

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Alena Bohdanecká

Sérové markery aktivity cholesterol 7 α -hydroxylázy

Serum markers of cholesterol 7 α -hydroxylase activity

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Martin Leníček, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Tato diplomová práce byla vypracována na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF a VFN Univerzity Karlovy v Praze.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 18. dubna 2017

Podpis:

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Martinu Leníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, uvedení do problematiky a velkou dávkou trpělivosti při psaní mé práce. Nemalý dík patří i dr. Kovářovi za jeho čas, konzultace i odborné vedení. Dále děkuji Mgr. Tomáši Petru a pí Houbové za pomoc v laboratoři a vytvoření příjemné atmosféry. Děkuji i RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za její čas a cenné rady. V neposlední řadě děkuji Prof. RNDr. Ludmile Kameníkové, DrSc. za pomoc a především za podporu při psaní diplomové práce. Nakonec bych ráda poděkovala i své rodině za materiální a duševní podporu během celého mého studia.

Abstrakt

Cholesterol 7α -hydroxyláza (CYP7A1) je hlavní limitní enzym klasické dráhy syntézy žlučových kyselin (BA), kterou je u člověka katabolizována přibližně polovina cholesterolu. Stanovení enzymatické aktivity CYP7A1 je klíčovým předmětem ve výzkumu lipidového metabolismu. Přímé stanovení aktivity CYP7A1 v jaterní biopsii není většinou z etických důvodů povoleno, proto je využíváno nepřímých metod pomocí sérových markerů, např. 7α -hydroxy-4-cholesten-3-onu (C4). Prvním, metodickým cílem práce bylo převedení zavedené HPLC metody pro stanovení C4 na LC-MS s účelem zvýšit citlivost metody. Při optimalizaci jsme se zaměřili na extrakční krok, tzv. SPE extrakci (solid phase extraction), která spočívala v úpravě koncentrací a objemů promývacího a elučního roztoku. Převedením metody z HPLC na LC-MS se citlivost zvýšila cca 7krát (LD = 1,39 ng/ml). V druhé, klinické části naší práce jsme se pokusili potvrdit předběžné výsledky našeho pracoviště o distribuci C4 v lipoproteinových částicích (LPP), s cílem najít parametr, který by koreloval s aktivitou CYP7A1 lépe než samotný C4. Předběžné výsledky na zdravých jedincích ukázaly, že koncentrace C4 je nejvyšší v HDL, a že distribuce C4 v jednotlivých LPP je mezi jedinci podobná. Experiment jsme opakovali na několika jedincích s rozdílnou hladinou cholesterolu. Koncentrace C4 byla korigována na koncentraci volného cholesterolu (FC), jenž sloužil jako marker velikosti povrchu lipoproteinové částice. Naše výsledky nepotvrdily dříve pozorovanou stabilní distribuci C4 v LPP, poměr C4/FC tak nejspíše nebude spolehlivým ukazatelem aktivity CYP7A1.

Klíčová slova: CYP7A1, C4, volný cholesterol, SPE extrakce, lipoproteinové částice

Abstract

Cholesterol 7-hydroxylase (CYP7A1) is the rate limiting enzyme of the classical pathway of bile acid (BA) synthesis, which catabolizes approximately half of cholesterol in man. Determination of CYP7A enzymatic activity is a key subject of lipid metabolism research. Direct determination of CYP7A1 activity in hepatic biopsy is mostly not allowed for ethical reasons, so indirect methods are used with serum markers such as 7 α -hydroxy-4-cholestene-3-one (C4). The first, methodical aim of the work was to convert the introduced HPLC method for the determination of C4 to LC-MS in order to increase the sensitivity. We focused on the solid phase extraction step, adjusting the composition and volumes of the washing and elution solution. By converting the method from HPLC to LC-MS, the sensitivity was increased approximately 7 times (LD = 1.39 ng/ml). In the second, clinical part of our work, we attempted to confirm the preliminary results of our laboratory on the distribution of C4 in lipoprotein fractions (LPP) in order to find parameter that would correlate with CYP7A1 activity better than C4 level itself. Preliminary results (performed in healthy individuals) showed that most of C4 is carried on HDL, and that the C4 distribution within LPP fractions is similar among examined subjects. We repeated the experiment on several individuals with different cholesterol levels. The concentration of C4 was corrected to free cholesterol (FC), which served as a marker of LPP-surface size. Our results showed the highest C4 concentration in HDL, but the distribution ratios differed significantly among patients. We did not reproduced preliminary data and C4/FC ratio does not seem to be more accurate marker of CYP7A1 activity than C4 itself.

Keywords: CYP7A1, C4, free cholesterol, SPE extraction lipoprotein particles

Obsah:

1. Seznam zkratk	1
2. Úvod	4
3. Literární přehled	6
3.1 Cholesterol	6
3.2 Lipoproteinové částice	7
3.3 Žlučové kyseliny	12
3.4 Syntéza žlučových kyselin	14
3.4.1 Klasická, neutrální cesta.....	14
3.4.2 Alternativní, kyselá cesta	16
3.5 Cholesterol 7α-hydroxyláza (CYP7A1)	17
3.6 Regulace aktivity CYP7A1	19
3.6.1 FXR/SHP regulační dráha.....	19
3.6.2 FXR/FGF19/FGFR4 regulační dráha.....	21
3.6.3 LXR regulační dráha.....	22
3.6.4 Regulační dráhy nezávislé na FXR.....	23
3.7 Sérové markery aktivity CYP7A1	24
3.8 Klinický a výzkumný význam měření aktivity CYP7A1 pomocí sérových markerů	25
3.8.1 Stanovení C4 u pacientů s malabsorpcí žlučových kyselin (BAM).....	25
3.8.2 Studium vlivu promotorového polymorfismu v genu <i>CYP7A1</i> na aktivitu enzymu.....	26
3.8.3. Studium diurnální variace aktivity CYP7A1	27
4. Cíle diplomové práce	28
5. Materiál a metody	29
5.1 Materiál	29
5.1.1 Chemikálie a roztoky	29
5.1.2 Biologický materiál.....	30
5.1.3 Příprava roztoků.....	30
5.1.4 Laboratorní vybavení – nástroje.....	31
5.1.5 Laboratorní vybavení – přístroje.....	32
5.2 Metody	32
5.2.1 Měření volného cholesterolu na GC-MS:	32
5.2.2 Šablona pro výpočet koncentrace C4 v séru	36
5.2.3 Měření C4 na LC-MS.....	36
5.2.4 Detekce proteinů z hepatocytů	38

6. Výsledky	39
6.1 Převod metody stanovení C4 z HPLC na LC-MS.....	39
6.1.1 Opakovatelnost (intrassay variability) a reprodukovatelnost (interassay variability).....	41
6.1.2 Stanovení limitu detekce (LD) metody LC-MS	41
6.1.3. Testování citlivosti metody LC-MS	42
6.2 Distribuce C4 v lipoproteinových částicích (LPP)	43
7. Diskuze	46
8. Závěr.....	49
9. Literatura.....	50
10. Přílohy	57

1. Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
ABC1/G1	ABC1/G1 transporter	ABC1/G1 transportér
ABCG5/G8	ABCG5/G8 transporter	ABCG5/G8 transportér
AcONH ₄	ammonium acetate	octan amonný
BA	bile acid	žlučová kyselina
BARE	bile acid response elements	responzivní elementy žlučových kyselin
BSEP	bile salt export pump	exportér žlučových solí
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide	N,O-bis (trimetylsilyl) trifluoroacetamid
C4	7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one	7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on
CA	cholic acid	kyselina cholová
CDCA	chenodeoxycholic acid	kyselina chenodeoxycholová
CE	cholesteryl ester	ester cholesterolu
CYP12/CYP8B1	sterol 12 α -hydroxylase	sterol 12 α -hydroxyláza
CYP27	sterol 27-hydroxylase	sterol 27-hydroxyláza
CYP39A(1)	oxysterol 7 α -hydroxylase	oxysterol 7 α -hydroxyláza
CYP3A10	lithocholate 6 β -hydroxylase	litocholát 6 β -hydroxyláza
CYP46	24S-cholesterol hydroxylase	24S-cholesterol hydroxyláza
CYP7A1	cholesterol 7 α -hydroxylase	cholesterol 7 α -hydroxyláza
CYP7B(1)	25-hydroxycholesterol 7 α -hydroxylase	25-hydroxycholesterol 7 α -hydroxyláza
CYP8B1/CYP12	sterol 12 α -hydroxylase	sterol 12 α -hydroxyláza
DCA	deoxycholic acid	kyselina deoxycholová
DR-1	DR-1 type response element	DR-1 responzivní element
DR-4	DR-4 type response element	DR-4 responzivní element
ER	endoplasmatic reticulum	endoplazmatické retikulum
FC	free cholesterol	volný cholesterol
FFA	free fatty acid	volná mastná kyselina

FGF19/R	fibroblast growth factor 19/receptor	růstový faktor fibroblastů 19/receptor
FXR	farnesoid X receptor	farnesoidní X receptor
FXRE	farnesoid X receptor element	element pro farnesoidní X receptor
GC-MS	gas-chromatography-mass spectrometry	plynová chromatografie- hmotnostní spektrometrie
HDL	high density lipoproteins	lipoproteiny o vysoké hustotě
HMG-CoA(R)	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl- coenzymA/reductase	3-hydroxy-3-metyl-glutaryl- koenzym A / reduktáza
HNF4	hepatocyte nuclear factor 4	jaterní jaderný faktor 4
IBAT	ileal bile acid transporter	ileální transportér pro žlučové kyseliny
I-BABP	ileal bile acid-binding protein	protein vážící v ileu žlučové kyseliny
IL-1 β	inteleukine-1 β	interleukin-1 β
IR-1	inverted repeat type 1	invertní repetice typ 1
JNK 1/2	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-terminální kináza
LCMS	liquid chromatography-mass spectrometry	kapalinová chromatografie- hmotnostní spektrometrie
LCA	lithocholic acid	kyselina lithocholová
LCAT	lecithin cholesterol acyltransferase	lecitin cholesterol acyltransferáza
LD	limit of detection	limit detekce
LDL/R	low density lipoproteins/receptor	lipoproteiny o nízké hustotě/receptor
LPL	lipoprotein lipase	lipoproteinová lipáza
LQ	limit of quantification	limit kvantifikace
LRH-1	liver receptor homolog-1	homolog jaterního receptoru-1
LRH RE	liver homolog receptor responsive element	reponzivní element pro LRH
LXR	liver X receptor	jaterní X receptor
LXRE	liver X receptor element	element pro LXR
MDR2	multidrug resistance protein 2	protein 2 pro multirezistenci

NTCP	sodium taurocholate cotransporting polypeptide	sodno-taurocholátový kotransportér
Ost α/β	organic solute transporter α/β	transportér organických solutů α/β
PMP-2	peripheral myelin protein 2	periferní myelinový protein 2
PL	protein lipase	proteinová lipáza
RXR	retinoid x receptor	retinoidní X receptor
SHP	small heterodimer partner	malý heterodimerní partner
SPE	solid phase extraction	extrakce na pevnou fázi
SR-B1	scavenger receptor class B type 1	zametačový receptor třídy B typ 1
TAG	triacylglycerol	triacylglycerol
TMA	N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide	N,O-bis(trimetylsilyl)acetamid
TNF- α	tumor necrosis factor α	faktor nádrové nekrózy α
TGR5(GP-BAR1)	G protein coupled bile acid receptor	receptor pro žlučové kyseliny spřažený s G-proteinem
VLDL	very low density lipoproteins	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

2. Úvod

Žlučové kyseliny (BA) působí jako detergenty usnadňující trávení lipidů. Jejich akumulace v krvi a ve tkáních působí toxicky, proto je jejich syntéza přísně regulovaná. BA jsou syntetizovány v hepatocytech z cholesterolu převážně klasickou cestou, kterou vzniká až 90 % kyseliny cholové (CA). Zbýlých cca 10 % zaujímá kyselina chenodeoxycholová (CDCA), jež je syntetizovaná v tzv. alternativní cestě (Duane et al., 1999). V majoritní, klasické dráze je klíčovým regulačním enzymem cholesterol-7 α -hydroxyláza, známá jako CYP7A1. Studium aktivity CYP7A1 je klíčovým předmětem výzkumu metabolismu lipidů, neboť snížení její aktivity je spojováno s hypercholesterolémií (Pullinger et al., 2002) a se zvýšeným rizikem vzniku cholelitiázy (Björkhem et al., 1987) a kardiovaskulárních onemocnění. Samotné měření aktivity CYP7A1 je možno provádět přímo z jaterní biopsie (není povoleno z etických důvodů u zdravých jedinců; v několika výjimečných případech bylo provedeno u pacientů, u kterých byly prováděny chirurgické výkony v blízkosti jater) nebo více dostupnou metodou nepřímou, pomocí sérových markerů. Těmito markery jsou metabolické meziprodukty syntézy BA. V minulosti byl využíván 7 α -hydroxycholesterol (Björkhem et al., 1987), který však postupně nahradil stabilnější a spolehlivější analyt, 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on (C4) (Gälman et al., 2005). Obě tyto molekuly jsou v krevním séru transportované pomocí lipoproteinových částic (lipoprotein particles, LPP). Ve studii, která analyzovala vztah mezi aktivitou CYP7A1 v játrech a koncentrací C4 v plazmě u králíků na kontrolní a na cholesterolové dietě bylo zjištěno, že v tomto modelu není mezi aktivitou enzymu a koncentrací C4 žádný vztah (Honda et al., 2004). Pokud byla ale koncentrace C4 korigována na koncentraci cholesterolu, byla mezi oběma parametry zjištěna významná korelace. Tato studie tedy ukázala, že poměr C4/chol se zdá být spolehlivějším ukazatelem aktivity CYP7A1 než samotné sérové hladiny C4. Tento závěr podpořili autoři i pozorováním u pacientů s cholelithiázou, u kterých byla zjištěna lepší korelace mezi poměrem C4/chol a aktivitou CYP7A1 ($r = 0,92$) než mezi koncentrací C4 a aktivitou enzymu ($r = 0,84$). Cholesterol se v částicích LPP vyskytuje buď jako hydrofobní cholesterol ester (CE) nebo amfipatický volný cholesterol (free cholesterol, FC), přičemž hydrofobní ester se nachází uvnitř částic a FC spolu s fosfolipidy tvoří vrstvu na povrchu lipoproteinů (LPP). Protože C4 je podobně jako FC slabě polární, lze předpokládat, že se bude chovat podobně a jeho distribuce by měla odpovídat distribuci FC v obalu LPP. Protože FC a CE jsou v jednotlivých lipoproteinech různě zastoupeny, mohl by poměr C4/FC lépe korelovat s aktivitou enzymu. Výsledky našeho pracoviště (Kovačiková, 2013, *Příloha* Tab. 9) naznačily, že C4 může být rozdílně distribuován mezi jednotlivými lipoproteiny (LPP), přičemž

poměr C4/FC je nejvyšší v částicích LPP o vysoké hustotě (HDL). Distribuce C4 v jednotlivých lipoproteinech se mezi subjekty navzájem významně nelišila. Tyto výsledky ovšem nebyly dosud reprodukovány. V naší práci jsme si dali za cíl, pokusit se zreprodukovat tyto výsledky na větším souboru osob – u pacientů s rozdílnými hladinami cholesterolu. U všech osob byl stanoven C4 a FC v plazmě, VLDL, LDL a HDL frakci. Před vlastním provedením této části, jsme optimalizovali extrakční kroky metody stanovení C4, která umožnila přechod z HPLC (Leníček et al., 2008b) na citlivější a úspornější LC-MS.

3. Literární přehled

3.1 Cholesterol

Funkce:

Cholesterol je významná složka plazmatických membrán a membrán vnitrobuněčných organel (např. mitochondrií a endoplazmatického retikula), kde svojí přítomností ovlivňuje vlastnosti membrán, jako permeabilitu a fluiditu. Funkčně slouží cholesterol jako prekurzor steroidních hormonů (mineralokortikoidů, glukokortikoidů a pohlavních hormonů), vitamínu D a žlučových kyselin (BA), které se účastní trávicího procesu (shrnutí ve Voet et al., 2011).

Struktura:

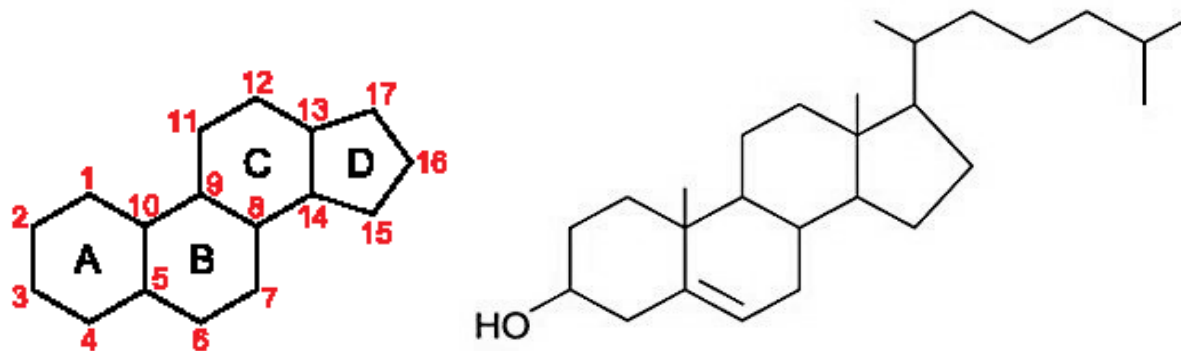
Základní strukturní jednotkou cholesterolu je steran. Tato molekula je složena ze tří cyklů o šesti uhlíkových a jednoho cyklu o pěti uhlíkových atomech. Molekula cholesterolu dále obsahuje hydroxylovou skupinu, umístěnou na C₃ a alifatický řetězec o 8 uhlíkových atomech umístěný na C₁₇ molekuly (Obr. 1). Kondenzované cykly steranu zajišťují cholesterolu pevnost, zatímco OH-skupina slabý amfifilní charakter.

Jelikož se jedná převážně o nepolární sloučeninu, je cholesterol nerozpustný ve vodě a jeho transport v krevní séru je závislý na nosiči, jakým jsou např. lipoproteinové částice (LPP). V organismu se vyskytuje ve dvou formách: jednak jako slabě polární volný cholesterol (FC), který se nachází v buněčných membránách a na povrchu LPP, a pak ve formě esteru (CE), plně hydrofobní molekuly, která se nachází uvnitř tukových kapének a LPP. Ester vzniká z mastné kyseliny (fatty acid, FA) a FC v buňkách působením acyl CoA cholesterol acyltransferázy (ACAT) a v plazmě působením lecitin cholesterol acyltransferázy (LCAT) (Guyton et al., 2006).

