozdíl ve složení VLDL částic zřejmě vede ke snížení možnosti utilizace a dochází tak k jejich hromadění v cirkulaci.

Druhým cílem diplomové práce bylo zavést metodu pro měření reverzního transportu cholesterolu *in vivo* u potkanů PHHC.

6B. Podařilo se mi zavést metodu pro měření reverzního transportu cholesterolu *in vivo* na potkanech bez použití komerčně dodávaných makrofágů. V séru zvířat bylo průměrně 5 % z podané aktivity. Vyloučený ³H cholesterol byl v dostatečné míře detekovatelný ve stolici.

7. Seznam použité literatury

Abe C, Ikeda S, Uchida T, Yamashita K, Ichikawa T. (2007), Triton WR1339, an inhibitor of lipoprotein lipase, decreases vitamin E concentration in some tissues of rats by inhibiting its transport to liver: *J Nutr.*; 137(2):345-50.

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. (1996), Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor: *Science.*; 271(5248):518-20.

Agren JJ, Ravandi A, Kuksis A, Steiner G. (2002), Structural and compositional changes in very low density lipoprotein triacylglycerols during basal lipolysis: *Eur J Biochem.*; 269(24):6223-32.

Albers JJ, Marcovina SM.(1989), Standardization of apolipoprotein B and A-I measurements: *Clin Chem.*; 35(7):1357-61. Review

Banaszak L, Sharrock W, Timmins P. (1991), Structure and function of a lipoprotein: lipovitellin: *Annu Rev Biophys Biophys Chem.*; 20:221-46. Review.

Berti J.A., de Faria E.C., Oliveira H.C.F. (2005), Atherosclerosis in aged mice over-expressing the reverse cholesterol transport genes. *Brazilian journal of Medical and Biological research*; 38: 391-398

Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Ozcürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. (1999), The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease: *Nat Genet.*; 22(4):347-51.

Breslow JL, Ross D, McPherson J, Williams H, Kurnit D, Nussbaum AL, Karathanasis SK, Zannis VI. (1982), Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I: *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 79(22):6861-5.

Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR. (1999), Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency: *Nat Genet.*; 22(4):336-45.

Brown DA, London E. (2000), Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts: *J Biol Chem.*; 275(23):17221-4. Review.

Bülow J, Simonsen L, Wiggins D, Humphreys SM, Frayn KN, Powell D, Gibbons GF. (1999), Co-ordination of hepatic and adipose tissue lipid metabolism after oral glucose: *J Lipid Res.*;40(11):2034-43.

Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A. (2006), Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1: *Biochim Biophys Acta.*; 1761(7):655-66. Review.

Cooper AD. (1997), Hepatic uptake of chylomicron remnants: *J Lipid Res.*; 38(11):2173-92. Review.

Edelstein C, Byrne RE, Yamamoto K, Zarins C, Scanu AM. (1985), Plasma lipoprotein changes attending the intravenous administration of Triton WR-1339 in normolipidemic dogs: preferential effect on high density lipoproteins: *J Lipid Res.*; 26(3):351-9.

Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. (2002), Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review: *Am J Epidemiol.*; 155(6):487-95. Review.

Fielding CJ, Fielding PE. (1995), Molecular physiology of reverse cholesterol transport: *J Lipid Res.*; 36(2):211-28.

Forte TM, Goth-Goldstein R, Nordhausen RW, McCall MR. (1993), Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles: *J Lipid Res.*; 34(2):317-24.

Frank PG, Marcel YL. (2000), Apolipoprotein A-I: structure-function relationships: *J Lipid Res.*; 41(6):853-72. Review.

Frayn KN, Coppack SW, Potts JL. (1992), Effect of diet on human adipose tissue metabolism: *Proc Nutr Soc.*; 51(3):409-18.

Friedman M, Byers SO. (1953), The mechanism responsible for the hypercholesteremia induced by triton WR-1339: *J Exp Med.*; 97(1):117-30.

Funke H. (1997), Genetic determinants of high density lipoprotein levels: *Curr Opin Lipidol.*; 8(3):189-96. Review.

Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. (1998), Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity: *J Lipid Res.*; 39(6):1263-73.

Galeano NF, Milne R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngu'yen TD, Gleeson A, Arad Y, Witte L, al-Haideri M, et al. (1994), Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size: *J Biol Chem.*; 269(1):511-9.

