

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Antioxidační a protizánětlivá funkce HDL lipoproteinů

Kateřina Štěpařová

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Štěpařová**  
Osobní číslo: **C15282**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Antioxidační a protizánětlivá funkce HDL lipoproteinů**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Seznamte se s metabolismem, detailním složením a funkcemi HDL lipoproteinů v lidském organismu, se zaměřením na jejich antioxidační a protizánětlivé působení, především ve vztahu k ateroskleróze a diabetu mellitu. Proveďte literární rešerši k této problematice, při vyhledávání literárních údajů využijte databázi MEDLINE.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Martina Špryncová**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

**MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 20. 6. 2019

Kateřina Štěpařová

## **Poděkování**

Děkuji MUDr. Vladimíře Novákové Mužákové, Ph.D. a Ing. Martině Špryncové za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi v průběhu zpracování mé bakalářské práce věnovaly. Děkuji také své rodině a blízkým za velkou podporu.

## ANOTACE

Práce je věnována složení a působení složek lidských HDL lipoproteinů. Detailněji se zabývá antioxidantním a protizánětlivým působením HDL a mechanismy, které je umožňují. Popisuje metabolismus lipoproteinů a z toho vyplývající problematiku s patologickými HDL. V návaznosti na to je sledován vztah protekčních mechanismů HDL k ateroskleróze a diabetu mellitu.

## KLÍČOVÁ SLOVA

HDL, apoproteiny, PON, LCAT, protizánětlivé působení, antioxidantní působení, ateroskleróza

## TITLE

Antioxidant and antiinflammatory effect of HDL lipoproteins

## ANNOTATION

The work presents composition and functioning of human HDL compounds. It deals in detail with antioxidant and antiinflammatory function of HDL and its mechanisms also. It describes metabolism of lipoproteins and issues connected to it through HDL pathology. It deals with relationship of HDL protecting mechanisms to atherosclerosis and diabetes mellitus.

## KEYWORDS

HDL, apoproteins, PON, LCAT, antiinflammatory function, antioxidant function, atherosclerosis

# OBSAH

ÚVOD.....	9
1    LIPOPROTEINY.....	10
1.1  VZNIK A CHARAKTERISTIKA.....	10
1.2  FUNKCE LIPOPROTEINŮ.....	12
2    LIPOPROTEIN O VYSOKÉ HUSTOTĚ.....	15
2.1  CHARAKTERISTIKA.....	15
2.2  VZNIK HDL.....	17
2.3  APOPROTEINY.....	21
2.4  ENZYMY, PROTEINY DALŠÍ SLOŽKY HDL.....	23
2.5  PROTIZÁNĚTLIVÉ PŮSOBENÍ.....	27
2.6  ANTIOXIDAČNÍ PŮSOBENÍ.....	32
2.7  VZTAH HDL K ATEROSKLERÓZE.....	36
2.8  VZTAH K DIABETU MELLITU.....	42
3    ZÁVĚR.....	45
POUŽITÁ LITERATURA.....	47

## SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1 – STRUKTURA LIPOPROTEINOVÉ ČÁSTICE.....	11
OBRÁZEK 2 – METABOLISMUS LIPOPROTEINŮ .....	13
OBRÁZEK 3 – SCHEMATICKÝ DIAGRAM SYNTÉZ LIPOPROTEINŮ DLE METABOLICKÝCH CEST.....	19
OBRÁZEK 4 – CESTA VZNIKU HDL .....	20
OBRÁZEK 5 – SOUHRN VLASTNOSTÍ HDL ČÁSTIC .....	31
OBRÁZEK 6 – MECHANISMUS ANTIOXIDAČNÍHO PŮSOBENÍ HDL NA OXLDL .....	34
OBRÁZEK 7 – PROTEKTIVNÍ FUNKCE PON1 VŮČI PĚNOVÝM BUŇKÁM .....	38

## SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 – SLOŽENÍ PLAZMATICKÝCH LIPOPROTEINŮ .....	12
TABULKA 2 – OBSAH LIPOPROTEINOVÝCH ČÁSTIC .....	14
TABULKA 3 – FUNKČNÍ METODY A PARAMETRY PRO DIAGNOSTIKU HDL .....	16
TABULKA 4 – APOPROTEINY HDL A JEJICH ZÁKLADNÍ FUNKCE .....	21
TABULKA 5 – TYPY DYSFUNKČNÍCH HDL DLE SVÉHO VZNIKU.....	35
TABULKA 6 – POZOROVÁNÍ HDL U PACIENTŮ S ICHS.....	40
TABULKA 7 – POZOROVANÉ ZMĚNY HDL U PACIENTŮ S DM2T .....	43



## SEZNAM ZKRATEK

<b>ABCA1</b>	ATP-dependentní kazetový transportér A1
<b>ABCG1</b>	ATP-dependentní kazetový transportér G1
<b>Apo</b>	apoprotein
<b>CETP</b>	cholesterol-ester transferový protein
<b>DM1T</b>	diabetes mellitus 1. typu
<b>DM2T</b>	diabetes mellitus 2. typu
<b>GSPx-3</b>	glutathion-selenoperoxidáza-3
<b>HDL</b>	high density lipoprotein
<b>HL</b>	jaterní lipáza
<b>ICAM</b>	intercellular cell adhesion molecule
<b>KVO</b>	kardiovaskulární onemocnění
<b>LCAT</b>	lecitin-cholesterol acyl transferáza
<b>LDL</b>	low density lipoprotein
<b>LPL</b>	lipoproteinová lipáza
<b>MPO</b>	myeloperoxidáza
<b>nf-<math>\kappa</math>B</b>	nukleární faktor kappa B
<b>oxPAPC</b>	oxidovaný 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin
<b>PAF-AH</b>	faktor aktivující krevní destičky-acetylhydroláza
<b>PLTP</b>	fosfolipid-transfer protein
<b>RTC</b>	reverzní transport cholesterolu
<b>S1P</b>	sfingosin-1-fosfát
<b>SAA</b>	sérový amyloid A
<b>SR-B1</b>	scavengerový receptor B1
<b>TAG</b>	triacylglyceroly
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>VCAM</b>	vascular cell adhesion molecule

## ÚVOD

Lipoproteiny jsou částice, které slouží k transportu lipofilních látek, mezi které patří především cholesterol a triacylglyceroly. Lipoproteiny jsou děleny dle své hustoty na LDL, VLDL, IDL a HDL. HDL jsou lipoproteiny o vysoké hustotě mající hlavní funkci vychytávat volný cholesterol ze tkání. HDL se dělí na jednotlivé podtřídy s různými specifitami, zastoupením proteinů a lipidových částic. Na povrchu HDL jsou přítomny apoproteiny, které společně s dalšími proteiny umožňují vazby na enzymy a interakci s receptory (především scavengerovými receptory) a také s kazetovými transportéry.

Apoproteiny zastávají protizánětlivé působení HDL částic, na ně navazují další prospěšné mechanismy. Enzymy náležící HDL zajišťují antioxidační reakce, jsou aktivovány navázáním na povrchové struktury HDL a setkáváním se např. s produkty oxidačních reakcí. Takovými enzymy jsou enzymy z třídy paraoxonáz, dalším zástupcem je např. lecitin-cholesterolacyltransferáza. HDL náleží také transportní proteiny, které umožňují reverzní transport cholesterolu, mezi něž patří např. cholesterol-ester transferový protein a fosfolipidový transferový protein.

Vlastnosti HDL jsou oproti LDL ve vztahu k endotelu cév prospěšné, neboť jsou protekční vůči vzniku a rozvoji zánětlivých procesů v cévách a vzniku volných radikálů vlivem LDL a jejich oxidací. Defektní působení HDL může mít závažné důsledky kvůli ztrátě endotel-protekční funkce. V poslední době je blíže studován vliv vzniku populace dysfunkčních HDL ve vztahu k rozvoji aterosklerózy. Lipoproteiny hrají významnou roli především u pacientů s diabetem mellitem 2. typu. Hladiny a funkčnost HDL částic mohou významně ovlivňovat pacienty s diabetem mellitem.