Biosyntéza:

Cholesterol přítomný v lidské těle je dvojího původu: jednak dietního, který vzhledem k dnešním stravovacím návykům člověka převažuje a jednak endogenního, který je syntetizovaný prakticky ve všech buňkách, především pak ve střevě, játrech, kůži a nervové tkáni. Biosyntéza cholesterolu je složitý biochemický proces, který se skládá z více jak 20 enzymatických kroků (<http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/SVAAP.htm>). Výchozí látkou je acetylCoA. Následujícími reakčními kroky vzniká HMG-CoA (hydroxymetylglutaryl

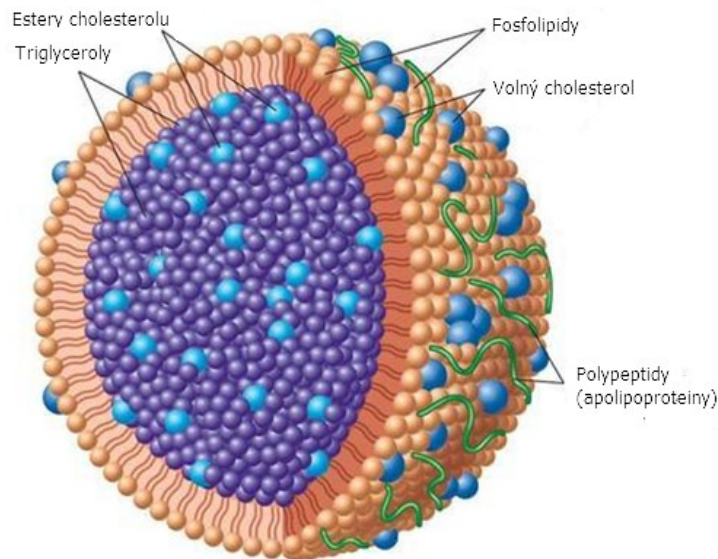
CoA), jehož redukcí vzniká mevalonát. Tento reakční krok je klíčovým regulačním místem v celé syntéze. Aktivita enzymu HMG-CoA reductázy je závislá na množství cholesterolu přítomného v buňkách. V případě dostatečné koncentrace cholesterolu v buňkách je syntéza pozastavena a naopak. Kondenzací mevalonátu vzniká lineární skvalen a následnou cyklizací lanosterol, který je prekurzorem cholesterolu (shrnutí ve Voet et al., 2011; <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-lipidy-synteza-cholesterolu>).



Obr. 1 – Struktura steranu a cholesterolu. *Vlevo: Struktura steranu je uspořádaná do tří šestičlenných a jednoho pětičlenného cyklu. Vpravo: Struktura cholesterolu má jako základ steran, na kterém je na C₃ připojena hydroxylová skupina, na uhlíku C₁₇ připojen alifatický řetězec, na C₁₀ a C₁₃ metylová skupina a v poloze C₅₋₆ dvojná vazba. Přítomnost hydroxylylu dává molekule cholesterolu slabě polární charakter.*

3.2 Lipoproteinové částice

Lipoproteinové částice fungují v krevní plazmě jako přenašeče triacylglycerolů (TAG), cholesterolu a fosfolipidů. Skládají se z proteinů a nekovalentně asociovaných lipidů. Jádro je složeno z hydrofobních triacylglycerolů a esterů cholesterolu. Obal tvoří polárnější fosfolipidy, FC a jedna nebo více molekul apolipoproteinů, pro které je charakteristická přítomnost amfipatického α -helixu. Většina cholesterolu obsažená v lipoproteinové částici se nachází ve formě CE (cca 75 %) v jádře, zatímco zbylý FC, je vzhledem ke své hydroxylové skupině součástí obalu. Celkově tak tvoří LPP struktury podobné micelám (Obr. 2).



Obr. 2 – Obecná struktura lipoproteinové částice (LPP). *Obal LPP je tvořen polárnějšími molekulami, jakými jsou fosfolipidy, volný cholesterol a apolipoproteiny. Zatímco v jádře částice nacházíme plně hydrofobní molekuly jako triacylglyceroly a estery cholesterolu.*

Upraveno podle <https://www.studyblue.com/notes/note/n/biochem-lipid-metabolism/deck/12418058>.

Lipoproteinové částice se dělí na několik skupin podle hustoty, velikosti, relativního obsahu cholesterolu, TAG, bílkovin a pohyblivosti v elektrickém poli. Patří sem chylomikrony, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteiny o střední (IDL) a nízké hustotě (LDL) a lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL). Chylomikrony patří k největším částicím s velkým obsahem TAG. Množství TAG v částicích s rostoucí denzitou klesá a mírně narůstá obsah cholesterolu a fosfolipidů. V HDL částici převládají estery cholesterolu, naproti tomu TAG se v ní prakticky nevyskytují (Tab. 1) (Guyton et al., 2006).

Na povrchu lipoproteinových částic se vyskytují již zmíněné apolipoproteiny (jinak apoproteiny). Fungují jako kofaktory enzymových reakcí a zprostředkovávají vazbu na specifické receptory. Apoproteinů existuje několik typů a jsou obsaženy v různém zastoupení v jednotlivých lipoproteinových částicích (Tab. 1).

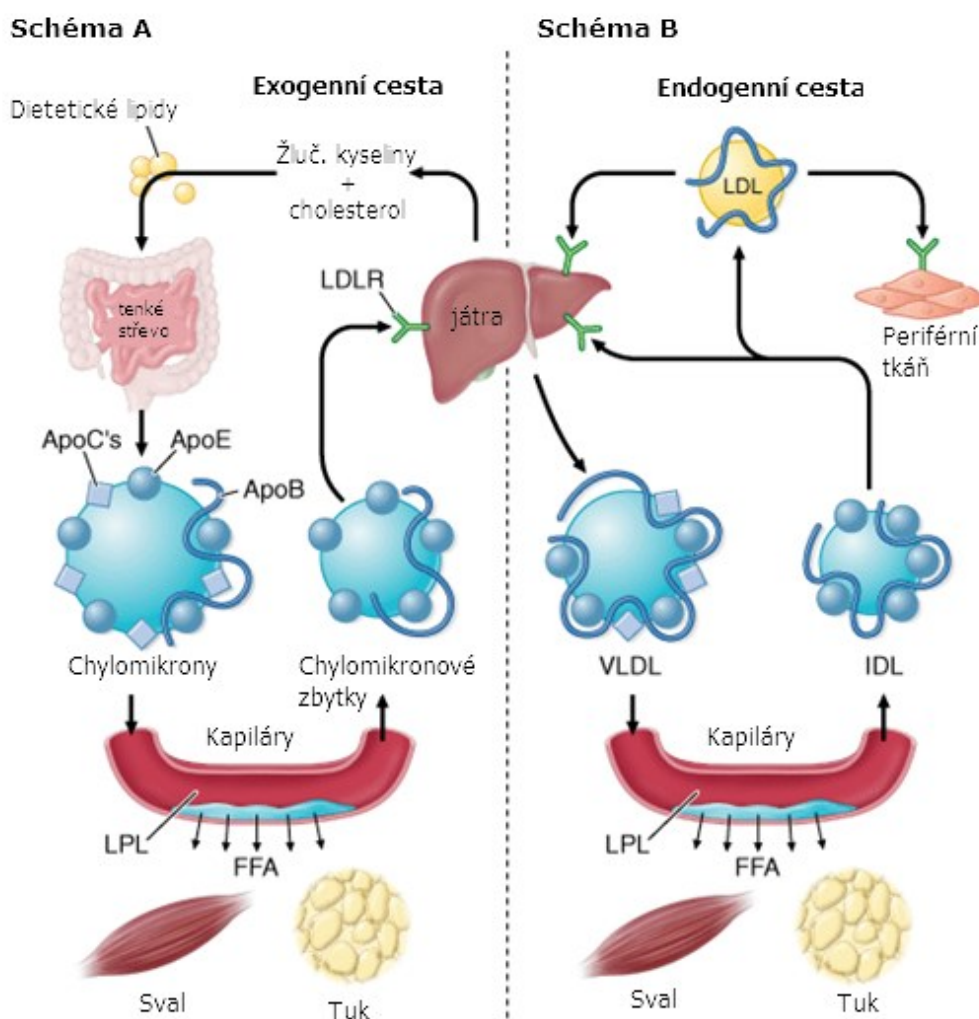
Tab. 1 – Hlavní třídy lipoproteinů v lidské plazmě. Upraveno podle Walker et al., 1990.

Třída lipoproteinů	Průměr částice (nm)	Hlavní lipidy	Obsah cholesterolu (%)	Apoproteiny	Hustota (g/ml)
Chylomikrony a zbytky	80–500	Dietní TAG	3	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	0,95
VLDL	30–80	Endogenní TAG, estery cholesterolu, cholesterol	10	B-100, C-I, C-II, C-III, E	0,95–1,006
IDL	25–35	TAG, estery cholesterolu, cholesterol		B-100, C-III, E	1,006–1,019
LDL	18–28	TAG, estery cholesterolu, cholesterol	26	B-100, E	1,019–1,063
HDL	5–12	Estery cholesterolu, cholesterol	20	A-I, A-II, C-I	1,063–1,210

Lipoproteinové částice transportují cholesterol a další molekuly různými cestami. První skupinu tvoří *chylomikrony*, které transportují lipidy a cholesterol z potravy v tzv. exogenní dráze. Vznikají ve střevě a jsou uvolňovány skrze lymfatický systém do krve a následně do tkání, kde jsou hydrolyzovány jejich TAG a uvolněné FA vycity tkáněmi. Chylomikronové zbytky jsou stále ještě bohaté na CE a v játrech podléhají endocytóze. Pokud jsou dostatečně malé, mohou penetrovat endotel cév a přispívají k tvorbě aterosklerotických plátů (Shepherd, 2001).

Druhou skupinu tvoří *VLDL, IDL a LDL* částice, které transportují cholesterol a TAG vzniklé v játrech. Tuto dráhu označujeme jako endogenní. VLDL vzniká v játrech, krví se dostává do tkání a zde se zbavuje převážně TAG, vzniká tak IDL a následně LDL. LDL částice je nejbohatší na cholesterol, kterého obsahuje až 26 %. LDL dodává cholesterol všem buňkám,

pokud je zapotřebí, ale nejvíce např. do buněk gonád, nadledvin nebo kosterního svalu. LDL cholesterol tkáně přijímají pomocí receptoru LDLR (low density lipoprotein receptor), který rozpoznává Apo-B100 na povrchu LDL a následně dochází k receptorově zprostředkované endocytóze. Zvýšená hladina cholesterolu v buňkách vede k zastavení syntézy cholesterolu (HMG-CoA reductázou) a k potlačení syntézy LDL receptorů pomocí negativní zpětné vazby. Zvýšené množství LDL částic vede k jejich vychytávání makrofágy pomocí receptorů označovaných jako „scavenger receptors“. Makrofágy následně prochází endotelem, pod kterým se usazují a stávají se pěnovými buňkami, které se zásadně podílí na vzniku aterosklerotických plátů (Valacchi et al., 2011).



Obr. 3 – Exogenní a endogenní cesta cholesterolu v organismu. Schéma A – Exogenní cesta. Po příjmu potravy s obsahem lipidů se cholesterol a TAG dostávají do tenkého střeva, kde dochází k jejich absorpci enterocytem (absorpci napomáhá pankreatická lipáza (PL), žlučové kyseliny (BA) a cholesterol-ester hydroláza). Po absorpci dochází k reesterifikaci mastných

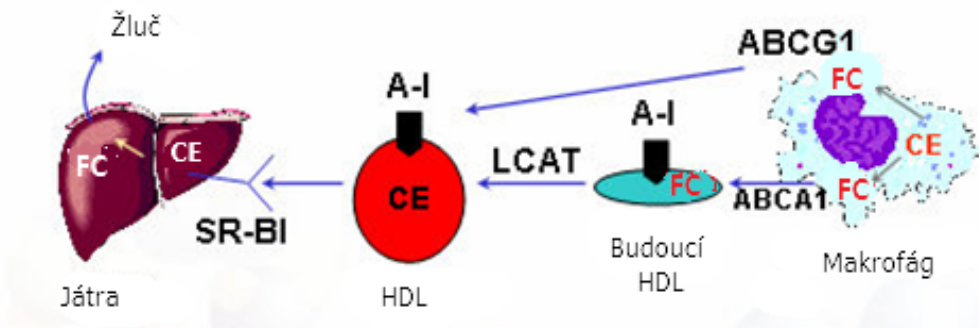
kyselin (FA) za vzniku TAG a esterifikaci cholesterolu pomocí ACAT. Ty jsou poté transportovány do cirkulace v chylomikronech. Jejich nezbytnou komponentou je apoB48. Lymfou se chylomikrony dostávají do krevního oběhu a na endotelu cév (kosterní svalové a tukové tkáně) jsou hydrolyzovány jejich TAG prostřednictvím LPL. Tím dochází k dalšímu odstranění TAG a uvolnění volných mastných kyselin (free fatty acids, FFA). Chylomikronové zbytky, bohaté na estery cholesterolu, jsou vychytávány prostřednictvím endocytózy zprostředkované receptory (LDLR, LDL-receptor a LRP, „LDL-receptor related protein“).

Schéma B – Endogenní cesta. TAG a cholesterol syntetizovaný v játrech vytváří společně s apoproteiny a fosfolipidy VLDL částici. VLDL se krví dostává do vlásčnic svalové a tukové tkáně, kde dochází k odstranění většiny TAG a uvolnění mastných kyselin. Z VLDL se stává částice o střední hustotě IDL. IDL mohou být vychytány hepatocyty podobně jako chylomikronové zbytky, nebo dále transformovány na menší částice LDL. LDL dodává cholesterol buňkám a z krevního oběhu je odstraňován pomocí LDL receptorové endocytózy.

Upraveno podle <https://www.studyblue.com/notes/n/biochem-lipid-metabolism/deck/12418058>.

Poslední skupinu tvoří **HDL**. HDL zajišťují reverzní transport cholesterolu, tj. přenášejí cholesterol z povrchových membrán buněk periferních tkání do jater. Tato funkce zabraňuje hromadění cholesterolu uvnitř buněk tkání a zajišťuje tak jeho optimální bilanci (Brooks-Wilson et al., 1999). Budoucí částice vzniká ve střevě nejprve jako nascentní HDL prakticky s nulovým množstvím cholesterolu. V cirkulaci postupně vychytává cholesterol, který je pomocí enzymu lecitin-cholesterolacyltransferázy (LCAT) esterifikován. Estery tvoří hydrofobní jádro částice. HDL částice se váže na receptor SR-B1 (scavenger receptor class B type 1), který se nachází na povrchu hepatocytů a následně dochází k receptorově zprostředkované endocytóze. V časném endozómu je z HDL částice odstraněn veškerý cholesterol, který je vyloučen do žluče. HDL proteinový komplex se vrací zpět do krve pro další cholesterol. Následně dochází k regeneraci SR-B1 receptoru do plazmatické membrány hepatocytu (Valacchi et al., 2011) (Obr. 4).

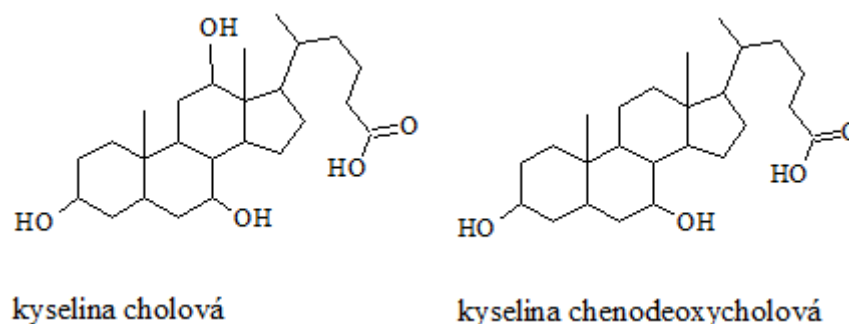
HDL metabolismus a reverzní transport cholesterolu



Obr. 4 – HDL metabolismus a reverzní transport cholesterolu. Volný cholesterol (FC) a fosfolipidy buněčných membrán jsou pomocí transportéru ABCA1 přeneseny na nascentní HDL. Účinkem LCAT je FC přeměněn na ester cholesterolu (CE), tím se stává molekula hydrofobní a noří se dovnitř částice, kde vytváří jádro zralé částice HDL. Transportu cholesterolu do maturované HDL částice napomáhá i další transportér ABCG1. Na povrchu hepatocytů se částice HDL váže na receptor SR-BI. Estery cholesterolu se uvolní do buněk a následně se cholesterol z HDL stává součástí žluče. Tarling et al., 2011; upraveno podle http://www.medscape.org/viewarticle/550620_2.

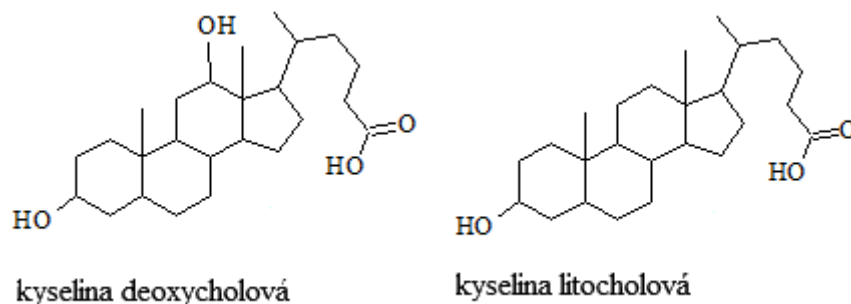
3.3 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny (BA) patří mezi steroidy a vznikají v játrech oxidací cholesterolu. Tyto BA se nazývají primární a patří mezi ně kyselina cholová (CA) a kyselina chenodeoxycholová (CDCA) (Obr. 5).



Obr. 5 – Primární žlučové kyseliny. Kyselina cholová a kyselina chenodeoxycholová.

Základní strukturní jednotkou je steran s alifatickým řetězcem na C₁₇, který je ukončený karboxylovou skupinou na C₂₄. Ke steroidnímu jádru jsou připojeny 2-3 OH skupiny, převážně v pozicích 3 α , 7 α a 12 α . Hydroxylové skupiny jsou otočeny na jednu stranu molekuly a vytváří tak hydrofilní povrch oddělující hydrofobní stranu (Pikuleva et al., 2008). Většina BA je konjugována s glycinem nebo taurinem, což snižuje jejich toxicitu a zvyšuje rozpustnost pro sekreci do žluče, která je shromažďována ve žlučníku. Zde jsou součástí tzv. smíšených micel společně se žlučovými lipidy a dalšími látkami. Svoji přítomností v micelách umožňují solubilizaci cholesterolu ve žluči. Část BA je absorbována ve žlučových cestách a transportována hned do jater (cholehepatální oběh), větší část je uvolňována kontrakcí žlučníku do tenkého střeva, kde napomáhají emulgování tuků a vitamínů a tím přispívají k lepšímu vstřebávání (Monte et al., 2009). V tlustém střevě vznikají sekundární žlučové kyseliny, kyselina deoxycholová (DCA) a kyselina lithocholová (LCA), a to pomocí bakteriální dehydroxylace primárních BA na C₇ (Obr. 6).