Ghosh S. (2000), Cholesteryl ester hydrolase in human monocyte/macrophage: cloning, sequencing, and expression of full-length cDNA: *Physiol Genomics.*; 2(1):1-8.

Glass CK, Pittman RC, Keller GA, Steinberg D. (1983), Tissue sites of degradation of apoprotein A-I in the rat: *J Biol Chem.*; 258(11):7161-7.

Guettet C, Rostaqui N, Navarro N, Lecuyer B, Mathe D. (1991), Effect of chronic glucagon administration on the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins in rats fed a high sucrose diet: *J Nutr.*; 121(1):24-30.

Hallberg, C., M. Hidbn, M. Bergtriiim, G. Hmron, K. Pettemon, C. Werterlund, G. Bondjers, A-M. Oltlund-Lindqvirt, and G. Camejo. (1994), Lipoprotein fractionation in deuterium oxide gradients: a procedure for evaluation of antioxidant binding and susceptibility to oxidation: *J Lipid Res.*; 35: 1-9

Hatzopoulos AK, Rigotti A, Rosenberg RD, Krieger M. (1998), Temporal and spatial pattern of expression of the HDL receptor SR-BI during murine embryogenesis: *J Lipid Res.*; 39(3):495-508.

Horejsí B, Ceska R. (2000), Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein(a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis.: *Physiol Res.*; 49 (1): 63-9. Review.

Chesterton CJ. (1968), Distribution of cholesterol precursors and other lipids among rat liver intracellular structures: *J Biol Chem.*; 243(6):1147-51

Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM, Friedl W, Davignon J, McCarthy BJ. (1999), Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia: *J Lipid Res.*; 31(8):1337-49. Review.

Jawień J, Nastalek P, Korbut R, (2004), Mouse models of experimental atherosclerosis: *J Physiol Pharmacol.*; 55(3):503-17.

Kathy Jaworski, Eszter Sarkadi-Nagy, Robin E. Duncan, Maryam Ahmadian and Hei Sook Sul. (2007), Regulation of Triglyceride Metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:1-4.

Kearney T, Navas de Gallegos C, Chrisoulidou A, Gray R, Bannister P, Venkatesan S, Johnston DG (2001), Hypopituitarism is associated with triglyceride enrichment of very low-density lipoprotein: *J. Clin Endocrinol Metab.*; 86:3900–3906.

Kellner A, Correll JW, Ladd AT. (1951), Sustained hyperlipemia induced in rabbits by means of intravenously injected surface-active agents: *J Exp Med.* 1951 Apr 1;93(4):373-84.

Knott TJ, Wallis SC, Robertson ME, Priestley LM, Urdea M, Rall LB, Scott J. (1985), The human apolipoprotein AII gene: structural organization and sites of expression: *Nucleic Acids Res.*; 13(17):6387-98.

Korporaal SJ, Akkerman JW. (2006), Lipoprotein-associated proteins involved in platelet signaling: *Pathophysiol Haemost Thromb.*; 35(3-4):305-13. Review.

Králová Lesná I, Kovář J, Poledne R. (2006), Reverzní transport cholesterolu: *Cor Vasa*; 48(3):114–120.

Krieger M. (2001), Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems: *J Clin Invest.*; 108(6):793-7. Review.

Kuhajda K, Kevresan S, Kandrak J, Fawcett JP, Mikov M. (2006), Chemical and metabolic transformations of selected bile acids: *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*; 31(3):179-235. Review.

Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH. (1996), Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat: *J Clin Invest.*; 98(4):984-95.

Lewis GF, Rader DJ. (2005), New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport: *Circ Res.*; 96(12):1221-32. Review.

Liu Min, Takashi Doi and Patrick Tso. (2003), Regulation of Intestinal and Hypothalamic Apolipoprotein A-IV: *Experimental Biology and Medicine.*; 228:1181-1189

M. Adiels & J. Westerbacka & A. Soro-Paavonen & A. M. Häkkinen & S. Vehkavaara & M. J. Caslake & C. Packard & S. O. Olofsson & H. Yki-Järvinen & M. R. Taskinen & J. Borén. (2007), Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance: *Diabetologia*; 50:2356–2365

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. (1984), Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function: *J Lipid Res.*; 25(12):1277-94. Review.

Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ.(2006), Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo: *Circulation*. 2006 Jan 3;113(1):5-8.