# 1 LIPOPROTEINY

## 1.1 VZNIK A CHARAKTERISTIKA

Lipoproteiny jsou kulovité částice skládající se z hydrofilního obalu a hydrofobního jádra. Lipoproteiny jsou tvořeny z látek lipofilní povahy, a to triacylglycerolů (TAG), volných cholesterolů, cholesterol-esterů, fosfolipidů a apoproteinů (apo). Dle zastoupení daných jednotlivých složek se v lipoproteinu rozdělují na chylomikrony, chylomikronové zbytky, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteiny o střední hustotě (IDL), lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL). Chylomikrony mají největší zastoupení TAG, směrem k HDL velikost podílu bílkovin roste. Podíl jednotlivých lipoproteinů mezi sebou v plazmě je měněn v závislosti na aktivitě anabolických a katabolických enzymů účastnících se metabolismu lipidů. V závislosti na enzimech jsou na cílových buňkách přítomny receptory. Apoproteiny mnohdy slouží jako ligandy lipoproteinů pro navázání na receptory. (Maranhão, 2014), (Vlček, 2010)

Receptory pro LDL jsou nazývány LDL-receptory, jsou umístěny nejvíce v játrech dále také v nadledvinách a pohlavních žlázách. Na receptory se váží jako ligandy apoproteiny daných lipoproteinů. Po uskutečnění této vazby mohou proběhnout interakce zajišťující výměnu cholesterolu mezi lipoproteiny a buňkami. Dalším typem receptorů jsou tzv. scavengerové receptory, které jsou určeny LDL nebo HDL. Vyskytují se na površích makrofágů, buňkách hladké svaloviny a endotelu. Pro LDL lipoproteiny se receptory nazývají acetyl-LDL právě proto, že vážou oxidované formy LDL. Pro HDL jsou to receptory B1 (SR-B1), které se vyskytují na jaterních buňkách, endoteliální i buňkách nadledvin a pohlavních žláz. (Vlček, 2010)

Částice HDL má nejvyšší zastoupení proteinů a fosfolipidů ze všech lipoproteinových částic. Zároveň je nejmenší lipoproteinovou částicí, chylomikron je největší. (Maranhão, 2014)

Chylomikrony jsou prvotně vznikajícími částicemi. Jejich funkcí je transport volného cholesterolu z oběhu do jater a poskytování TAG buňkám periferií, mají tedy podobné základní funkce jako HDL, ale jejich poločas je krátký, neboť se v krevním oběhu nacházejí výhradně po jídle. (Vlček, 2010)

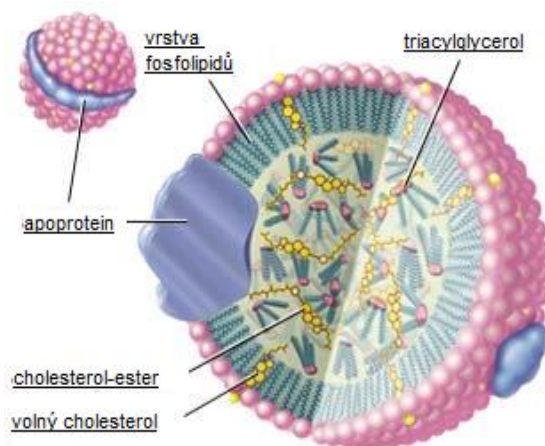
Dále mohou být HDL částice přeměňovány na další typy lipoproteinových částic. Vznikají v enterocytech z cholesterolu a z TAG získaných z potravy. Působením lipoproteinové lipázy (LPL) jsou hydrolyzovány na TAG a mastné kyseliny a následně zredukovány až na tzv. chylomikronové zbytky. Tyto zbytkové lipidové částice jsou v jaterních buňkách

později opět využity k tvorbě HDL částic, tzv. nascentních, anebo dalších lipoproteinů, hlavně VLDL a IDL. (Fernandes, 2008), (Holeček, 2006)

Využití chylomikronových zbytků funguje na principu vnášení cholesterol-esterů nebo apoproteinů jiných lipoproteinů a následného registru takových chylomikronových zbytků receptory jaterních enzymů a jejich vychytání z oběhu do jater. (Vlček, 2010)