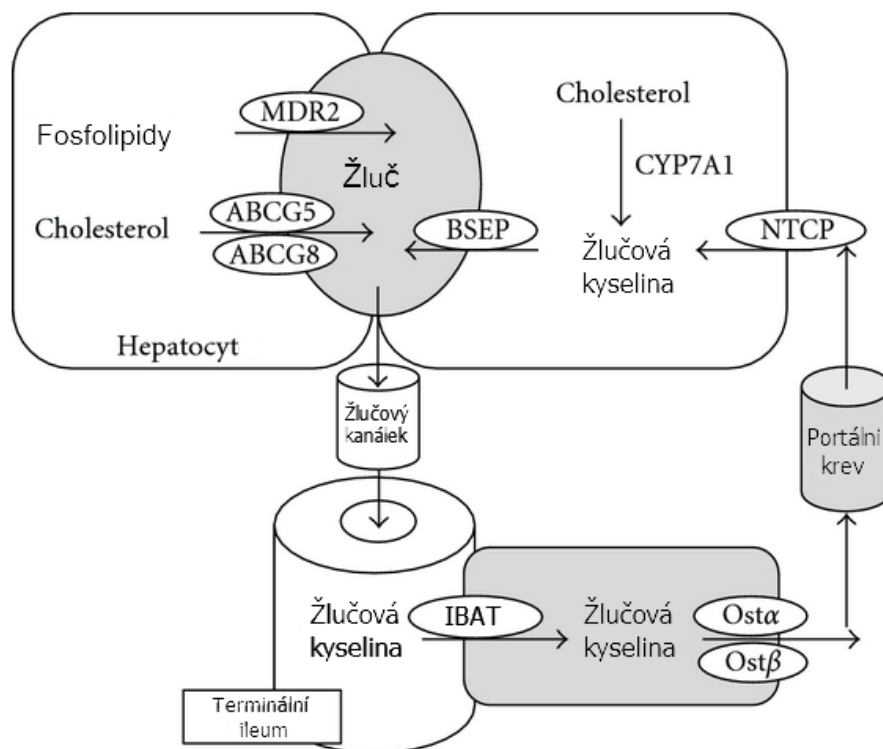


Obr. 6 – Sekundární žlučové kyseliny. Kyselina deoxycholová (DCA) a kyselina lithocholová (LCA) vznikají 7 α dehydroxylací kyseliny cholové a kyseliny chenodeoxycholové.

Po splnění funkce je malá část BA odstraněna stolicí, zatímco většina je reabsorbována v terminálním ileu a vrací se zpět do jater. Na tomto enterohepatálním oběhu se podílí celá řada transportérů (Obr. 7). Dekonjugované žlučové kyseliny mohou procházet přes střevní sliznici i prostou difúzí, a to především v oblasti tlustého střeva (Myant et al., 1977). Pokud játra pracují správně, dokáží odstranit z krve až 80 % kyseliny cholové a 60 % kyseliny chenodeoxycholové během jednoho průtoku. Tato schopnost je využívána jako indikátor jaterní funkce (Štern et al., 2005).

Žlučové kyseliny, ať už primární nebo sekundární, fungují i jako signální molekuly a metabolické regulátory a jsou zapojeny do mnoha regulačních drah. Prostřednictvím těchto

drah regulují vlastní syntézu, enterohepatální oběh, ale i homeostázi cholesterolu, TAG, glukózy a energie (Chiang et al., 2009).



Obr. 7 – Enterohepatální cirkulace žlučových kyselin. BA jsou vylučovány do žluče pomocí BSEP transportéru (bile salt export pump, transportér pro žlučové kyseliny z rodiny ABC transportních proteinů vázající ATP, také známý jako ABCB11). Do žluče se cholesterol vylučuje dvěma transportéry z rodiny ABC proteinů, ABCG5 a ABCG8. V terminální části ilea je většina BA reabsorbována enterocyty pomocí transportéru IBAT (ileal bile acid transporter). Z enterocytu jsou na jejich bazolaterální straně přeneseny transportéry Ost α /Ost β (organic solute transporter) do portálního oběhu a jím následně do jater. Do hepatocytu vstupují žlučové kyseliny na jeho bazolaterální membráně transportérem NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide). Upraveno podle Li and Chiang, 2012.

3.4 Syntéza žlučových kyselin

3.4.1 Klasická, neutrální cesta

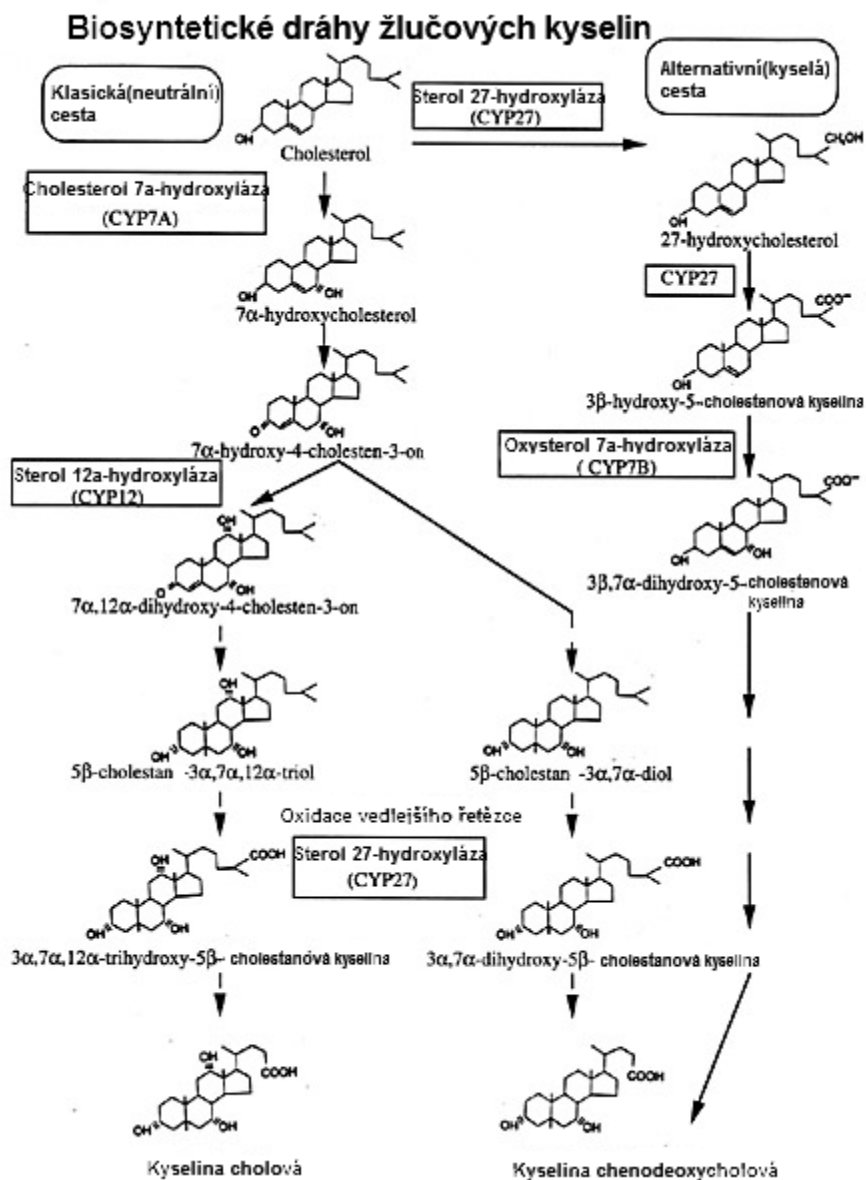
V prvním kroku klasické cesty syntézy BA dochází k 7 α -hydroxylaci cholesterolu enzymem CYP7A1. Tento krok je limitním v celé syntéze a vzniká 7 α -hydroxycholesterol (Javitt, 1994).

V následujícím kroku vzniká 7α -hydroxy-4-cholesten-3-on (C4) působením mikrozomální oxidoreduktázy (3 β -hydroxy- Δ^5 -C27).

C4 může být dále hydroxylován na uhlíku C₁₂ mikrozomální cytochrom P450 monooxygenázou, sterol 12 α -hydroxylázou (CYP12, také známý jako CYP8B1). Následující reakční kroky, zahrnující 27 α -hydroxylaci mitochondriální sterol 27-hydroxylázou (CYP27), vedou ke vzniku cholové kyseliny (CA). Alternativně může C4 podléhat redukci, bez účinku 12 α -hydroxylace. Dochází tak ke vzniku chenodeoxycholové kyseliny (CDCA) (Chiang, 1998) (Obr. 5).

V klasické cestě nemusí z veškerého cholesterolu vznikat C4, ale může dojít přímo k 12 α -hydroxylaci 7α -hydroxycholesterolu. Výsledným produktem je $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxycholesterol. Dalším krokem je 27-hydroxylace katalyzovaná mitochondriálním cytochromem P450, CYP27, a hydroxylace 24. pozice multifunkčním peroxisomálním proteinem PMP-2. V následujícím kroku dojde k vytvoření karboxylové skupiny (Davis et al., 2002).

CYP8B1 tedy svým 12 α -hydroxylačním účinkem na meziprodukty biosyntézy BA řídí množství CA a CDCA. Hydroxylace spíše probíhá ve prospěch CA, která je více hydrofilní (Lefebvre et al., 2009).



Obr. 8 – Schéma klasické a alternativní cesty syntézy žlučových kyselin. Upraveno podle Chiang, 1998.

3.4.2 Alternativní, kyselá cesta

Prekurzorem BA u této cesty je rovněž cholesterol, který je nejprve oxidován na postranním řetězci za vzniku oxysterolů (24, 25 nebo 27-hydroxycholesterol), které jsou následně 7 α -hydroxylovány. 25 a 27-hydroxycholesterol je 7 α -hydroxylován CYP7B(1) (Li-Hawkins et al., 2000). Tento enzym je považovaný za iniciátora reakce, je distribuovaný v mitochondriích a má vysokou aktivitu ve vaskulárních endoteliálních buňkách (Araya et al., 1995).

24-hydroxycholesterol vzniká v mozku působením CYP46 na cholesterol. Tento produkt je secernován do plazmy (Lund et al., 1999) a v játrech je 7 α -hydroxylován jaterním CYP39A1 (mikrozomální cytochrom P450) (Li-Hawkins et al., 2000).

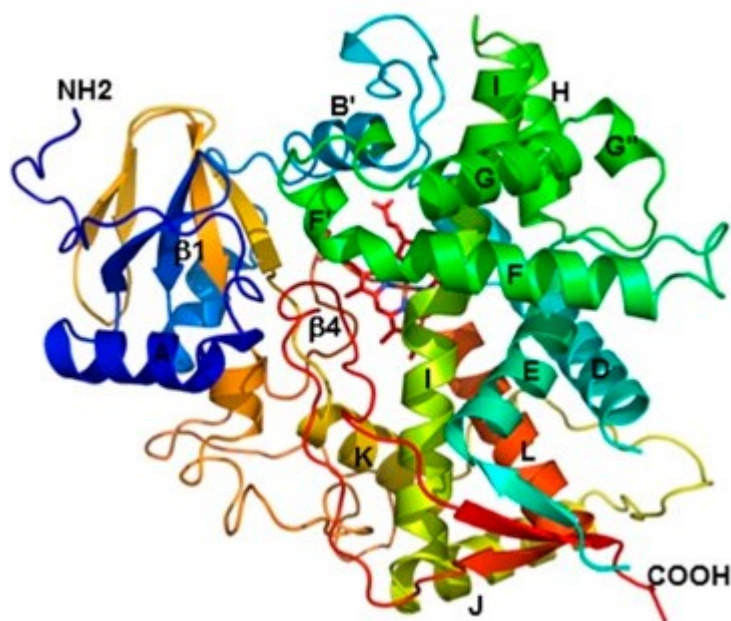
Po vstupu do jater jsou oxysteroly metabolizovány především na CDCA (např. konverzí 27-hydroxycholesterolu vznikají BA, kde 72,6 % tvoří právě CDCA) (Duane et al., 1999). Na rozdíl od CYP7A1 není CYP27A1 regulována BA (Lefebvre et al., 2009).

U člověka vzniká touto cestou cca 10 % BA (Duane et al., 1999). V některých případech (např. při chronickém onemocnění jater nebo během vývoje plodu) může tato cesta výrazněji přispět k syntéze BA (Crosignani et al., 2007; Back et al., 1980). Samotné oxysteroly se podílí na udržení cholesterolové homeostáze (Norlin et al., 2000).

3.5 Cholesterol 7 α -hydroxyláza (CYP7A1)

CYP7A1 je mikrozomální enzym nacházející se v játrech a patří do rodiny enzymů cytochromů P450. Tyto enzymy byly objeveny původně jako buněčné pigmenty a obsahují porfyrinové jádro s centrálním atomem železa. Na tomto atomu dochází k transferu elektronů (Fe^{2+}/Fe^{3+}) a tím i k oxidačně-redukční reakci. Jedná se tedy o tzv. monooxygenaci (Shiver and Atkins, 2010). CYP7A1 se také označuje jako cholesterol 7 α -monooxygenáza, protože využívá molekulární kyslík k oxidaci cholesterolu na 7- α -hydroxycholesterol. Tato reakce je první a limitní krok v klasické cestě syntézy BA.

Je kódovaná genem *CYP7A1* lokalizovaným na chromozómu 8q11–q12 (Cohen et al., 1992).



Obr. 9 – Cholesterol 7 α -hydroxyláza (CYP7A1). Převzato z Tempel et al., 2014.

Tento enzym hraje klíčovou roli v homeostazi cholesterolu. Uvedme si pár příkladů:
Nadměrná exprese CYP7A1 má za následek snížení hladiny cholesterolu v krevním séru (Nitta et al., 1999).

Homozygotní ztráta funkce genu pro *CYP7A1* vede k metabolické poruše projevující se hypercholesterolémií s vysokými hladinami „špatného“ LDL cholesterolu, která je rezistentní na terapii a je spojena s tvorbou cholesterolových žlučových kamenů (Pullinger et al., 2002). Pro srovnání, u laboratorních myší, u kterých byl *Cyp7a1* knockoutován, dojde k zapnutí alternativní cesty biosyntézy BA a odstranění cholesterolu touto cestou (Schwarz et al. 1996). U myší představuje tato cesta cca 45 % celkové syntézy BA (Vlahcevic et al., 1997).

Substrátová specifita:

U CYP7A1 byla dlouho známa její substrátová specifita pouze k cholesterolu a cholestanolu. Podle Norlin (Norlin et al., 2000) dokáže 7 α -hydroxylovat i některé oxysteroly jako 20(S)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol a 27-hydroxycholesterol. Je tedy schopna fungovat jako CYP7B, která se vyskytuje v kyselé cestě biosyntézy BA a nachází se i mimo jaterní tkáň. Tyto oxysteroly (včetně 22(R)-hydroxycholesterolu) jsou ligandy pro ligand-dependentní transkripční faktor (LXR) (viz 3.6.3).

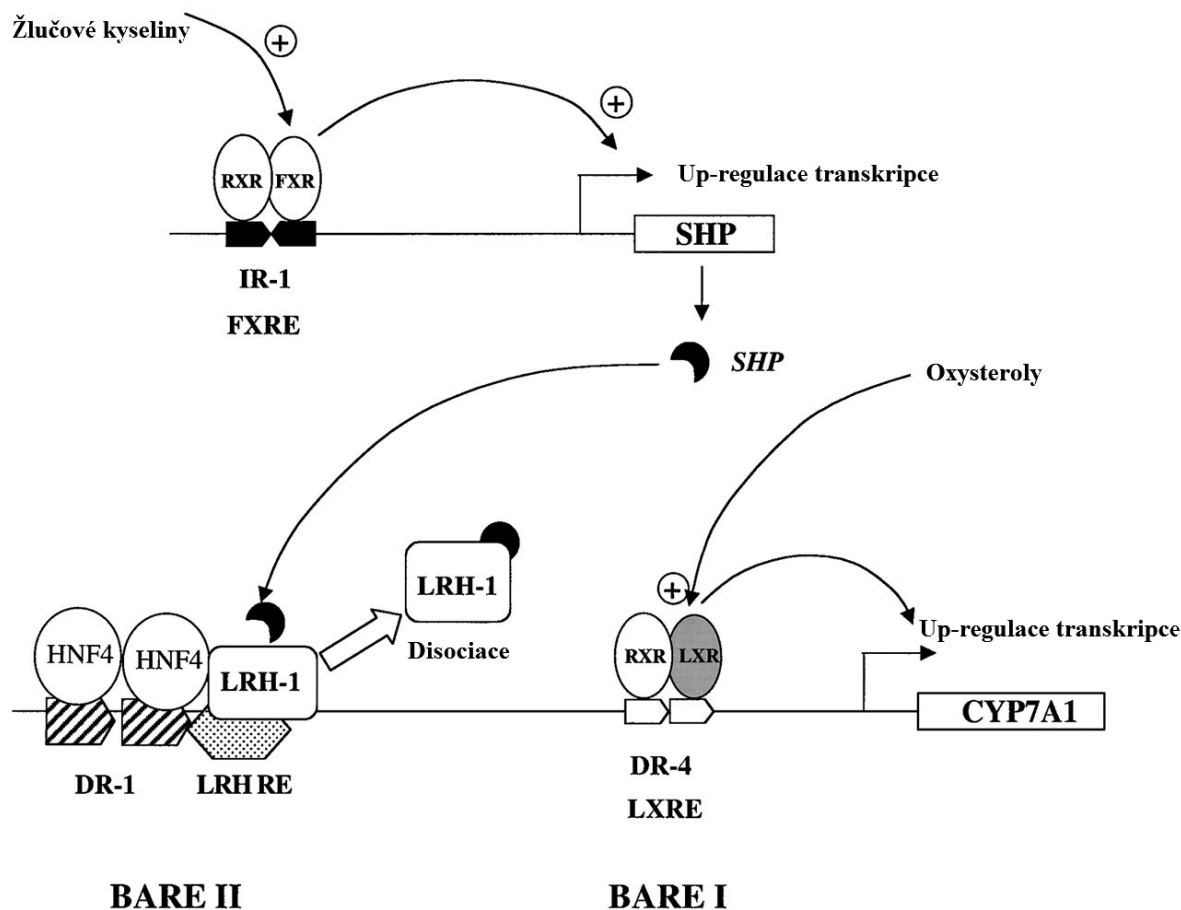
3.6 Regulace aktivity CYP7A1

Žlučové kyseliny mají nepostradatelné fyziologické účinky, ale při vysokých koncentracích působí toxicky a narušují strukturu buněčných membrán. Aby se zabránilo jejich akumulaci ve tkáních a v krvi, je jejich syntéza přísně regulována.

Samotná regulace syntézy BA probíhá převážně na transkripční úrovni exprese *CYP7A1*. Je řízena z promotorové oblasti genu *CYP7A1*, ve kterém se nachází responzivní elementy BA tzv. BARE (bile acid regulation elements) (Obr. 10). Tyto elementy obsahují sekvence přímých repetit, které jsou vazebnými místy pro transkripční faktory (TF). Jako TF působí jaderné receptory s navázanými ligandy. Klíčem pro pochopení regulace *CYP7A1* se stal objev jaderného receptoru FXR (farnesoid X receptor), jehož endogenními ligandy jsou BA. Aktivací FXR regulují BA svoji vlastní syntézu. Regulace FXR se uplatňuje jak v játrech, tak ve střevě a společně tak tvoří klíčový regulační mechanismus pro udržování homeostáze BA. Kromě FXR regulace existují i regulační dráhy BA na FXR nezávislé, které často vedou k inhibici transkripce *CYP7A* a uplatňují se tak v ochraně jater před potenciálními toxickými účinky žlučových kyselin.

3.6.1 FXR/SHP regulační dráha

BA se po návratu enterohepatickou cirkulací do jater váže na FXR (Makishima et al., 1999), který aktivuje. Následně dochází k translokaci FXR do jádra, kde vytváří heterodimer s RXR (retinoid X receptor). Komplex FXR-RXR indukuje expresi transkripčního faktoru SHP (short heterodimer partner), který interakcí s LRH-1 (liver receptor homolog 1, také nazývaný *CYP7A1* promotor binding factor, CPF) v BARE II potlačuje expresi *CYP7A1* (Lu et al., 2000). SHP také může interagovat s HNF4 (hepatocyte nuclear faktor 4) v BARE II, a tak potlačovat aktivitu *CYP8B1*. Tímto způsobem je udržován poměr CA a CDCA (Zhang et al., 2001) (Obr. 10 a 11).