Nelbach L, Shu X, Konrad RJ, Ryan RO, Forte TM. (2008), Effect of apolipoprotein A-V on plasma triglyceride, lipoprotein size, and composition in genetically engineered mice: *J Lipid Res.*; 49(3):572-80

Olivieri O, Stranieri C, Bassi A, Zaia B, Girelli D, Pizzolo F, Trabetti E, Cheng S, Grow MA, Pignatti PF, Corrocher R.(2002), ApoC-III gene polymorphisms and risk of coronary artery disease: *J Lipid Res.*; 43(9):1450-7.

Oram JF. (2003), HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 23(5):720-7. Epub 2003 Jan 9.

Ostlund-Lindqvist AM, Gustafson S, Lindqvist P, Witztum JL, Little JA. (1983), Uptake and degradation of human chylomicrons by macrophages in culture. Role of lipoprotein lipase: *Arteriosclerosis*.;3(5):433-40.

Otway s., Robinson D. S. (1967), The use of a non-ionic detergent (Triton WR1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions: *J. Physiol.*; 190, 321-332

Packard CJ. (2003), Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein: *Biochem Soc Trans.*; 31(5):1066-9.

Rader DJ. (2006), Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies: *J Clin Invest.*; 116(12):3090-100.

Rassart Eric, Bedirian Arda, Do Carmo Sonia, Guinard Olivier, Sirois Jacinthe, Terrisse Laurence and Milne Ross (2000), Apolipoprotein D: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.*; 1482(18),185-198.

Redgrave TG. (1970), Formation of Cholesteryl Ester-Rich Particulate Lipid during Metabolism of Chylomicrons: *J Clin Invest.*; 49(3):465-71.

Rigotti A, Edelman ER, Seifert P, Iqbal SN, DeMattos RB, Temel RE, Krieger M, Williams DL. (1996), Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland: *J Biol Chem.*; 271(52):33545-9.

Scriver, C.R., et al. (ed.): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th Ed. New York, McGraw-Hill 1999

Steinberg D. (1997), Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance: *J Biol Chem.*; 272: 20963-20966

Škottová N, Savonen R, Lookene , Hultin M, Olivecrona G. (1995), Lipoprotein lipase enhances removal of chylomicrons and chylomicron remnants by the perfused rat liver: *J Lipid Res.*; 36(6):1334-44.

Tanigawa H, Billheimer JT, Tohyama J, Zhang Y, Rothblat G, Rader DJ. (2007), Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport: *Circulation.*; 116(11):1267-73.

Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. (2003), Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 23(10):1732-8. Review.

Van Eck M, Pennings M, Hoekstra M, Out R, Van Berkel TJ. (2005), Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis: *Curr Opin Lipidol.*; 16(3):307-15. Review.

Von Eckardstein Arnold, Jerzy-Roch Nofer and Gerd Assmann. (2001), Reverse Cholesterol Transport: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; 21;13-27.

Vyroubal P, Chiarla C, Giovannini I, Hyspler R, Ticha A, Hrnčiarikova D, Zadák Z. (2008), Hypocholesterolemia in clinically serious conditions—review: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*; 152(2):181-9. Review.

Wang MD, Franklin V, Marcel YL. (2007), In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 27(8):1837-42.

Wang MD, Kiss RS, Franklin V, McBride HM, Whitman SC, Marcel YL. (2007), Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways: *J Lipid Res.*; 48(3):633-45.

Yamamoto K, Shen B, Zarins C, Scanu AM. (1984), In vitro and in vivo interactions of Triton 1339 with plasma lipoproteins of normolipidemic rhesus monkeys. Preferential effects on high density lipoproteins: *Arteriosclerosis.*; 4(4):418-34.

Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. (2003), Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo: *Circulation.*; 108(6):661-3.

8. Použité učebnice:

The Laboratory Rat (Handbook of Experimental Animals Series): edited by Georg J. Krinke (1900), San Diego: Academic Press.

Lipoproteins in health and disease: edited by Betteridge J, Illingworth R, Sheperd J. (1999), London, England: Hodder and Stoughton Publishers,

Cholesterol a ateroskleróza, léčba dislipidemií: Richard Češka a kolektiv (2005), Triton Praha

Biochemie: Donald Voet a Judith G. Voetová (1990), Praha: Victoria Publishing, a.s.