Dále existuje lipoprotein (a), který je velmi podobný LDL, neboť obsahuje apoB-100. Jedná se o třídu lipoproteinových částic, označovaný jako Lp (a). Lipoprotein (a) se od LDL ovšem liší vazbou s apoproteinem (a), což ho tvoří strukturně velmi podobným plazminogenu. Plazminogen po své aktivaci na plazmin funguje jako proteolytický enzym, který má v hemokoagulační kaskádě funkci rozrušit vlákna fibrinu a udržet tak homeostázu krevního srážení organismu. (Fernandes, 2008)

Předpokládá se, že Lp (a) dokáže transportovat lipidové částice do buněk endotelu a mít určitou roli v snižování karcinogenity a růstu trombů. Výskyt Lp (a) je zároveň zvýšen u pacientů se zvýšeným rizikem výskytu kardiovaskulárních onemocnění (KVO). U afroamerických pacientů byly naměřeny vyšší koncentrace Lp (a), zda existuje korelace s rizikem vzniku KVO nebylo potvrzeno. Rozpory ve fyziologických funkcích Lp (a) vyplývají z vysoké homologie s plazminogenem, neboť Lp (a) může plazminogen substituovat a fibrinolytickou kaskádu narušit. Lp (a) je považován za proaterogenní faktor. (Fernandes, 2008)



Obrázek 1 – Struktura lipoproteinové částice (upraveno, Agnoletto, 2008)

Tvorba lipoproteinů probíhá v enterocytech. Triacylglyceroly z potravy s cholesterol-estery se vážou se jako základ pro jádro vznikající lipoproteinové molekuly (viz obrázek 1). Jádro lipoproteinů je také tvořeno z částíček genetického materiálu např. RNA či další velikostně

podobné lipofilní molekuly, bílkoviny akutní fáze, enzymy apod. (Fernandes, 2008), (Maranhão, 2014).

Obal je následně utvářen shlukováním apoproteinů na základě toho, kde daná lipoproteinová částice vzniká. Apoprotein B-100 se váže na povrch částic, jestliže proces probíhá v játrech, apoprotein B-48 obdobně, pokud se jedná o vznik v enterocytech. Obal HDL má tloušťku asi 1 – 3 nm, závisí na typu vzniklé částice. Nově vytvořený lipoprotein je pak z buňky exportován do krve, kde opět dochází ke styku s dalšími apoproteiny a ke zvyšování jeho funkční specifity. (Fernandes, 2008)

Cesta vzniku jednotlivých lipoproteinových tříd je následná – po požití potravy vznikají chylomikrony, po krátkém čase jsou hydrolyzovány na chylomikronové zbytky, v játrech se produkty jejich hydrolýzy, prostřednictvím lipoproteinové lipázy (LPL) nebo zbytky samotné využijí společně s TAG vzniklými v játrech pro tvorbu VLDL, které poputují do krevního oběhu. V perifériích mohou být VLDL štěpeny opět za pomoci LPL. Změnou obsahu hydrolyzovaných TAG a vnesením esterifikovaného cholesterolu vzniknou z VLDL, IDL nebo LDL. Lipoproteinové částice se vrátí do jater prostřednictvím jaterních receptorů pro ně určených. (Vlček, 2010)

*Tabulka 1 – Složení plazmatických lipoproteinů (Holeček, 2006)*

	<b>Obsah lipidů [%]</b>	<b>Funkce</b>
<b>Chylomikrony</b>	99	Transport TAG
<b>VLDL</b>	90	Transport TAG
<b>IDL</b>	89	Transport TAG, EC
<b>LDL</b>	80	Transport cholesterolu do tkání
<b>HDL</b>	50	Transport cholesterolu ze tkání do jater