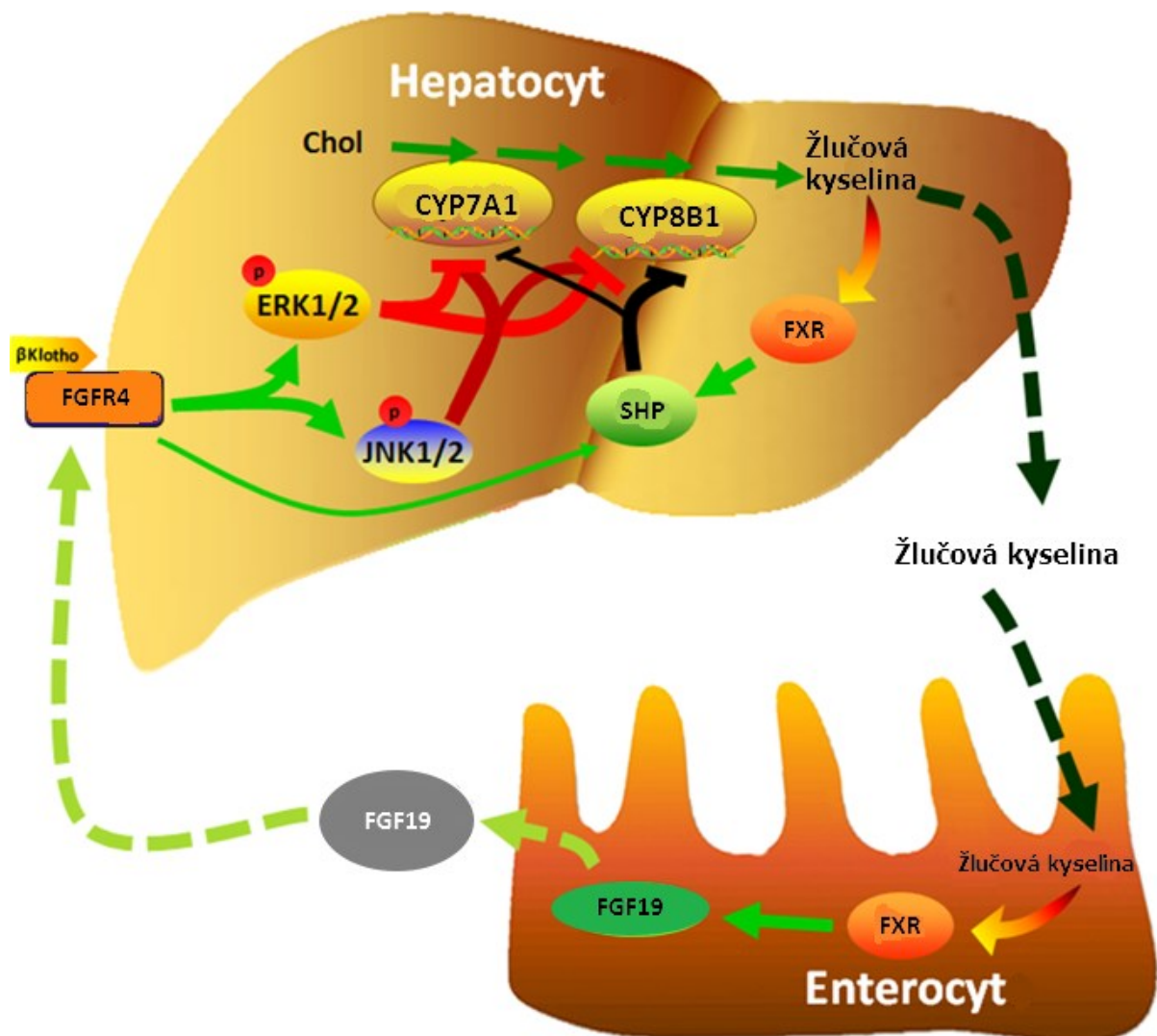
Obr. 10 – Promotor CYP7A1 obsahuje dva responzivní elementy pro žlučové kyseliny (BA) tzv. BARE (bile acid response elements). U myši a potkanů se vyskytuje typ BARE I a DR4 element, které se u člověka nevyskytují. DR4 element obsahuje vazebné místo pro LXR-RXR heterodimer. Tvorba LXR-RXR heterodimeru je iniciována vazbou oxysterolů na LXR. Aktivovaný LXR zvyšuje transkripci CYP7A1. Druhým typem reponzivního elementu BA je BARE II, který se nachází i u člověka. Aktivaci BARE II dochází, na rozdíl od aktivace BARE I, k inhibici transkripce CYP7A1. BARE II obsahuje DR 1 element pro vazbu HNF4 a vazebné místo pro LRH-1. Vazba těchto dvou faktorů je esenciální pro expresi CYP7A1. BA zprostředkovávají inhibici transkripce CYP7A1 skrze nepřímý mechanismus. BA aktivuje FXR, který následně translokuje do jádra, kde dimerizuje s RXR. Komplex FXR-RXR se váže na IR1 element, který leží v promotoru pro SHP. Touto vazbou je aktivovaná exprese SHP, který následně interaguje s LRH-1 v BARE II. Výsledkem interakce je inhibice CYP7A1. Upraveno podle Davis et al., 2002.

FXR má také v jaterní tkáni pod kontrolou NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide) mající za úkol návrat BA do hepatocytu a BSEP (bile salt export pump, ABCB11),

kteřá působí při exportu BA do žluči. V enterocytech kontroluje absorpci (IBAT), intracelulární transport (aktivuje expresi I-BABP, ileal bile acid-binding protein) a eflux BA na bazolaterální straně ($Ost\alpha/\beta$) (Hubbert et al., 2007; Kramer et al., 1999).

3.6.2 FXR/FGF19/FGFR4 regulační dráha

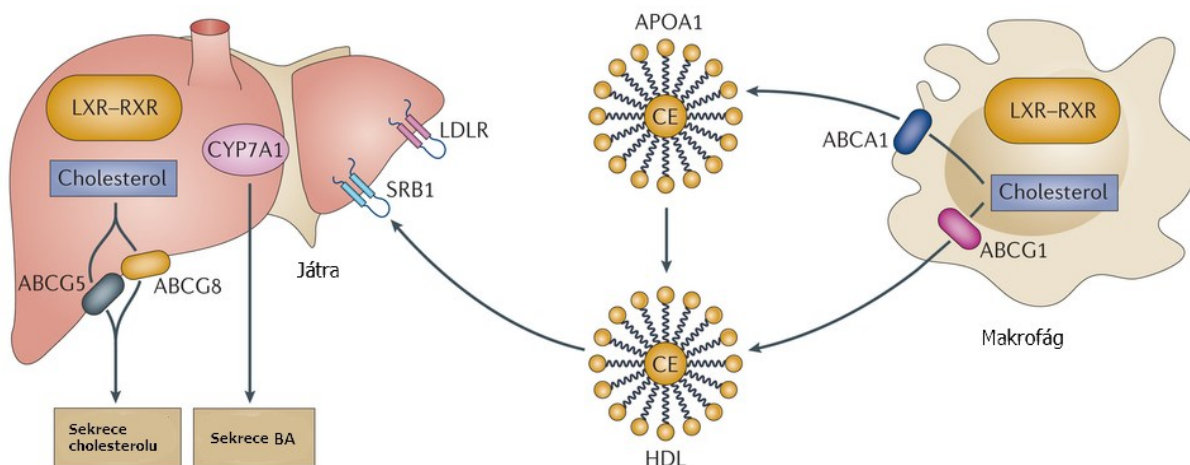
FXR regulace se uplatňuje i ve střevě. Vstřebané BA aktivují vazbou na FXR expresi FGF19 (fibroblast growth factor 19), který se váže na jaterní receptor FGFR4 (fibroblast growth factor receptor 4). Tento receptor vyžaduje přítomnost koreceptoru β -Klotho (membránově vázaná glykosidáza), který je rovněž exprimovaný v játrech. Společně aktivují signální dráhy vedoucí k inhibici transkripce *CYP7A1* (Obr. 11). Mutace tohoto receptoru má za následek zvýšenou aktivitu *CYP7A1* a zvětšování poolu BA (Yu et al., 2005).



Obr. 11 – FXR regulace v játrech a ve střevě. *Hepatocyt: BA se váže na FXR receptor, který aktivuje. Žlučovou kyselinou aktivovaný FXR se translokuje do jádra buňky, kde indukuje expresi SHP. SHP interaguje s LRH-1/HNF4 a tím inhibuje expresi CYP7A1/CYP8B1. Enterocyt: BA po vstupu do enterocytu aktivují FXR receptor. V důsledku toho dojde k sekreci FGF19. Tento faktor se naváže na receptor na povrchu hepatocytů, FGFR4 (β -Klotho koreceptor). Skrze signální dráhy, ERK1/2, JNK1/2 nebo SHP, dochází k vypnutí CYP7A1/CYP8B1.* Upraveno podle <https://eohsi.rutgers.edu/5892-2/> - aktuální k březnu 2016.

3.6.3 LXR regulační dráha

Dalším důležitým nukleárním faktorem, který se uplatňuje v regulaci exprese *CYP7A1* je jaderný receptor LXR (liver X receptor). Tento nukleární receptor váže oxysteroly, které vznikají během syntézy BA (Chen et al., 2007). LXR je exprimovaný v jaterní tkáni, ve slezině, tukové a plicní tkáni. Po navázání ligandu dochází k jeho aktivaci a následné translokaci do jádra, kde vytváří heterodimer s receptorem RXR (retinoid X receptor). Komplex LXR-RXR se váže do DR-4 elementu v BARE I promotoru (Obr. 10). Výsledným účinkem je up-regulace *CYP7A1*.



Obr. 12 – LXR regulace. *LXR se vyskytuje jak v jaterní tkáni, tak např. v makrofázích. Po navázání ligandu – oxysterolu – vytváří v jádře buňky heterodimer s RXR. Tento komplex stimuluje expresi ABCA1 a ABCG1 transportérů, které jsou odpovědné za přenos cholesterolu z buněčných membrán na částice HDL. Cholesterol je potom částicemi HDL přenášen do jater, kde je vychytáván prostřednictvím scavenger receptoru SR-B1. V játrech komplex LXR-RXR stimuluje konverzi cholesterolu na žlučové kyseliny aktivací CYP7A1 a zvyšuje odsun cholesterolu do žluči stimulací exprese ABCG5 a ABCG8.* Upraveno podle Hong et al, 2014.

LXR regulace byla popsána u myši a u potkana (Gälman et al., 2005), naproti tomu u člověka se neuplatňuje, jelikož chybí vazebné místo (DR4 element) pro LXR α v BARE oblasti (Chiang et al., 2001). V lidském promotoru *CYP7A1* je na místo DR4 elementu DR1 element pro vazbu HNF4 (Chen et al., 1999; Goodwin et al., 2008) (Obr. 10). Absence LXR vazebného místa vysvětluje různou odpověď na dietní cholesterol u hlodavců i u člověka. Aktivace LXR oxysteroly u hlodavců brání hromadění cholesterolu a organismus je tak chráněn před hypercholesterolémií. Regulace prostřednictvím LXR zajišťuje buněčnou odpověď na zvýšení obsahu cholesterolu např. přeměnou cholesterolu na BA (up-regulací *CYP7A1*), zvyšuje odsun cholesterolu z buňky zvýšením exprese ABC transportérů (Obr. 12), inhibuje intestinální absorpci cholesterolu a stimuluje tvorbu VLDL částic (Wójcicka et al., 2007).

3.6.4 Regulační dráhy nezávislé na FXR

Syntézu BA a aktivitu *CYP7A1* ovlivňují i další mechanismy, které jsou na FXR nezávislé. Za zmínku stojí např. kyselina lithocholová, vliv zánětlivých cytokinů produkovaných Kupfferovými buňkami nebo vliv glukózy, inzulínu a glukagonu účastníci se metabolismu glukózy. Úloha těchto mechanismů je ochrana jater před potencionálními toxickými účinky žlučových kyselin.

Úloha žlučových kyselin:

Primární i sekundární BA působí i jako signální molekuly v MAP kinázové kaskádě ERK1/2 (extracellular regulated kinase) vedoucí k inhibici transkripce *CYP7A1* (Dent et al., 2005) (Obr. 11). Příkladem může být sekundární BA, kyselina lithocholová (LCA) (Obr. 6), která je ligandem pro pregnanový X receptor (PXR) a receptor vitamínu D (VDR). Jejich aktivací dochází k inhibici transkripce *CYP7A1* vazbou do BARE I nebo BARE II. Přesné mechanismy nejsou známy (Li and Chiang, 2002).

Úloha cytokinů:

Mezi další mechanismy regulace *CYP7A1* je produkce zánětlivých cytokinů (TNF α a IL-1 β ; tumor necrosis faktor α a interleukin 1 β) Kupfferovými buňkami. Tyto buňky se nacházejí v játrech a fungují jako senzory relativní koncentrace BA. V případě vysoké koncentrace BA, dochází v Kupfferových buňkách k produkci výše zmíněných cytokinů. Po uvolnění cytokinů z buněk aktivují receptor TNF a následně dochází k aktivaci JNK1/2 signální dráhy (c-Jun N-terminal kinase) jejíž výsledkem je inhibice transkripce *CYP7A1* (Davis et al., 2002) (Obr. 11).

Úloha glukózy, inzulínu a glukagonu:

Exprese *CYP7A1* je regulovaná i skrze metabolismus sacharidů. Po příjmu potravy vzrůstá množství glukózy a narůstá tím produkce ATP. Klesající poměr AMP/ATP inhibuje AMP aktivovanou proteinkinázu (AMPK), která není schopna fosforylovat HNF4, a tím podporuje vazbu HNF4 do BARE II. Výsledkem je exprese *CYP7A1* (Li et al., 2010). Opačný účinek vykazuje glukagon, který je syntetizovaný převážně ve stavu na lačno, kdy je množství glukózy nedostatek. Aktivací protein kinázy A (PKA) dochází k fosforylaci HNF4 a k následné inhibici transkripce *CYP7A1* (Song et al., 2006). Naproti tomu, inzulín má dvojí efekt na expresi *CYP7A1*. Za fyziologické koncentrace rychle stimuluje expresi *CYP7A1*, zatímco dlouhodobé působení má za následek inhibici transkripce *CYP7A1*. Tyto rozdílné efekty jsou dány specifickými TF, které v jednotlivých drahách působí (Li et al., 2006). Regulace exprese glukagon-inzulín je jedním z mechanismů udržování homeostáze glukózy a energetického metabolismu (Song et al., 2006).

3.7 Sérové markery aktivity CYP7A1

Jako sérové markery aktivity *CYP7A1* jsou využívány meziproducty biosyntézy žlučových kyselin. Zpočátku byl využíván 7α -hydroxycholesterol, u kterého byla zjištěna pozitivní korelace s aktivitou *CYP7A1*, ale pouze při vyšších hodnotách enzymatické aktivity např. při onemocnění žlučovými kameny (Björkhem et al., 1987). Stanovení 7α -hydroxycholesterolu mělo nevýhody při jeho nižší sérové koncentraci, při které nekoreloval s aktivitou *CYP7A1*. Bylo demonstrováno, že cholesterol *in vitro*, podléhá autooxidaci (Axelson et al., 1988), při níž může také vznikat 7α -hydroxycholesterol, a že sám 7α -hydroxycholesterol *in vitro* je rychle přeměňován na další metabolit. U neléčených pacientů s cholelitiázou a pacientů léčených CDCA nebyla proto prokázána signifikantní korelace mezi aktivitou enzymu a koncentrací 7α -hydroxycholesterolu (Björkhem et al., 1987).

V metabolické dráze syntézy žlučových kyselin vzniká ze 7α -hydroxycholesterolu působením mikrozomální oxidoreduktázy (3beta-hydroxy-delta⁵-C27) 7α -hydroxy-4-cholesten-3-on (C4). I koncentrace tohoto metabolitu pozitivně koreluje s aktivitou *CYP7A1*, dokonce i při nižší enzymatické aktivitě. Testováním stanovení C4 za různých teplotních podmínek bylo prokázáno, že se jedná o velmi stabilní meziproduct (Gälman et al., 2005). Vzhledem k jeho stabilitě se zdá být C4 mnohem lepším markerem pro stanovení aktivity *CYP7A1* než 7α -hydroxycholesterol. Koncentrace C4 u zdravých jedinců se pohybuje mezi 6–30 ng/ml (medián

12) (Axelson et al., 1988). Při stanovení C4 je třeba brát v úvahu, že jeho koncentrace může být ovlivněna dostupností substrátu, aktivitou oxidoreduktázy (3beta-hydroxy-delta⁵-C27), rychlostí difúze/sekrece sterolů do krve a rychlostí metabolismu a eliminace (Axelson et al., 1991). Metoda stanovení C4 byla z počátku pomocí HPLC (Axelson et al., 1988), která byla jednodušší a citlivější, a proto se dalo stanovit i nižší hodnoty aktivity CYP7A1, než umožňovalo stanovení 7 α -hydroxycholesterolu pomocí GC-MS. V této době bylo i použití HPLC lépe dostupné a snadněji použitelné v klinických laboratořích na rozdíl od GC-MS. Oproti tomu v dnešní době se pro stanovení C4 používá sofistikovanější metoda LC-MS (Leníček et al., 2008).

Stanovení koncentrace C4 je dnes považováno za nejlepší sérový marker aktivity CYP7A1, který máme k dispozici (Gälman et al., 2003). V roce 2004 bylo zjištěno, že aktivita enzymu v játrech lépe koreluje s poměrem koncentrace C4 ku koncentraci celkového cholesterolu (Honda et al., 2004). Tato studie ale byla prokázána pouze na králících, nikoli u lidí (viz *Úvod*). Nicméně i přesto se nám nabízí otázka, jestli by i u lidí nebylo podobné stanovení lepším ukazatelem aktivity CYP7A1.

3.8 Klinický a výzkumný význam měření aktivity CYP7A1 pomocí sérových markerů

Možnost spolehlivého stanovení aktivity CYP7A1 může znamenat nejen pochopení některých fyziologických procesů a funkcí, ale také přispět k diagnostice, prevenci či včasné léčbě některých nemocí, obzvláště těch spojených s lipidovým metabolismem.

3.8.1 Stanovení C4 u pacientů s malabsorpcí žlučových kyselin (BAM)

Malabsorpce BA (bile acid malabsorption) je důsledkem poruchy enterohepatální cirkulace BA, nejčastěji způsobené resekci terminální části ilea. Příčinou může být i nižší exprese transportéru IBAT nebo ve vzácném případě mutace v transportéru (Ost α / β), který transportuje BA ze střeva zpět do portální krve. V důsledku poruchy cirkulace se tak BA dostávají ve zvýšené koncentraci do tlustého střeva, kde stimulují sekreci vody a elektrolytů, které pacient ztrácí po velkých kvantech. Výsledkem jsou např. vodnaté průjmy nebo v případě těžké malabsorpce, průjmy obsahující velké množství nevstřebaných tuků (steatorhea). Snížený návrat BA do jater může přispívat k tvorbě žlučových kamenů (Chadwick et al., 1973) a současně vede ke zvýšení

syntézy BA zvýšením exprese *CYP7A1*. Malabsorpce BA doprovází např. pacienty se syndromem dráždivého tračníku s průjmem (IBS-D), u kterých byla, v souvislosti s tím, pozorována zvýšená hodnota C4 (Camilleri et al., 2009) a po resekci terminálního ilea u pacientů s Crohnovou nemocí (Crohn's disease, CD). V případě pacientů s CD se podávají sekvestranty (látky vážící BA v lumen tenkého střeva a bránící jejich reabsorpci, čímž přispívají k dalšímu zvýšení exprese *CYP7A1*), po kterých mizí pacientovy průjmy, i když malabsorpce trpí nadále. Nicméně byly nalezeny i podskupiny pacientů s CD, u nichž se tato léčba průjmů sekvestranty ukázala neúčinná (Gothe et al., 2014).

Malabsorpci BA lze diagnostikovat několika způsoby, ale tyto metody mají svá úskalí. Prvním z nich je stanovení BA přímo ze stolice sbírané v rámci 24-48 hodin. Tato metoda je spolehlivá, ale nepříjemná, jak pro pacienta, tak pro laboratoře. V současné době není mnoho pracovišť, které jí používají (Walters, 2010). Druhá metoda je „selenový scan“ tzv. SeHCAT (taurocholic ⁷⁵Se acid) test. SeHCAT je metoda využívající radioaktivní izotop selenu ⁷⁵Se vázaný na konjugát kyseliny cholové s taurinem. Jeho chování ve střevě kopíruje enterohepatální oběh kyseliny taurocholové (Boyd et al., 1981). Vzhledem k dlouhému poločas rozpadu ⁷⁵Se není metoda v některých zemích včetně ČR povolena. Z tohoto důvodu se výzkum zaměřuje na hledání a používání jiných metod diagnostikování BAM a to například používáním sérových markerů jako C4 (Gothe et al., 2014; Freudenberg et al., 2013; Vijayvargiya et al., 2013; Leníček et al., 2008) nebo i markerů jako FGF19 (Leníček et al., 2011; Pattni et al., 2012).

3.8.2 Studium vlivu promotorového polymorfismu v genu *CYP7A1* na aktivitu enzymu

Na konci minulého století bylo zjištěno, že gen kódující *CYP7A1* má několik polymorfismů v regulační oblasti genu a bylo demonstrováno, že tyto polymorfismy, jmenovitě polymorfismus -203A>C, ovlivňují hladinu cholesterolu (Wang et al., 1998, Couture et al., 1999). Naproti tomu řada studií v následujících letech danou souvislost nepotvrdila (Hegele et al., 2001; Han et al., 2002; Hubacek et al., 2003). Tyto nálezy rovněž nebyly později potvrzeny jinou skupinou (Abrahamsson et al. 2005), která demonstrovala, že tyto polymorfismy neovlivňují aktivitu *CYP7A1* a není ani korelace mezi polymorfismem -203 A>C a sérovou hladinou C4. Šlo ale o studii provedenou na poměrně malém souboru (30 pacientů se žlučovými kameny a 21 kontrol), která navíc nezahrnovala -203AA homozygoty. Novější práce pak naznačila, že tyto polymorfismy spíše ovlivňují to, jak odpovídá hladina cholesterolu v krvi na změnu diety – varianta -203C by mohla být odpovědná za zvýšenou odpověď na příjem tuků a

cholesterolu v dietě („hyperresponsiveness“ cholesterolémie) (Hubáček, 2006). Ve větší studii provedené na našem pracovišti na homozygotních nositelích -203AA a -203CC variant (65 pacientů po resekci ilea a 66 kontrol) bylo potvrzeno, že v souladu s očekáváním je aktivita CYP7A1 (stanovena jako sérová koncentrace C4) zvýšená u pacientů s malabsorpcí BA po resekci terminálního ilea (Leníček et al., 2008a).

Při studiu na zdravých jedincích, byl při podání nízkocholesterolové diety pozorován výrazný pokles cholesterolémie u homozygotních nositelů -203C, na rozdíl od nositelů homozygotní kombinace -203A (Kovář et al., 2004). Dalšími pokusy provedenými na HepG2 buňkách byla pozorována vyšší exprese alely pro -203A (De Castro-Oros et al., 2011). Na základě těchto výsledků se usuzuje, že nositelé alely C pravděpodobně vytváří více proteinu CYP7A1 a efektivněji přeměňují cholesterol na BA. To je pravděpodobně příčinou, proč homozygotní nositelé alely C reagují výraznější změnou na dietní cholesterol.

3.8.3. Studium diurnální variace aktivity CYP7A1

Stanovení C4 v séru bylo také využito pro demonstraci, že aktivita CYP7A1 vykazuje diurnální variaci. Gälman et al., 2005 prokázala, že aktivita CYP7A1 vykazuje dva vrcholy – v poledne a mezi 21. -22. hodinou. Následující experimenty, které proběhly na zdravých jedincích, prokázaly denní variaci s vrcholem kolem 13. hodiny odpoledne (Kovář et al., 2010). Tento pokus byl později rozšířen o testování jedinců – homozygotů s alelou *CYP7A1* -203A a -203C. Jedinci s alelou -203A vykazovali denní variaci s vrcholem kolem poledne, zatímco jedinci s alelou -203C nikoli (Vlachová et al., 2016). Dále bylo ukázáno, že syntéza BA u člověka probíhá v opozici s cirkadiánním rytmem syntézy cholesterolu, zatímco u hlodavců jsou syntéza BA i cholesterolu synchronizovány. Tato synchronizace u hlodavců souvisí pravděpodobně s vysokými nároky na množství syntetizovaného cholesterolu, jelikož rychlost syntézy BA je daleko vyšší než u člověka. Relativně pomalá syntéza BA u lidí, tak vysvětluje rozdíly v homeostáze cholesterolu mezi druhy a také v rozvoji některých onemocnění jako ateroskleróza nebo hypercholesterolémie, které se u hlodavců nevyskytují (Gälman et al, 2005).

4. Cíle diplomové práce

V našem prvním cíli se zaměříme na úpravu metodiky stanovení C4 původně vyvinuté pro podmínky HPLC. Optimalizací, která bude spočívat především úpravě promývacích a elučních kroků, dosáhneme převedení metody na LC-MS. Od nové metody očekáváme vyšší citlivost a specifitu. V důsledku zvýšení citlivosti, dosáhneme i redukce množství vzorku a rozpouštědel.

Naším dalším cílem bude stanovení koncentrace C4 v lipoproteinech a zaměříme se také na jeho distribuci v jednotlivých částicích. Stanovení sérové koncentrace C4 je používáno jako marker aktivity CYP7A1, nicméně Honda (2004) ukázal, že C4 korigovaný na celkový cholesterol, koreluje v některých případech s aktivitou CYP7A1 mnohem lépe než samotný C4. Jelikož nás zajímá i jak je C4 distribuován, původní Hondovu myšlenku jsme se pokusili rozšířit. Vzhledem k tomu, že předpokládáme transport C4 na povrchu částic, rozhodli jsme se koncentraci C4 na povrch zkorigovat. Povrch částic nám charakterizuje volný cholesterol (FC). Pilotní data našeho pracoviště ukázala, že koncentrace C4 dominuje v HDL a distribuční poměry C4/FC jsou v LPP rozdílné. Samotná distribuce C4 v LPP se mezi pacienty podobala. Naším cílem bylo zreprodukovat tyto předběžná data a prokázat stabilní distribuční poměry C4/FC mezi pacienty. Na základě toho, bychom mohli o C4/FC uvažovat jako o novém markeru pro měření aktivity CYP7A1.

5. Materiál a metody

5.1 Materiál

5.1.1 Chemikálie a roztoky

7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on (C4) (Steraloids, USA)

Albumin 10mg/ml (New England BioLabs Inc.)

Argon X50S čistoty 99.998% (Air Products)

Destilovaná voda

Dusík, UN 1066, stlačený, 2.2 (Air Products)

Chloroform p.a. (Penta)

Cholesterol (Sigma-Aldrich)

Cholesterol-25,26,26,26,27,27,27-d₇ (Sigma-Aldrich)

Izopropylalkohol p.a. (Penta)

Metanol pro spektroskopii (Merck)

Metanol p.a. (Penta)

Metanol pro LC-MS (Biosolve)

n-hexan, HPLC grade (Scharlau)

N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (TMA) (Sigma-Aldrich)

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) Kit (Supelco)

Chlorid sodný p.a. (Penta)

Octan amonný p.a. (Sigma-Aldrich)

Ovalbumin (ROTH)

Pyridin (Sigma-Aldrich)

Reagent A Bio-Rad DCTM Protein Assay (BIO-RAD)

Reagent B DCTM Protein Assay (BIO-RAD)

Toluen p.a. (Penta)

7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on 25, 26, 26, 26, 27, 27, 27-d₇ (C4-D7) (Santa Cruz Biotechnology)

5.1.2 Biologický materiál

Buněčná linie HepG2

Séra osob lišící se hladinou cholesterolu a triacylglycerolů ($n = 6$) získaná z pracoviště preventivní kardiologie IKEM (14/10/2013)

Lipoproteinové frakce (VLDL, LDL, HDL) izolované ze séra těchto osob (14/10/2013)

5.1.3 Příprava roztoků

a. fyziologický roztok (0,9% NaCl)

Navážíme 9 g NaCl a doplníme vodou do 1 l.

b. 125 mM NaCl v 50% metanolu

Navážíme 0,3652 g NaCl, doplníme vodou do 25 ml a přidáme 25 ml metanolu.

c. chloroform-metanol 2:1

330 ml metanolu dolijeme do 1 l chloroformem.

Uchováváme v lednici v tmavé láhvi.

d. 0,4% izopropylalkohol v hexanu

720 μ l izopropylalkoholu dolijeme hexanem do 180 ml.

Množství je dostačující pro 12 vzorků.

Připravujeme těsně před spotřebou.

e. 0,6% izopropylalkohol v hexanu

360 μ l izopropylalkoholu, doplníme hexanem do 60 ml.

Množství je dostačující pro 10 vzorků.

Připravujeme těsně před spotřebou.

f. 30% izopropylalkohol v hexanu

1 díl izopropylalkoholu smícháme se 2 díly hexanu.

g. metanol s 0,2% octanem amonným

Navážíme 0,2 g octanu amonného a doplníme metanolem do 100 ml.

h. 10 x PBS

Navážíme:

80 g chloridu sodného

2 g chloridu draselného

2 g dihydrogenu fosforečnanu draselného

23,4 g hydrogenu fosforečnanu sodného

1 peletu hydroxidu sodného.

Vše rozpustíme v 900 ml destilované vody, upravíme pH a doplníme destilovanou vodou na 1000 ml. Roztok nakonec přefiltrujeme.

5.1.4 Laboratorní vybavení – nástroje

Automatická pipeta 0,5–10 μ l (Discovery+)

Automatická pipeta 100–1000 μ l (Kartell, Discovery+)

Automatická pipeta 1–5ml (Kartell, Biohit, Discovery+)

Automatická pipeta 20–200 μ l (Kartell, Biohit, Discovery+)

Centrifugační zkumavky 15ml, 50ml (Kartell)

Mikrozkumavky 0,5ml, 1,5ml, 2ml (Bioplastics)

Chirurgické rukavice S, M (evercare, sempercare)

Korkové a gumové špunty

Krimpovací víčka na vialky pro GC-MS 8mm Crimp Seals with Teflon Faced Neoprene (Supelco)

Krimpovací a odkrimpovací kleště (National Scientific, dod.: Chromservis)

Laboratorní sklo (Simax)

Mikrotitrační destička

Multikanálová pipeta 20–200 μ l (Discovery+)

Multikanálová pipeta 5–50 μ l (TIPCR-M⁺)

Parafilm (Bemis)

Petriho misky plastové

Předkolonka – Strata SI-1 Silica 100mg/1ml (Phenomenex)

Skleněné stříkačky pro SPE – MICRO-MATE 20CC INTERCHANGEABLE SYRINGES HOSPI-PAK (popper&sons, inc)

Stříkačka 2,5 ml (Chirana)

Stříkačka s jehlou pro inzulín TERUMO SYRINGE without needle 1ml (Terumo)

Špachtle a lžičky na vážení

Špičky na pipety 0,1–10 μ l, 100–1000 μ l, 200 μ l, 5 ml (ROTH)

Vialky hnědé 8ml s víčky AMBER VIALS (Thermo Scientific)

Vialky pro GC-MS (Chromacol, dod: Chromservis)

Vialky s víčky pro LC-MS (Thermo Scientific)

5.1.5 Laboratorní vybavení – přístroje

Analytické váhy HM-120 (AND)

Centrifuga – CPR Centrifuge (Beckman)

Centrifuga – Rotanta 460R Zentrifugen (Hettich)

Čtečka mikrotitračních destiček – Microplate Reader (ELISA) Digi Scan (Asys Hitech)

Digestoř – Airflow – monitoring (dod.: Merci)

Laboratorní váhy (KERN)

Lednice s mrazákem (Liebherr)

Mrazák (Dairei)

Odpařovací blok (Lab-Line)

Odpařovací blok Thermo 120 (UOCHB)

Předkolonka se silikagelem (Supelco)

Sonikátor – PS03000A Ultrasonic Compact Cleaner 2,5l (Powersonic)

Stolní centrifuga Multi-Spin MSC-6000 (bioSan)

Stolní třepačka – Mini Rocker-Shaker (bioSan)

Úpravna vody Aqua 35 Complet (Millipore),

Vortex-genie2 (Scientific Industries Si)

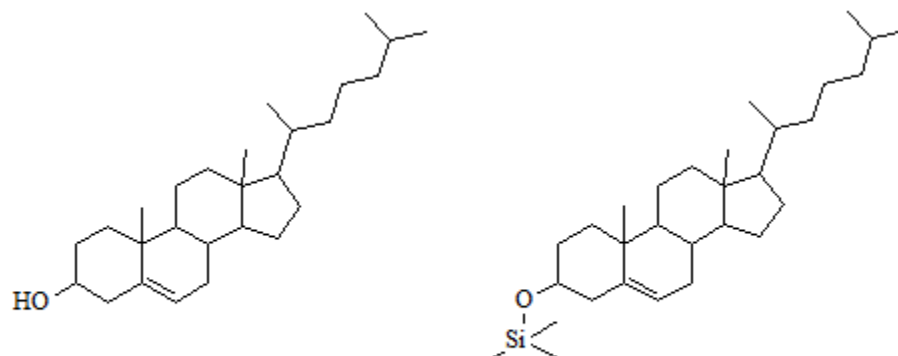
5.2 Metody

5.2.1 Měření volného cholesterolu na GC-MS:

Postup práce:

Do 1,5ml plastových mikrozkušavek bylo napipetováno 40 μ l vzorku, 40 μ l deuterovaného cholesterolu (D7, rozpuštěného v metanolu o $c = 5$ mmol/l), 600 μ l hexanu a 300 μ l vody. Tento roztok byl následně promíchán a stočen na centrifuze o cca 3000 ot/min. po dobu tří minut. Horní hexanová fáze byla přepipetována do čistých 1,5ml mikrozkušavek. Následně byla fáze odpařena pod dusíkem na vyhřívacím bločku o teplotě 65 °C. Do odparu bylo přidáno 50 μ l derivatizační směsi (Obr. 13) a ponecháno 30 min. derivatizovat v uzavřené zkumavce při pokojové teplotě. Směs byla opět odpařena a rozpuštěna ve 100 μ l hexanu (v pozdějších měřeních, viz níže *Poznámka k metodě*, bylo používáno nanesení vzorku přímo v derivatizační směsi, při kterém byla pozorována lepší odezva). Rozpuštěný odparek byl přepipetován do

vialek na GC-MS. Následně byl odparek rozdělen na koloně a detekován v hmotnostním spektrometru. Byly odečteny odezvy pro cholesterol (iont o m/z 458) a pro D7 (iont o m/z 465).



A. Cholesterol před derivatizací

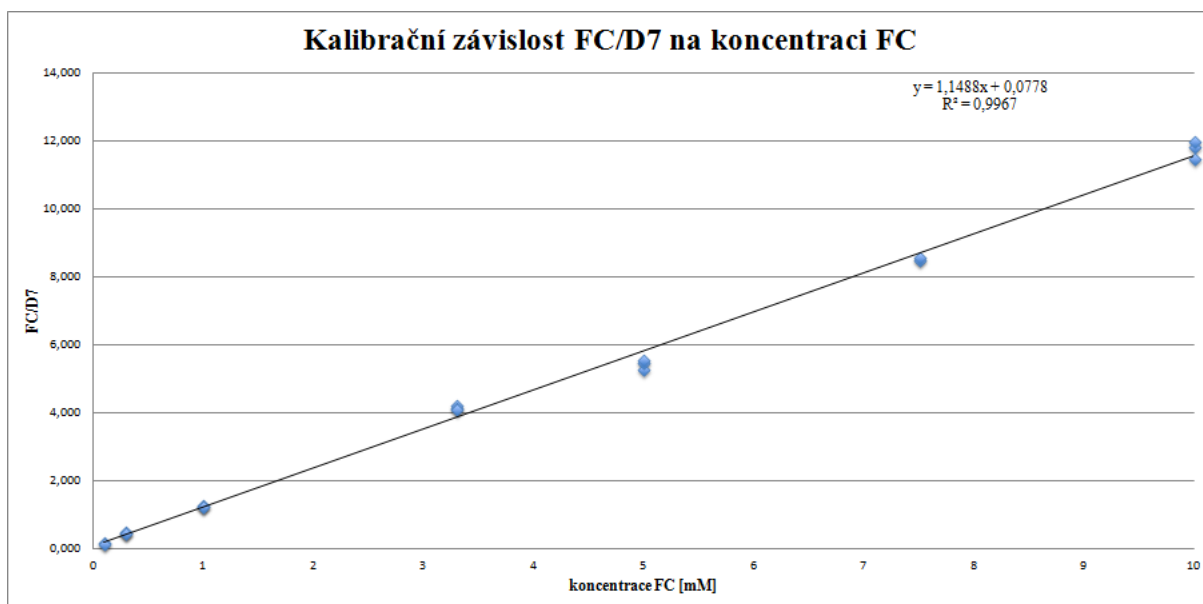
B. Cholesterol po derivatizaci

Obr. 13 – Struktura cholesterolu před a po derivatizaci. Obrázek A. je struktura cholesterolu. Obrázek B. je cholesterol po derivatizaci TMA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid). Na OH skupině je navázaný trimetyl silylový zbytek.

Vyhodnocení:

Nejprve byl odečten signál z detektoru GC-MS pro FC i D7 a hodnota odezvy pro FC byla vztažena na hodnotu odezvy pro D7. Kalibrační přímka byla sestrojena po vynesení signálu v závislosti na koncentraci cholesterolu. Z rovnice lineární regrese byly dopočítávány koncentrace neznámých vzorků (Graf 1).

Graf 1 – Kalibrační funkce pro měření FC metodou GC-MS. Osa x obsahuje hodnoty koncentrace FC v mM, osa y poměr odezvy detektoru GC-MS pro FC/D7.