## 1.2 FUNKCE LIPOPROTEINŮ

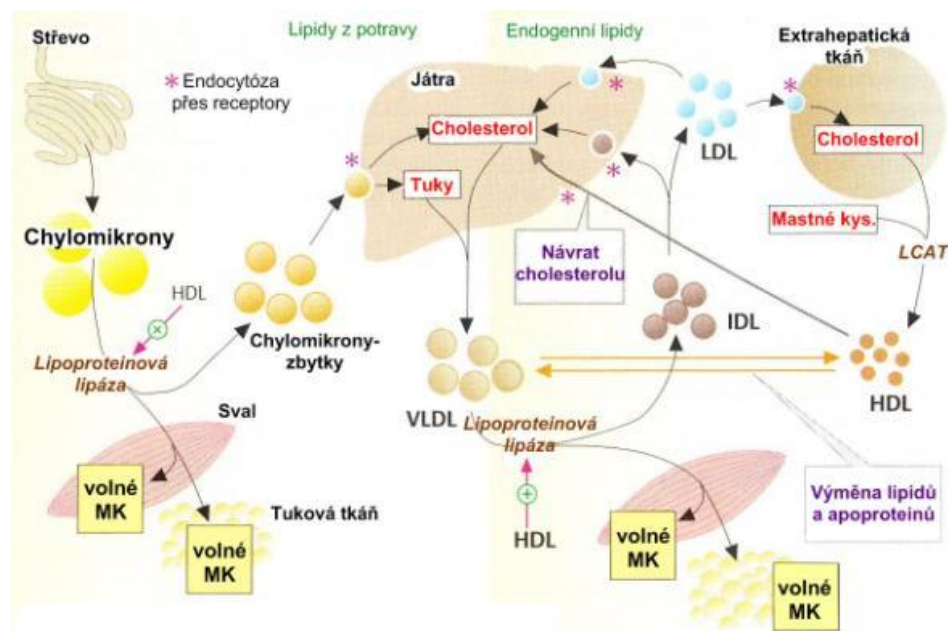
Hlavní úlohou lipoproteinů je transport lipofilních molekul v krevním oběhu. Tento transport je umožněn prostorovým uspořádáním lipofilních částic. V jádrech lipoproteinů jsou TAG a cholesterol-estery, které jsou hydrofobní povahy. Soudržnost povrchu zajišťují amfibolické fosfolipidy (zbytky kyseliny fosforečné), kterých je v obalu nejvíce. Dále je přítomen vmezeřený volný cholesterol směřující hydrofobním koncem, stejně jako fosfolipidy, do středu částice. (Holeček, 2006)

Volný cholesterol, tzn. neesterifikovaný, má volné hydroxylové skupiny, kterými vybočuje z molekuly ven. Na povrchu jsou dále především apoproteiny, které určují charakter celé částice a její funkci (viz tabulka 1). Apoproteiny pro LDL jsou hlavně apoB-100, pro HDL

jsou to apoA-I, apoA-II, dále i apoA-IV, apoB-48, apoC-I, apoC-II, apoC-III atd. Vazba apoproteinů na lipidy je nekovalentní, což umožňuje hospodaření s nimi dle potřeb metabolismu. (Fernandes, 2008), (Holeček, 2006), (Maranhão, 2014)

Důležitou úlohou lipoproteinových částic je předávání přenášených TAG do periferních buněk. Přenášeny mohou být i jiné složky lipoproteinů. U třídy LDL je hlavní funkcí vkládání cholesterolu do buněk, u HDL naopak jeho vychytávání. U různých tříd lipoproteinů jsou proto různé koncentrace cholesterolu, TAG a fosfolipidů, neboť s nimi (i dalšími svými složkami) odlišně hospodaří (viz tabulka 2). (Holeček, 2006), (Koolman, 2012)

Proces, kdy buňky v endotelu předají cholesterol HDL částici, je umožněn spoluprací apoA-I se SR-B1 (scavengerovými receptory třídy B1) korigovanými ABCG1 (ATP-vázaným transportérem podtřídy G1). (Run-Lu, 2016)



Obrázek 2 – Metabolismus lipoproteinů (Merhautová, 2012)

Vychytávání cholesterolu z buněk je nazýváno reverzním transportem cholesterolu (RTC). Tuto funkci zastává jediný lipoprotein, kterým je HDL (viz obrázek 2). Mechanismus reverzního transportu cholesterolu zajišťuje vychytávání volného cholesterolu z endotelových buněk a je pro ně nezbytný, neboť volný cholesterol je pro ně toxický. (Run-Lu, 2016), (Hafiane, 2013)