Výpočet koncentrace FC pomocí rovnice lineární regrese:

$$y = 1,1488x + 0,0778$$

$$x = (y - 0,0778) / 1,1488$$

y= poměr FC/D7 pro daný vzorek

x= koncentrace FC pro daný vzorek [mM]

Poznámka k metodě:

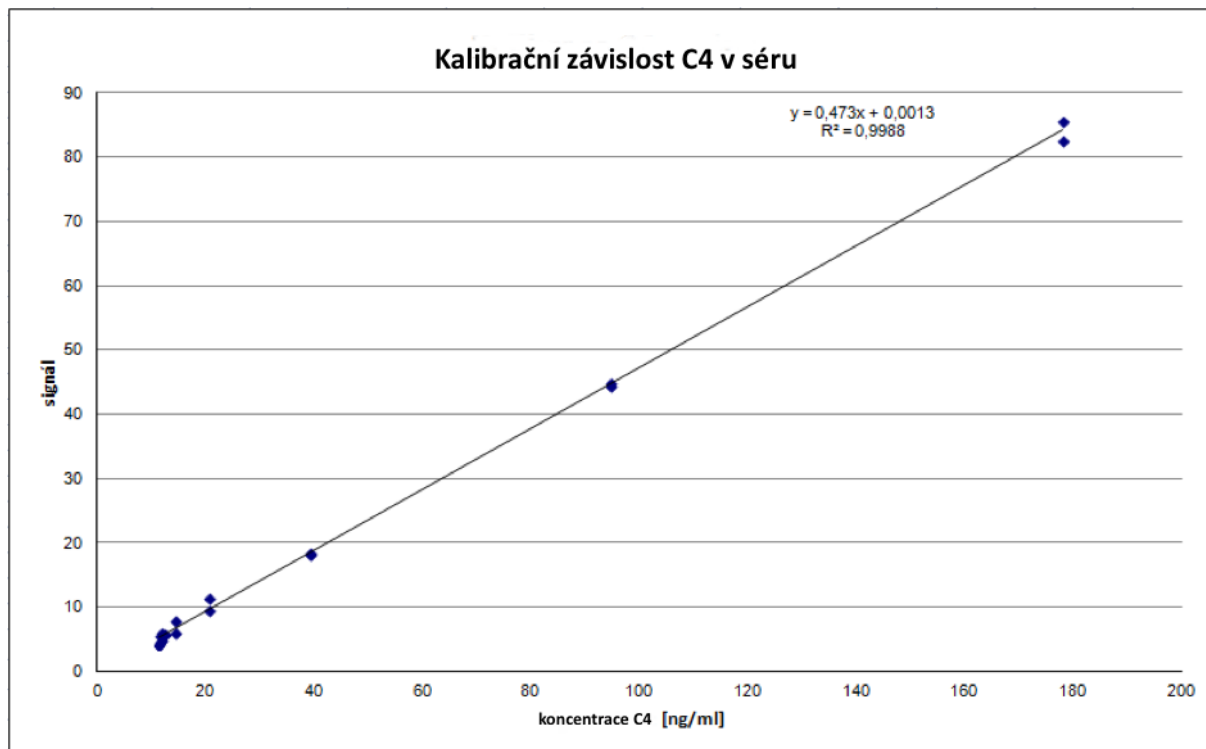
Metoda měření volného cholesterolu na GC-MS byla již zavedena (Kovačiková, 2013). Přesto jsme se pokusili zjednodušit manipulaci se vzorkem v posledním kroku, tj. nanesení vzorku na kolonu. Testovali jsme aplikaci vzorku jak v hexanu, tak i v samotném derivatizačním činidle TMA. Měřením jsme zjistili, že nanesení vzorku v derivatizačním činidle poskytuje o řád vyšší hodnotu než v hexanu (Tab. 2). Vysvětlujeme si to tím, že po odpaření TMA a převedení odparku do hexanu, dochází k odtržení některých silylových zbytků zpět do rozpouštědla, a tím i úbytkům derivatizovaných cholesterolů. Aplikace v TMA má výhodu ve snadnější manipulaci, rychlejší přípravě vzorku a vyšší citlivosti metody, je však poměrně nešetná k analytické koloně. Zejména kvůli vyšší citlivosti jsme se rozhodli nanášet na kolonu vzorky v TMA.

Tab. 2 – Srovnání odezvy detektoru GC-MS pro vzorky v hexanu a v derivatizačním činidle. *Koncentrace cholesterolu v [mM] obsahuje tři koncentrace 10, 2,5 a 0,6 mM cholesterolu. Každá koncentrace obsahuje vzorek-hexan připravený výše popsáním postupem, tzn. po derivatizaci je činidlo odpařeno a vzorek rozpuštěn v hexanu a v něm aplikován do přístroje. Od každé koncentrace je připraven a aplikován do stroje i vzorek-TMA tzn. vzorek v derivatizačním činidle. Aplikace vzorku přímo v derivatizačním činidle vede ke zhruba desetinásobné odezvě detektoru.*

Koncentrace cholesterolu [mM]	Odezva pro cholesterol	Odezva pro D7
10 (hexan)	2337482	147358
10 (TMA)	16922493	1248426
2,5 (hexan)	880417	300826
2,5 (TMA)	6759373	1913305
0,6 (hexan)	310457	473900
0,6 (TMA)	3912756	5655771

5.2.2 Šablona pro výpočet koncentrace C4 v séru

Graf 2 – Kalibrace C4 v séru. Osa x popisuje koncentraci C4 v séru v jednotkách ng/ml, osa y odezva detektoru.



Výpočet koncentrace C4 v séru:

$$c = \frac{\left(\frac{m(C4 - D7) \times plochaC4}{plocha(C4 - D7) \times V} \right) - 0,0013}{0,473} [ng / ml]$$

V= objem vzorku (0,15 ml)

m(C4-D7) je hmotnost přidaného vnitřního standardu (6,82 ng)

Vzorek je rozpuštěn ve 40 µl 75% metanolu a nástřik na kolonu LC-MS je 8 µl.

5.2.3 Měření C4 na LC-MS

Podmínky měření na přístroji:

Kolona byla vyhřívána na 40 °C a nástřikový objem byl 8 µl vzorku ze 40 µl vzorku rozpuštěného v 75% metanolu. Průtok kolonou činil 0,3 ml/min. Vzorek byl rozdělen za použití gradientu tří fází: A metanol, 0,2% octan amonný (w/v), B metanol, C H₂O (Gradient viz Tab 3).

Gradient:

C4 je eluován rostoucí koncentrací metanolu, přičemž retenční čas C4 je mezi 8. a 9. minutou (Obr. 14 viz *Přílohy*). Kolona je následně promyta vysokou koncentrací metanolu a ekvilibrována na počáteční podmínky.

Tab. 3 – Gradient fází analýzy C4 na LC-MS.

Čas (min)	Fáze A (%)	Fáze B (%)	Fáze C (%)
0	50	32	18
7	50	32	18
8	50	40	10
10	50	40	10
12	50	49	1
17	50	32	18
20	50	32	18

Nastavení MS detekce:

Pro analýzy byl zvolen tzv. SIM mód, při kterém se v kvadrupólu Q1 nastaví hodnoty m/z iontů, jež následně podstoupí fragmentaci v kolizní cele (Q2) srážkami s argonem na specifické produktové ionty/fragmenty, které jsou měřeny pomocí nastavení kvadrupólu Q3. Jako kolizní plyn byl použit argon o tlaku 1,0 mTorr. Za podmínek analýzy se měřené analyty ionizují za tvorby protonovaných molekul $[M+H]^+$ (C4 tak tvoří ion o m/z 401,4 a deuterovaný standard C4 poskytuje ion s m/z 408,4). Pro **C4** byly monitorovány přechody s m/z 401,4 → 177,3 a 401,4 → **383,6**. Pro vnitřní standard (**C4-D7**) byly monitorovány přechody s m/z 408,4 → 184,3 a 408,4 → **390,6**. Během prvních 5 minut byl eluát z kolony přesměrován do odpadu, do detektoru byl eluát z kolony směřován pouze v časovém rozmezí 5–10,59 minut. Pak byl eluát opět odváděn do odpadu. C4 a C4-D7 odezvy byly pozorovány mezi 8. a 9. minutou (Obr. 14 viz *Přílohy*).

5.2.4 Detekce proteinů z hepatocytů

Přístroj pro měření mikrotitračních destiček:

Microplate Readers (ELISA) Digi Scan (Asys Hitech)

Postup práce:

Z buněčné kultury hepatocytů bylo odsáto médium a byly 3× propláchnuty 1 ml PBS. Seškraby kultury v PBS byly odpipetovány do plastové mikrozkušavky a následně stočeny na centrifuze o cca 4000 g/min po dobu tří minut. Po odsátí PBS byla peleta lyzována ultrazvukem v 1 ml PBS. Do mikrotitrační destičky byly napipetovány všechny vzorky v tripletech po 5 μ l. Ke vzorkům bylo přidáno 25 μ l Reagent A Bio-Rad DC™ Protein Assay a 200 μ l Reagent B DC™ Protein Assay. Vzorky byly ponechány přikryty před světlem po dobu 30 min. a následně proměřeny v přístroji při vlnové délce 640 nm. Kalibrační přímka byla sestrojena z roztoku albuminu v koncentračním rozmezí 0–2 g/l.

6. Výsledky

6.1 Převod metody stanovení C4 z HPLC na LC-MS

Převod metody C4 z HPLC (Leníček et al., 2008b) na LC-MS měla zásadní význam pro naše měření. Přechod metodiky z HPLC na LC-MS znamenal zvýšení citlivosti, ale i specifity metody. Se zvýšením citlivosti dochází i k redukci objemu vzorku, kterého v některých případech bývá velmi málo a tím dochází i k úspoře materiálu.

Lipidová extrakce:

V původní HPLC metodě je extrahován C4 z 1 ml séra, ke kterému je přidáno 30 ng C4-D7 / 80 μ l metanolu, 5 ml chloroformu s metanolem (2:1, v/v). Směs je následně stočena na centrifuze o 2000 g /3 min. Horní fáze je odpipetována a k dolní je přidáno 2 ml 125 mmol/l NaCl v 50% metanolu (vol/vol). Roztok je opět stočen na centrifuze, horní fáze odpipetována a dolní je odpařena při 60 °C. Při přechodu na novu metodu LC-MS byl objem vzorku upraven na 150 μ l, čímž se proporcionalně snížili i objemy dalších roztoků.

Výsledný, optimalizovaný postup lipidové extrakce:

Do 1,5ml plastové mikrozkušavky bylo napipetováno 40 μ l C4-D7, 150 μ l séra, 100 μ l fyziologického roztoku, 1 ml chloroform-metanolu (2:1 v/v). Roztok byl promíchán a stočen na centrifuze o nízkých otáčkách (cca 3000 g) po dobu 3 min. Horní fáze byla odsáta a do dolní fáze přidáno 0,5 ml 125mM NaCl v 50 % metanolu (v/v). Roztok byl opět promíchán a stočen na centrifuze. Horní fáze byla znovu odsáta a dolní fáze přepipetována do 1,5ml mikrozkušavek a následně odpařena při 60 °C dusíkem.

V dalším kroku dochází k přípravě Si kolonky. Kolonka je pročištěna promytím 1 ml hexanu a následně 1 ml izopropylalkoholu. Do odparku v mikrozkušavce je přidán 1 ml toluenu pro jeho rozpuštění. Vzorek je pak nanesen na Si kolonku.

SPE extrakce (solid phase extraction):

Vzorek, který je nanesen na kolonku obsahuje, kromě důležitého C4, také cholesterol, oxysteroly a další kontaminanty, které by nám mohly způsobit interferenci během měření C4 na LC-MS. Naším cílem bylo namíchat takový roztok, který by v ideálním případě vymyl

všechn cholesterol, příp. další příměsi, ale zachoval veškerý C4. V původní HPLC metodě jsme pracovali s 15 ml roztoku 0,4% izopropylalkoholu v hexanu (izo v hex). Tento objem je nepřijatelný z hlediska spotřeby organických činidel a také náročnosti na manipulaci s tak velkým objemem. V primárním měření jsme se pokusili snížit objem promývacího roztoku na pouhé 3 ml s tím, že zvýšíme koncentraci roztoku izo v hex. Zajímalo nás, jaké budou ztráty cholesterolu i C4. Testovali jsme koncentrace 0,4–0,8–1,6 a 3,2% izopropylalkohol v hexanu. Jednotlivé frakce jsme zachytávali do zkumavek a následně zpracovali metodami na měření cholesterolu a C4. Výsledkem byla téměř 100% ztráta C4 již při koncentraci 1,6% izo v hex a objemu 3 ml. Při koncentraci 0,8% izo v hex se v primárním měření vymývala pouze polovina cholesterolu, z tohoto důvodu jsme objemy navyšovali. Znovu jsme tedy testovali promývací roztok tentokrát v rozmezí 0,4 až 0,8 % izo v hex. Ze všech promývacích roztoků, které jsme připravili, jsme nakonec našli ten, při kterém dochází k téměř 100 % vymytí cholesterolu, ale k minimálnímu vymytí C4 (max. 0,2%). Tento roztok je o koncentraci 0,6 % izo v hex a objemu 6 ml (Tab. 4).

Tab. 4 – Optimalizace promývacího kroku SPE metody.

	Promývací roztok		
	Koncentrace izopropylalkoholu v hexanu		
	0,4%	0,6%	0,8%
ztráta cholesterolu (%)	4±0,01	98,66±1,00	100
ztráta C4 (%)	0	<u>0,2</u> ±0,03	100

Eluce:

Podobnou úpravou prošel i eluční krok. V tuto chvíli je na kolonce C4, který potřebujeme vymýt. Původně jsme používali 1 ml 100% izopropylalkoholu. Izopropylalkohol má vyšší viskozitu a tudíž hůře prochází kolonkou než např. hexan a vzhledem k tomu, že je méně těkavý se i pomaleji odpařuje. Eluční roztok o menším objemu a větším zastoupení hexanu by pro nás znamenala časovou úsporu. Testovali jsme 0,5 ml 30, 50, a 75% izopropylalkohol v hexanu. Stejně jako v promývacím kroku jsme jednotlivé eluáty zachycovali do zkumavek, odpařili a výše zmíněnými metodami zjistili množství FC a C4. Výsledky ukázaly, že 0,5 ml 30% izopropylalkoholu v hexanu je na vymytí veškerého C4.

6.1.1 Opakovatelnost (intrassay variability) a reprodukovatelnost (interassay variability)

Pro stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti jsme potřebovali vzorky o různých koncentracích C4. Pro měření jsme zvolili tři hodnoty, dvě krajní a hodnotu prostřední, blíží se mediánu pro koncentraci C4. Výchozí vzorek o koncentraci C4 104 ng/ml jsme naředili ovalbuminem (50 mg/ml) na koncentraci 17 a 4 ng/ml. V prvním dni bylo zpracováno 5 alikvotů každého ze tří vzorků a z naměřených hodnot byla stanovena opakovatelnost. V následujících čtyřech dnech byly zpracovány stejným způsobem další připravené alikvoty všech tří vzorků. Průměrné hodnoty zjištěné v jednotlivých dnech byly použity pro výpočet reprodukovatelnosti (Tab. 5).

Pro jednotlivé koncentrace byl spočítán variační koeficient, ukazující přesnost měření. Jeho hodnota do 5 % je velmi přesná, do 15 % uspokojivá.

Tab. 5 – Opakovatelnost a reprodukovatelnost. *Měřili jsme sérové koncentrace C4 ve třech koncentracích 4, 17, 104 [ng/ml] variační koeficient CV ukazuje přesnost měření.*

	Opakovatelnost	Reprodukovatelnost
c [ng/ml]	CV [%]	CV [%]
4	10	10
17	8	4
104	2	1

6.1.2 Stanovení limitu detekce (LD) metody LC-MS

Na nově optimalizovanou metodu stanovení C4 byla vytvořena kalibrace C4 v roztoku ovalbuminu (50 mg/ml). U ovalbuminu není známo, že by obsahoval endogenní C4. Pro měření byly sériovým ředěním připraveny roztoky C4 od koncentrace 125 ng/ml po 1,3 ng/ml a roztok ovalbuminu o koncentraci 50 mg/ml (Graf 3). Z hodnoty signálu v místě retenčního času analytu (C4) ve slepém vzorku byl určen detekční limit.

Definice limitu detekce:

Limit detekce je určen jako nejmenší koncentrace analytu, kdy látka ještě vyvolá odezvu (S) měřicího přístroje (rozpoznatelnou od ostatních vlivů), která je větší než je trojnásobek úrovně šumu (N) pozadí $S/N=3$.

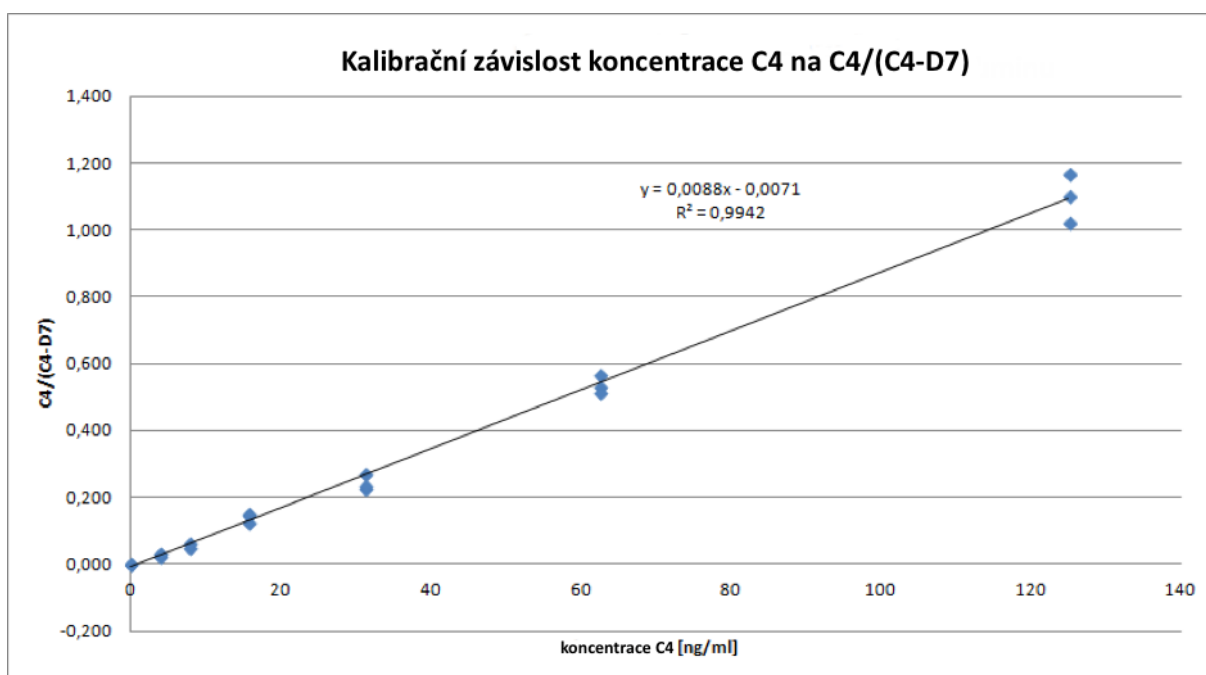
Výpočet limitu detekce:

kalibrační funkce: $y = kx + q = 0,0088x + 0,0071$

$y = 0,00514$, průměrná hodnota $C4/(C4-D7)$ pro blank (hodnota $C4$ blanku je spočtena jako integrál odezvy v čase odpovídající výstupu $C4$ vynásobena $3\times$)

$x = c = (0,00514 + 0,0071) / 0,0088 = 1,39 \text{ ng/ml (LD)}$

Graf 3 – Kalibrace $C4$ v ovalbuminu pro optimalizovanou metodu SPE. Osa x popisuje koncentraci $C4$ v ovalbuminu, osa y poměr hodnoty signálu detektoru pro $C4/(C4-D7)$.



6.1.3. Testování citlivosti metody LC-MS

V dalším kroku jsme se rozhodli otestovat, zda je nová metoda dostatečně citlivá pro stanovení koncentrace $C4$ v jaterní buněčné linii HepG2. Pro experiment jsme použili 3 kontrolní misky s buněčnou kulturou HepG2, 3 misky ovlivněné $10 \mu\text{M}$ a 2 misky ovlivněné $50 \mu\text{M}$ koncentrací BA (CDCA). Víme, že BA potlačují aktivitu CYP7A1, a proto v těchto sadách očekáváme nižší koncentraci $C4$.

Tab. 6 – Koncentrace C4 v HepG2 linii. Tabulka popisuje v prvním sloupci, který homogenát je a není ovlivněný BA, druhý a třetí sloupec představuje průměrné koncentrace C4 a proteinu a poslední sloupec stanoví množství C4 na protein.

Buněčný homogenát	c(C4) [ng/ml]	c(protein) [g/l]	C4[ng]/protein[mg]
Bez BA	1,982	2,039	0,972
	1,972	2,201	0,896
	1,449	2,301	0,630
10μM BA	1,561	1,653	0,945
	1,509	1,815	0,831
	1,445	1,715	0,843
50μM BA*	<1,39 (0,820)	1,292	<1,07
	<1,39 (0,546)	1,491	<0,93

* V případě buněk ovlivněných 50 μ M BA se hodnoty C4 nacházejí pod limitem detekce, naměřené hodnoty (uvedené v závorce) tak nelze brát jako věrohodné.

Vzhledem k našim výsledkům, jsme se rozhodli stanovit i limit kvantifikace.

Limit kvantifikace (LQ) je definován jako koncentrace, kdy látka vyvolá odezvu měřicího přístroje, která je větší než desetinásobek úrovně šumu na pozadí $S/N = 10$ nebo také je odhadován jako trojnásobek LD. V našem případě $LQ = 4,17$ ng/ml.

Na základě LQ a Tab. 6 je patrné, že metoda v tomto případě není tak citlivá, ale vzhledem k našemu $LD = 1,39$ ng/ml se nad ním nacházíme alespoň u sady HepG2 neovlivněné BA a ovlivněné 10 μ M BA. V případě poslední sady jsme výrazně i pod limitem detekce.

6.2 Distribuce C4 v lipoproteinových částicích (LPP)

Pro stanovení distribuce C4 v LPP jsme měli k dispozici celkem 6 vzorků pacientů (IKEM) s rozdílnou hladinou cholesterolu, rozdělené ultracentrifugací na jednotlivé LPP – VLDL, LDL a HDL. U každého lipoproteinu ze séra jsme provedli měření FC a C4 výše popsanými metodami. Stanovené hodnoty jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 7 – Hodnoty volného cholesterolu (FC) a cholestenu (C4) v lipoproteinech ze séra.
U každého pacienta A-F jsme pracovali celkem se 4 typy vzorků: plazmou, VLDL, LDL a HDL.
U všech byla změřena koncentrace FC (GC-MS) a C4 (LC-MS).

Pacient	A			B		
	chol[mM]	FC[mM]	C4[ng/ml]	chol[mM]	FC[mM]	C4[ng/ml]
Plazma	2,25	1,60	34,59	4,09	1,10	16,59
VLDL	2,59	0,33	6,26	0,43	0,39	2,07
LDL	5,21	1,69	18,91	3,22	0,81	8,20
HDL	0,96	0,14	12,40	1,12	0,14	7,58

Pacient	C			D		
	chol[mM]	FC[mM]	C4[ng/ml]	chol[mM]	FC[mM]	C4[ng/ml]
Plazma	5,57	1,59	40,24	4,83	1,01	3,81
VLDL	0,87	0,37	9,71	0,11	0,02	0,10
LDL	5,61	1,82	14,91	4,0	0,91	1,76
HDL	0,89	0,09	12,58	1,30	0,13	1,56

Pacient	E			F		
	chol[mM]	FC[mM]	C4[ng/ml]	chol[mM]	FC[mM]	C4[ng/ml]
Plazma	6,21	2,70	27,58	6,24	1,78	11,59
VLDL	0,39	0,04	8,82	0,25	0,03	6,31
LDL	7,21	2,41	28,33	6,95	2,05	6,91
HDL	0,72	0,20	14,22	1,20	0,28	4,23

V dalším kroku bylo nutné určit distribuční poměr C4 v jednotlivých LPP. Hodnoty koncentrace C4 jsme vztáhli na povrch LPP, charakterizovaný FC. Hodnoty těchto poměrů shrnuje Tab. 7. Ze samotných dat je patrné, že distribuce C4 je v jednotlivých LPP rozdílná. Dále nás zajímá, zda jsou distribuční poměry podobné i mezi pacienty. Abychom mohli lépe vizuálně porovnávat hodnoty poměrů C4/FC mezi jednotlivými pacienty, považovali jsme hodnotu C4/FC LDL za referenční (tj rovnou 1) a poměry C4/FC v ostatních frakcích jsme vztáhli k ní (Tab. 8).

Tab. 8 – Distribuce C4 po vztažení na povrch LPP u pacientů s metabolickým onemocněním. VLDL, LDL a HDL jsou izolované LLP ze séra šesti pacientů (A-F). Poměr koncentrací C4/FC charakterizuje distribuci C4 v povrchu LPP. Hodnoty C4/FC vztaženo na LDL jsou určeny k porovnávání distribuce C4 mezi pacienty.

Pacient	A		B		C	
	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztažen na LDL	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztažen na LDL	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztažen na LDL
VLDL	18,97	1,7	5,31	0,5	26,24	3,2
LDL	11,19	1,0	10,12	1,0	8,20	1,0
HDL	88,57	8,0	54,14	5,3	139,78	17,0

Pacient	D		E		F	
	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztažen na LDL	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztažen na LDL	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztažen na LDL
VLDL	5,00	2,6	220,50	18,7	210,33	62,4
LDL	1,93	1,0	11,75	1,0	3,37	1,0
HDL	12,00	6,2	71,10	6,0	15,11	4,48

Z hodnot Tab. 8 vidíme, že se C4 nachází ve většině případů v částicích HDL, ale i po vztažení C4/FC na LDL, nenacházíme podobnou distribuci C4 mezi pacienty (výsledky pilotního projektu viz. Příloha Tab. 9).

7. Diskuze

V rámci této diplomové práce se podařilo optimalizovat extrakční kroky metody používané pro stanovení C4 tak, že bylo možné stanovení převést z HPLC (Leníček et al., 2008b) na LC-MS. Při sledování distribuce C4 v jednotlivých LPP jsme zjistili, že distribuce C4 neodpovídala distribuci FC v jednotlivých lipoproteinech. Distribuční poměr C4/FC v LPP se nepodobal ani mezi pacienty navzájem, čímž jsme nepotvrdili předchozí nálezy z pilotního pokusu provedeného na našem pracovišti (Kovačiková, 2013) (*Příloha* Tab. 9). Vzájemná podobnost distribučního poměru C4/FC byla nutným předpokladem pro nalezení parametru pro měření aktivity CYP7A1.

Převod metody stanovení C4 z HPLC na LC-MS

V rámci optimalizace metody HPLC se nám podařilo o 60 % snížit objem organických rozpouštědel použitých pro extrakci (*Příloha* Tab. 10). Zvýšení koncentrace izopropylalkoholu v hexanu z 0,4 % na 0,6 % při promývání kolonky vedlo k účinnému odstranění cholesterolu a dalších kontaminantů (oxysterolů apod.) a nesnížilo účinnost extrakce C4. Tyto modifikace vedly nejen k převodu metody z HPLC (Leníček et al., 2008b) na LC-MS, ale také ke zvýšení citlivosti metody (cca 7krát více než HPLC). V důsledku toho jsme mohli snížit výrazně i objem vstupního vzorku používaného pro analýzu.

U metody jsme provedli testy na inter- a intraassay variabilitu, které prokázaly její spolehlivost (Tab. 5). Pro zjištění limitu detekce/kvantifikace jsme testovali vzorek obsahující C4 v roztoku ovalbuminu, u nějž není známo, že by obsahoval C4. Ani naším měřením jsme přítomnost C4 v ovalbuminu nezaznamenali. Hodnotu limitu detekce jsme stanovili na 1,39 ng/ml C4 a limit kvantifikace 4,17 ng/ml C4.

Jako modelový systém pro otestování citlivosti jsme zvolili buněčnou linii HepG2 buněk (Wang et al., 1996). Tato buněčná linie nám posloužila jako komplexní matrice pro měření C4. Pro ovlivnění koncentrace C4 v buňkách jsme využili skutečnosti, že BA jako zpětnovazebné inhibitory CYP7A1 působí jako represory své vlastní syntézy a snižují tedy i produkci C4 (Li-Hawkins et al., 2002). Koncentrace C4 byla detekovatelná v homogenátu HepG2 buněk inkubovaných v nepřítomnosti BA a buněk inkubovaných s BA o koncentraci 10 μ M, nikoli v buňkách inkubovaných v přítomnosti 50 μ M BA. Není jasné, zda je aktivita CYP7A1 v tomto experimentálním modelu v přítomnosti 50 μ M BA již plně inhibována nebo zda množství

buněk, které jsme pro stanovení koncentrace C4 použili bylo dostatečné. V dalších experimentech by mělo být ověřeno, zda lze zvýšením množství buněk použitých pro extrakci C4 dosáhnout limitu detekce C4 i v přítomnosti vysoké koncentrace BA v průběhu inkubace.

Distribuce C4 v lipoproteinových částicích (LPP)

Již první práce zabývající se vztahem mezi plazmatickou koncentrací C4 (7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on) a aktivitou CYP7A1 prokázala signifikantní korelaci mezi oběma parametry (Axelson et al., 1988). V roce 2004 bylo demonstrováno, že poměr C4/celkový cholesterol koreluje s aktivitou enzymu lépe než samotná koncentrace C4 (Honda et al, 2004). Je třeba zdůraznit, že v této práci byli použiti králíci na standardní a cholesterolové dietě a rozdíly v cholesterolémii mezi oběma experimentálními skupinami byly řádové. Pokud nebylo této korekce použito, nebyl mezi aktivitou enzymu a C4 žádný vztah. Toto pozorování lze vysvětlit tím, že C4 musí být v plazmě transportován podobně jako jiné lipidy částicemi lipoproteinů. Akumulace LPP v plazmě u králíků s dietně indukovanou hypercholesterolémií je spojena i se vzestupem koncentrace metabolitů, které transportují. Cholesterol je v LPP přítomen ve dvou formách – jako hydrofobní estery cholesterolu, transportované v jádru/uvnitř těchto částic a jako amfipatický volný cholesterol (FC) nacházející se na jejich povrchu. Vzhledem k tomu, že C4 podobně jako FC nese i hydrofilní skupinu, je pravděpodobné že i C4 se nachází na povrchu lipoproteinů. Pro to svědčí i skutečnost, že může být velice rychle vyměňován mezi částicemi LPP (Kovář a Leníček – nepublikovaná data). Lze tedy předpokládat, že distribuce C4 mezi jednotlivými LPP by měla odpovídat distribuci FC nebo fosfolipidů jako další povrchové složky lipoproteinů. Rovněž nelze vyloučit, že koncentrace C4 by měla být korigována spíše na koncentraci FC než na koncentraci celkového cholesterolu. V pilotním experimentu provedeném na dvou zdravých jedincích bylo zjištěno, že distribuce C4 mezi jednotlivými LPP významně liší a nekoreluje s obsahem FC, který byl nejvyšší v HDL (*Příloha* Tab. 9) (Kovačiková, 2013).

V námi studovaném souboru vzorků plazmy od 6 pacientů z PPK IKEM jsme se pokusili tyto nálezy zreprodukovat. Lipoproteiny (VLDL, LDL a HDL) byly z plazmy separovány v IKEM ultracentrifugací a ve všech vzorcích jsme stanovili koncentrace C4 a FC.

Z našich výsledků je zřejmé (Tab. 8), že poměr C4/FC se významně liší mezi jednotlivými lipoproteiny a distribuce C4 v LPP tedy distribuci FC v těchto částicích neodpovídá. Distribuce C4 v jednotlivých LPP se výrazně lišila i mezi pacienty. Ačkoli u většiny pacientů byl poměr

C4/FC nejvyšší v HDL, u dvou osob (E, F) byl tento poměr nejvyšší v VLDL. Skutečnost, že se distribuce C4 významně liší mezi jednotlivými třídami LPP i mezi pacienty lze jen obtížně vysvětlit. Dosud není známo, jakým způsobem se C4 z hepatocytů dostává do cirkulace – může být transportován v částicích VLDL nebo z plazmatické membrány předáván na nascentní nebo cirkulující částice HDL. Naprosto nic nevíme o tom, jak je v cirkulaci metabolizován nebo jak z cirkulace uniká, ale je nepravděpodobné, že by sdílel svůj metabolický osud s částicemi lipoproteinů, které C4 transportují. Z prací, které se zabývaly cirkadiální variací aktivity CYP7A1 (Kovář et al., 2009; Vlachová et al., 2016; Gälman et al., 2005) je zřejmé, že koncentrace C4 může v průběhu několika hodin několikanásobně vzrůst nebo klesnout, přičemž koncentrace celkového, LDL a HDL cholesterolu se v průběhu dne prakticky nemění. Příspěvek jednotlivých drah, které přispívají ke vstupu C4 do cirkulace, anebo jeho odstranění se může navíc mezi jednotlivými osobami výrazně lišit. Je třeba poznamenat, že vysoký poměr C4/FC ve VLDL byl zjištěn ve vzorcích s velmi nízkou koncentrací FC v těchto lipoproteinech a stanovení tohoto poměru může tedy být zatíženo chybou při stanovení této velmi nízké koncentrace FC. Naše výsledky tedy nepotvrdily původní hypotézu, že C4 je v LPP distribuováno podobně jako FC a nelze z nich zatím činit žádné zásadní závěry týkající se transportu a metabolismu C4 v cirkulaci.

Je rovněž známo, že poměr FC/chol je u člověka cca 0,25 a nevykazuje vysokou interindividuální variabilitu – je tedy sporné, zda by jeho zavedení do praxe mohlo nějakým způsobem zlepšit odhad aktivity CYP7A1. Nicméně i přesto to neznamena, že myšlenka korekce C4 na volný povrch by měla být zavržena. Jako další možnost se nám nabízí jiný marker velikosti povrchu než FC. Ve zmíněné práci Kovačikové (2013) se autorka pokusila jako marker velikosti povrchu LPP použít koncentraci fosfolipidů, ale vzhledem k metodickým problémům neuspěla. Jednalo se o problém s mineralizací vzorku, ve kterém se stanovoval anorganický fosfor pomocí molybdenu. Přesto by mohlo být stanovení koncentrace fosfolipidů nadějným markerem velikosti povrchu LPP v případě zvolení vhodnější metodiky.

Závěrem můžeme říci, že stanovení C4, resp. poměru C4/chol, jako markeru syntézy BA je v současné době používáno pro diagnostiku malabsorpce žlučových kyselin (Leníček et al., 2011; Gothe et al., 2014; Freudenberg et al., 2014). Lepší porozumění mechanismům, které určují jeho distribuci v jednotlivých LPP, by mohlo zásadně přispět k zpřesnění jeho úlohy jako diagnostického a výzkumného markeru syntézy BA.

8. Závěr

- Modifikovali jsme metodu stanovení C4. Optimalizováním extrakčních a elučních kroků jsme dosáhli převedení metody z HPLC na LC-MS. Těmito úpravami jsme získali citlivější a specifitější metodu.
- Metoda stanovení C4 na LC-MS byla otestována na komplexní matici jakou jsou HepG2 buňky. I s použitím citlivější LC-MS metody, jsme nebyli schopni stanovit endogenní C4 v některých sadách ovlivněných vyšší koncentrací BA. Důvodem může být účinná inhibice BA nebo malé množství buněčného homogenátu. V případě dalších měření je třeba s touto skutečností počítat a koncentrace BA příp. množství sad upravit.
- Stanovením koncentrace C4 v LPP u pacientů z PPK IKEM jsme prokázali, že nejvyšší koncentrace C4 se nachází v HDL.
- Dále jsme prokázali, že korigováním C4 na FC se distribuce C4 liší v jednotlivých LPP.
- V rozporu s pilotními daty, jsme neprokázali stabilní distribuční poměr C4/FC mezi pacienty. V důsledku toho, nemůžeme prohlásit, že by C4/FC byl spolehlivým ukazatelem a potencionálním markerem pro měření aktivity CYP7A1. Do budoucna je možné použít jako marker velikosti povrchu fosfolipidy při zvolení vhodné metody jejich stanovení.

9. Literatura

- Abrahamsson, A., Krapivner, S., Gustafsson, U., Muhrbeck, O., Eggertsen, G., Johansson, I., Persson, I., Angelin, B., Ingelman-Sundberg, M., Björkhem, I. (2005) Common polymorphisms in the CYP7A1 gene do not contribute to variation in rates of bile acid synthesis and plasma LDL cholesterol concentration. *Atherosclerosis*. 182: 37–45.
- Araya, Z., Sjöberg, H., Wikvall, K. (1995) Different effects on the expression of CYP7 and CYP27 in rabbit liver by cholic acid and cholestyramine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 868–873.
- Axelsson, M., Aly, A., Sjövall J. (1988) Levels of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in plasma reflect rates of bile acid synthesis in man. *FEBS Lett.* 239: 324–8.
- Axelsson, M., Björkhem, I., Reihner, E., Einarsson, K. (1991) The plasma level of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one reflects the activity of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase in man. *Lett* 284: 216–218.
- Back, P., Walter, K. (1980) Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium. *Gastroenterology*. 78: 671–678.
- Björkhem, I., Reihner, E., Angelin, B., Ewerth, S., Akerlund, J., Einarsson, K. (1987) One the possible use of the serum level of 7 α -hydroxylase in humans. *J. Lipid. Res.* 28: 889–894.
- Boyd, G.S., Merrick, M.V., Monks, R., Thomas, I.L. (1981). Se-75-labeled bile acid analogs, new radiopharmaceuticals for investigating the enterohepatic circulation. *J. Nucl. Med.* 22: 720–5.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouellette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J., Genest, J.Jr., Hayden, M.R. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22: 336–45.
- Camilleri, M., Nadeau, A., Tremaine, W., J., Lamsam, J., Burton, D., Odunsi, S., Sweetser, S., Singh, R. (2009) Measurement of serum 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (or 7 α C4), a surrogate test for malabsorption in health, ileal disease and irritable bowel syndrome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry bile acid. *Neurogastroenterol. Motil.* 21: 734–43.