Reverzní transport cholesterolu funguje na principu více mechanismů, SR-B1 zajišťuje přenos cholesterolu z makrofágů cévních stěn. Tomu musí předcházet pasivní difúze cholesterolu z makrofágů, kterou zajistí enzym lecitin-cholesterol-acyltransferáza (LCAT)

esterifikací cholesterolu. Funkcí LCAT je přenos acylu dané mastné kyseliny enzymaticky uvolňované z TAG z lecitinu na hydroxylovou skupinu cholesterolu. (Holeček, 2006)

Molekula cholesterolu je tak esterifikována a dává vzniknout hydrofobní částici cholesterol-esteru. LCAT je na povrchu většiny lipoproteinových částic, u HDL částic koriguje výskyt volného cholesterolu. Navazující funkci má cholesterol-ester transferový protein (CETP), který přenáší cholesterol-estery a hospodaří s TAG. (Fernandes, 2008)

ApoA-I na povrchu HDL zajistí interakci s ABCA1 kazetovým transportérem navázáním vzniklých cholesterol-esterů. HDL částice typu malé denzní HDL, dokážou cholesterol vychytávat s vyšší účinností oproti větším denzním HDL částicím. Je tomu právě proto, že menší částice HDL jsou tzv. lipidově chudší, proto se na ně z hlediska struktury cholesterol-estery vážou snáze. Kapacita cholesterolového effluxu je přímo úměrnou veličinou HDL pro účinnost reverzního transportu cholesterolu. Kapacita HDL částic je pro cholesterol-estery omezena. Po navázání cholesterolu na HDL částici se někdy může vzniklý komplex nazývat HDL-cholesterol neboli HDL-C. (Novotný, 2013)

Cesta cholesterol-esterů pokračuje transportem z HDL do jater nebo je možné, že budou vyměněny za TAG při setkání s VLDL částicí. Na konci svého metabolického cyklu jsou HDL v játrech odbourávány pomocí jaterních lysozomů. Na obrázku 2 jsou metabolismy HDL i LDL blíže znázorněny. (Fernandes, 2008), (Röhrl, 2013)

Tabulka 2 – Obsah lipoproteinových částic (Koolman, 2012)

	<b>TAG [%]</b>	<b>Cholesterol [%]</b>	<b>Fosfolipidy [%]</b>
<b>Chylomikrony</b>	80 – 95	2 – 7	3 – 9
<b>VLDL</b>	55 – 80	5 – 15	10 – 20
<b>IDL</b>	20 – 50	20 – 40	15 – 25
<b>LDL</b>	5 – 15	40 – 50	20 – 25
<b>HDL</b>	5 – 10	15 – 25	20 – 30

Mezi enzymy, které se výrazně podílí na metabolismu lipidů, patří lipoproteinová lipáza (LPL), jaterní lipáza (HL), hormon-senzitivní lipáza (HSL), 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A reduktáza (HMG-CoA reduktáza). Lipoproteinová lipáza nacházíme ji na povrchu tukové a endotelové tkáně a také u kosterního svalstva. Lipoproteinová lipáza zajišťuje hydrolýzu TAG na vyšší mastné kyseliny a glycerol u lipoproteinů, především u VLDL. Jaterní lipáza má obdobnou funkci s tím rozdílem, že je jaterním enzymem, oproti LPL jaterní lipáza nepotřebuje pro své fungování kofaktor apoC-II. HMG-CoA reduktáza je enzymem syntézy cholesterolu. (Vlček, 2010)

## 2 LIPOPROTEIN O VYSOKÉ HUSTOTĚ

### 2.1 CHARAKTERISTIKA

HDL, lipoprotein s vysokou hustotou zastává mnoho rozličných funkcí, jimiž pomáhá docílit homeostázy hospodařením s cholesterolem, hlavně jeho odebíráním z endotelových tkání např. z makrofágů. Cholesterolovým effluxem je cholesterol dopraven zpět do jater, jedná se o jednu z klíčových antiaterogenních vlastností. (Röhr, 2013)

Částice HDL jako jediné lipoproteinové částice zajišťují jednosměrný transport cholesterolu z buněk periferních tkání. Naproti tomu dokážou obousměrně transportovat albumin, cykloextriny nebo fosfolipidy, tzn. do periferií je mohou i ukládat. (Novotný, 2013)