- Cohen, J.C., Cali, J.J., Jelinek, D.F., Mehrabian, M., Sparkes, R.S., Lusic, A.J., Russell, D.W., Hobbs, H.H. (1992) Cloning of the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene (CYP7) and localization to chromosome 8q11–q12. *Genomics* 14: 153–61.
- Crosignani, A., Del Puppo, M., Longo, M., De Fabiani, E., Caruso, D., Zuin, M., Podda, M., Javitt, N.B., Kienle, M.G. (2007) Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease. *Clin. Chim. Acta.* 382: 82–88.
- Davis, R.A., Miyake, J.H., Hui, T.Y., Spann, N.J. (2002) Regulation of cholesterol-7alpha-hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J. Lipid. Res.* 43: 533–43.
- De Castro-Oros, I., Pampin, S., Cofan, M., Mozas, M., Pinto, X., Salas-Salvado, J., Rodriguez-Rey, J., C., Ros, E., Civeira, F., Pocovi, M. (2011) Promoter variant -204A > C of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene: association with response to plant sterols in humans and increased transcriptional activity in transfected HepG2 cells. *Clin Nutr* 30: 239–246.
- Dent, P., Fang, Y., Gupta, S., Studer, E., Mitchell, C., Spiegel, S., Hylemon, P., B. (2005) Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes. *Hepatology* 43: 117–125.
- Duane, W. C., Javitt, N. B. (1999). 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. *J. Lipid Res.* 40: 1194–1199.
- Freudenberg, F., Gothe, F., Beigel, F., Rust, C., Koletzko, S. (2013) Serum 7-alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one as a marker for bile acid loss in children. *Pediatr.* 163: 1367–71.
- Gälman, C., Arvidsson, I., Angelin, B., Rudling, M. (2003) Monitoring hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase activity by assay of the stable bile acid intermediate 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. *J. Lipid Res.* 44: 859–866.
- Gälman, C., Angelin, B., Rudling, M. (2005) Bile Acid Synthesis in Human Has a Rapid Diurnal Variation That's Asynchronous With Cholesterol. *Gastroenterology*, 129, 1445–1453.
- Goodwin, B.J., Zuercher, W.J., Collins, J.L. (2008) Recent advances in liver X receptor biology and chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.* 8: 781–91.
- Gothe, F., Beigel, F., Rust, C., Hajji, M., Koletzko, S., Freudenberg, F. (2014) Bile acid malabsorption assessed by 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in pediatric inflammatory bowel disease: correlation to clinical and laboratory findings. *J. Crohns Colitis.* 8: 1072–1078.
- Couture, P., Otvos, J., D., Cupples, L., A., Wilson, P., W., F., Schaefer, E., J., Ordovas, J., M. (1999) Association of the A-204C polymorphism in the cholesterol 7{alpha}-hydroxylase

- gene with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring Study. *J. Lipid Res.* 40: 1883–1889.
- Guyton, A., Arthur, C., Hall, J.E. (2006) *Textbook of Medical Physiology*. 11.vyd. (s.l.): Elsevier Saunders, ISBN-13: 978-1416045748
- Han, Z., Heath, S., C., Shmulewitz, D., Li, W., Auerbach, S., B., Blundell, M., L., Lehner, T., Ott, J., Stoffel, M., Friedman, J., M. (2002) Candidate genes involved in cardiovascular risk factors by a family based association study on the island of Kosrae, Federated States of Micronesia. *Am. J. Med. Genet.* 110: 234–242.
- Hegele, R., A., Wang, J., Harris, S., B., Brunt, J., H., Young, T., K., Hanley, A., J., G., Zinman, B., Connelly, P., W., Anderson, C., M. (2001) Variable association between genetic variation in the CYP7 gene promoter and plasma lipoproteins in three Canadian populations. *Atherosclerosis.* 154: 579–587.
- Honda, A., Yoshida, T., Xu, G., Matsuzaki, Y., Fukushima, S., Tanaka, N., Doy, M., Shefer, S., Salen, G. (2004) Significance of plasma 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one and 27-hydroxycholesterol concentrations as markers for hepatic bile acid synthesis in cholesterol-fed rabbits. *Metabolism.* 53: 42–48.
- Hong, C., and Tontonoz, P. (2014) Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Disc.* 13: 433–444.
- Hubacek, J., A., Pitha, J., Skodova, Z., Poledne, R., Lanska, V., Waterworth, D., M., Humphries, S., E., Talmud, P., J. (2003) Polymorphisms in CYP-7A1, not APOE, influence the change in plasma lipids in response to population dietary change in an 8 year follow-up: results from the Czech MONICA study. *Clin. Biochem.* 36: 263–267.
- Hubbert, M.L., Zhang, Y., Lee, F.Y., Edwards, P.A. (2007) Regulation of hepatic Insig-2 by the farnesoid X receptor. *Mol. Endocrinol.* 21: 1359–69.
- Chadwick, V., S., Modha, K., Dowling, R., H. (1973): Mechanism for hyperoxaluria in patients with ileal dysfunction. *The New England Journal of Medicine*, 289, 172-176.
- Chen, J., Cooper, A., D., Levy-Wilson, B. (1999) Hepatocyte nuclear factor 1 binds to and transactivates the human but not the rat CYP7A1 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 829–834.
- Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., Russell, D.W. (2007) Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell. Metab.* 5: 73–9.
- Chiang, J.Y. (1998) Regulation of bile acid synthesis. *Front. Biosci.* 3: 176–93.

- Chiang, J., Y., Kimmel, R., Stroup, D. (2001) Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene*. 262: 257–265.
- Chiang, J.Y. (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J. Lipid. Res.* 50: 1955–66.
- Javitt, N. B. (1994) Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. *FASEB J.* 8: 1308–1311.
- Kovačiková, T. (2013) 7 α -hydroxycholest-4-en-3-on jako marker syntézy žlučových kyselin. *VŠCHT*, pp. 33–34.
- Kovář, J., Suchanek, P., Hubacek, J., A., Poledne, R. (2004) The A-204C polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene determines the cholesterolemia responsiveness to a high-fat diet. *Physiol. Res.* 53: 565–568.
- Kovář, J., Leníček, M., Zimolová, M., Vítek, L., Jirsa, M., Piřha, J. (2010) Regulation of diurnal variation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) activity in healthy subjects. *Physiol. Res.* 59: 233–238.
- Kramer, W., Stengelin, S., Baringhaus, K.H., Enhsen, A., Heuer, H., Becker, W., Corsiero, D., Girbig, F., Noll, R., Weyland, C. (1999) Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J. Lipid. Res.* 40: 1604–1617.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Staels, B. (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* 89: 147–191.
- Leníček, M., Komárek, V., Zimolová, M. (2008a) CYP7A1 promoter polymorphism -203>C affects bile salt synthesis rate in patients after ileal resection. *J. Lipid. Res.* 49: 2664–2667.
- Leníček, M., Juklová, M., Zelenka, J., Kovář, J., Lukáš, M., Bortlík, M., Vítek, L. (2008) Improved HPLC Analysis of Serum 7 α -Hydroxycholest-4-en-3-one, a Marker of Bile Acid Malabsorption. *Clin. Chem.* v. 54, p. 1087–1088.
- Leníček, M., Ďuričová, D., Komárek, V., Gabryřová, B., Lukáš, M., Smerhovský, Z., Vítek, L. (2011) Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease: assessment by serum markers. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17, 1322–7.
- Li-Hawkins, J., Lund, E. G., Bronson, A. D., Russell, D. W. (2000) Expression cloning of an oxysterol 7 α -hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol. *J. Biol. Chem.* 275: 16543–16549.
- Li-Hawkins, J., Gåfveld, M., Olin, M., Lund, E.G., Andersson, U., Schuster, G., Björkhem, I., Russell, D.W., Eggertsen, G. (2002) Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. *J. Clin. Invest.* 110: 1191–200.

- Li, T., Kong, X., Owsley, O., Ellis, E., Strom, S., Chiang, J., Y. (2006) Insulin regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression in human hepatocytes: roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J. Biol. Chem.* 281: 28745–28754.
- Li, T., Chanda, D., Zhang, Y., Choi, H., S., Chiang, J., Y. (2010) Glucose stimulates cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *J. Lipid. Res.* 51: 832-842.
- Li, T., Chiang, J.Y. (2012). Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases. *J.Lipids.* 2012: 754067.
- Li, W., Lee, Y., K., Bundman, D., Han, Y., Thevananther, S., Kim, C., S., Chua, S., S., Wei, P., Heyman, R., A., Karin, M., Moore, D., D. (2002) Redundant pathway for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev. Cell* 2: 721–731.
- Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., Mangelsdorf, D.J. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. (2000) *Mol. Cell.* 6: 507–515.
- Lund, E. G., Guileyardo, J. M., Russell, D.W. (1999) cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7238–7243.
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., Shan, B. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* 284: 1362–1365.
- Monte, M., J., Marin, J., J., Antelo, A., Vazquez-Tato, J. (2009) Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* 15: 804-816. Myant, N.B., Mitropoulos, K.A. (1977) Cholesterol 7 α hydroxylase. *J. Lip. Res.* 18: 135–153.
- Nitta, M., Ku, S., Brown, C., Okamoto, A.Y., Shan, B. (1999) CPF: An orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 6660–6665.
- Norlin, M., Andersson, U., Björkhem, I., Wikvall, K. (2000) Oxysterol 7 α -hydroxylase activity by cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A). *J. Biol. Chem.* 275: 34046–34053.
- Pattni, S.S, Brydon, W.G., Dew, T., Walters, J.R.F. (2012) Fibroblast Growth Factor 19 and 7 α -Hydroxy-4-Cholesten-3-one in the Diagnosis of Patients With Possible Bile Acid Diarrhea. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 3: e18.
- Pikuleva, I., A. (2008) Cholesterol-metabolizing cytochromes P450: implications for cholesterol lowering. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 4: 1403–1414.

- Pullinger, C.R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A.K., Erickson, S.K., Verhagen, A., Rivera, C.R., Mulvihill, S.J., Malloy, M.J., Kane, J.P. (2002) Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J. Clin. Invest.* 110:109–17.
- Shepherd, J. (2001) The role of the exogenous pathway in hypercholesterolaemia. *Eur. Heart J. Suppl.* 3 (Supplement E), E2–E5.
- Shriver & Atkins. (2006) *Inorganic Chemistry*. 4. vydání. Oxford University Press, 822 s. s. 731. ISBN 0-19-926463-5.
- Schwarz, M., Lund, E. G., Setchell, K. D. R., Kayden, H. J., Zerwekh, J. E., Sauter, G., Berr, F., Beuers, U., Fischer, S., Paumgartner, G. (1996) Serum concentrations of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one reflect bile acid synthesis in humans. *Hepatology* 24: 123–126.
- Song, K., H., Chiang, J., Y. (2006) Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatology* 43: 117–125.
- Štern P. a kol. (2005) *Obecná a klinická biochemie*, 1. vyd., Praha, Nakladatelství Karolinum, ISBN 80-246-1025-6.
- Tarling, E.J., Edwards, P.A. (2011) ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:19719–24.
- Tempel, W., Grabovec, I., MacKenzie, F., Dichenko, Y.V., Usanov, S.A., Gilep, A.A., Park, H.W., Strushkevich, N. (2014) Structural characterization of human cholesterol 7 α -hydroxylase. *J.Lipid. Res.* 55: 1925–32.
- Valacchi, G., Sticozzi, C., Lim, Y., Pecorelli, A. (2011) Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1229: 1–7.
- Vijayvargiya, P., Camilleri, M., Shin, A., Saenger, A. (2013) Methods for diagnosis of bile acid malabsorption in clinical practice. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11: 1232–1239.
- Vlahcevic, Z. R., Stravitz, R. T., Heuman, D. M., Hylemon, P. B., Pandak, W. M. (1997) Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. *Gastroenterology*. 113: 1949–1957.
- Vlachová, M., Bláhová, T., Lánská, V., Leníček, M., Piřha, J., Víték, L., Kovář, J. (2016) Diurnal variation in cholesterol 7 α -hydroxylase activity is determined by the -203A>C polymorphisms of the CYP7A1 gene. *Croat. Med. J.* 57: 111–7.
- Voet, D., Voet J. (2011) *Biochemistry*. In: Paperback. Wiley, USA. ISBN-13: 978-0470-57095-

- Walker, H.K., Hall, W.D., Hurst, J.W. (1990) *Clinical Methods*, 3rd edition. Butterworths, Boston, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia. cap.31. ISBN-10: 0-409-90077-X
- Walters, J. (2010): Managing bile acid diarrhoea. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 3, 349–357.
- Wang, D.P., Stroup, D., Marrapodi, M., Crestani, M., Galli, G., Chiang, J.Y. (1996) Transcriptional regulation of the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene (CYP7A) in HepG2 cells. *J.Lip. Res.* 37: 1831–1841.
- Wang, J., Freeman, D., J., Grundy, S., M., Levine, D., M., Guerra, R., Cohen, J., C. (1998) Linkage between cholesterol 7alpha-hydroxylase and high plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *J. Clin. Invest.* 101: 1283–1291.
- Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K., Beltowski, J. (2007) Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy. Hig. Med. Dosw. (Online)*. 61: 736–59.
- Yu, C., Wang, F., Jin, C., Huang, X., McKeehan, W.L. (2005) Independent repression of bile acid synthesis and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by activated hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and bile acids. *J. Biol. Chem.* 280: 17707–17714.
- Zhang, M., and Chiang, J. Y. (2001). Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression. *J. Biol. Biol. Chem.* 276: 41690–41699.

Internetové zdroje:

<https://eohsi.rutgers.edu/5892-2/>

http://www.medscape.org/viewarticle/550620_2

<https://www.studyblue.com/notes/n/biochem-lipid-metabolism/deck/12418058>

10. Přílohy

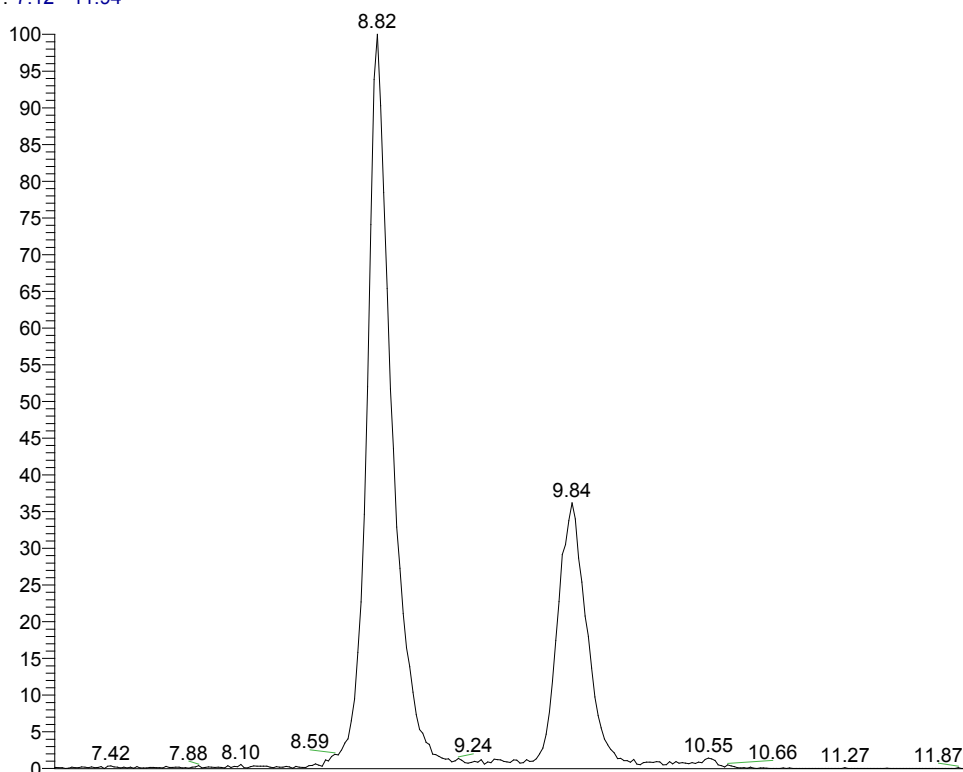
Tab. 9 – Distribuční poměry C4/FC z pilotního projektu. Sérové vzorky dvou zdravých jedinců A a B, kdy do vzorku B je přidán C4, vzniká tak vzorek C. Mezi vzorky můžeme pozorovat podobnou distribuci C4. Upraveno podle Kovačiková, 2013.

Osoba	A		B		C	
	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztaženo na LDL	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztaženo na LDL	C4/FC [$\mu\text{g}\cdot\text{mmol}^{-1}$]	C4/FC vztaženo na LDL
VLDL	7,5	1,56	24,1	1,54	198,4	2,43
LDL	4,8	1	15,7	1	81,7	1
HDL	17,3	3,59	55,3	3,53	269,2	3,29

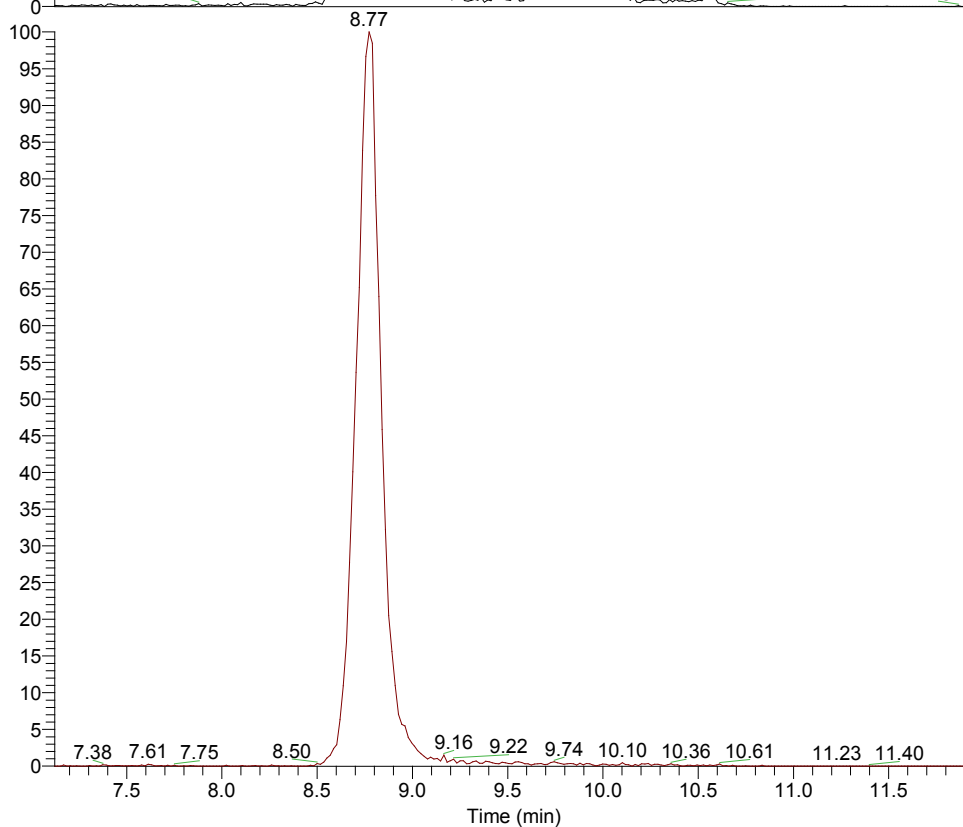
Tab. 10 – Srovnání množství roztoků pro stanovení C4 na HPLC a na LC-MS. Metoda HPLC upravena podle Leníček et al., 2008b.

Roztok	HPLC	LC-MS
Vstupní vzorek (ml)	1	0,15
C4-D7	30 ng/ 80 μl	6,82 ng/ 40 μl
Fyziologický roztok (ml)	0	0,1
Chloroform-metanol (ml)	5	1
125 mM NaCl v 50% metanolu (ml)	2	0,5
Izopropylalkohol (ml)	2	2
Hexan (ml)	1	1
Toluen (ml)	1	1
Izopropylalkohol v hexanu (ml)	15 ml 0,4%	6 ml 0,6%
Eluční roztok (ml)	1 ml 100% izopropylalkohol	0,5 ml 30% izopropylalkohol

RT: 7.12 - 11.94



NL: 2.45E5
m/z= 383.10-384.10 F:
+ c ESI SRM ms2
401.400
[177.299-177.301,
383.599-383.601] MS
104c



NL: 2.50E5
m/z= 390.10-391.10 F:
+ c ESI SRM ms2
408.400
[184.199-184.201,
390.599-390.601] MS
104c

Obr. 14 – Záznam LC-MS odezvy pro C4 (8.82) a C4-D7 (8.77). V čase 9.84 je neznámý oxysterol.