Fyziologické hodnoty se u žen a mužů liší. U muže je referenční hodnota HDL v séru uváděna v rozmezí 1 – 2,1 mmol/l, u ženy 1,2 – 2,7 mmol/l. Optimální hodnoty jsou v tabulce 3, společně s hodnotami TAG, zvýšené hodnoty TAG a zároveň snížené hodnoty HDL jsou rizikovým faktorem pro vznik cévních onemocnění. (Holyen, 2013), (Soška, 2009)

HDL je tvořen směsí lipidů, bílkovin a cholesterolu. HDL má na svém povrchu apoA-I, apoA-II a apoC-III. ApoA-I zaujímá 65 – 70 % hmotnosti HDL částice, apoA-II zaujímá 12 – 15 %. Ze všech lipoproteinových tříd má nejvyšší obsah bílkovin, průměrná hustota je od 1,063 do 1,21 g/ml. Podtřídy se v hodnotách hustoty liší. Dělení bylo zavedeno v padesátých letech, když se HDL podtřídy identifikovaly gradientovou ultracentrifugací. HDL částice s hustotou nepřesahující hodnoty 1,125 g/ml, jsou značeny HDL2. S vyšší hustotou v rozmezí 1,125 – 1,21 g/ml se jedná o HDL3 a při vyšších hustotách se nazývají HDL o velmi vysoké hustotě. (Holeček, 2006), (Hafiane, 2013), (Lüscher, 2014)

Dnes se k separaci HDL dle hustoty metody založené na centrifugaci stále využívají. Levnějšími jsou srážecí metody. Postupem času byly vyvíjeny efektivnější variace dělení HDL na podtřídy, pokrok nastal hlavně při zavedení elektroforetických metod, dodnes je využívána gelová elektroforéza. Třída HDL3 byla rozdělena na tři podtřídy: HDL3c, HDL3b, HDL3a, na základě jejich střední velikosti. HDL3c 7,2 – 7,8 nm, HDL3b 7,8 – 8,2 nm, HDL3a 8,2 – 8,8 nm. Třída HDL2 byla obdobně rozdělena na HDL2a 8,8 – 9,7 nm, HDL2b 9,7 – 12 nm. Toto dělení na základě gelové elektroforézy, tedy dle náboje částice a dalších parametrů, je nejvyužívanější. (Kontush, 2015)

Dále existuje dělení dle nukleární magnetické rezonance (NMR), podle velikosti HDL částic na velké (průměr 8,8 – 13 nm), střední (8,2 – 8,8 nm) a malé částice (7,3 – 8,2 nm). Další dělení, které se využívá, je dle již zmiňovaných apoproteinů a je znázorněno v tabulce 3. Jedná se o apoA-I HDL, apoA-I:apoA-II HDL apoA-I:apoE HDL. (Kontush, 2015)



Posledním druhem klasifikace HDL je rozdělení dle 2-dimenzionální gelové elektroforézy na pre-beta I, pre-beta II, alpha I, alpha II, alpha III a alpha IV. Bylo zjištěno, že molekula HDL obsahuje přes osmdesát různých bílkovin, okolo dvaceti enzymů a stovky lipidových částic. (Feingold, 2018), (Kontush, 2015).

Proteiny a enzymy náležící HDL jsou k lipoproteinu vázány různými vazbami, které jsou většinou slabé nebo neznámé a mají rozmanité funkce. Proteiny jsou děleny na apoproteiny, transferové proteiny pro lipidy, složky komplementu, proteiny akutní fáze, enzymy nebo inhibitory enzymů nebo proteinů. U proteinů, jejichž princip vazby k HDL je znám, se většinou jedná o vazbu zprostředkovanou lipidy nebo dalším proteinem, bývá jím často apoprotein. V dnešní době je popsáno 14 typů apoproteinů a je možné, že to není konečný počet. Nejpočetnějším apoproteinem je apoA-I, proto jsou na něj nejčastěji vázány další subfrakce náležící HDL, jsou to např. albumin,  $\alpha$ -2-makroglobulin a haptoglobin. (Karathanasis, 2017)

HDL částice se projevují antitrombogenně, antiapoptoticky, ale také vazoprotektivně. Podporují expresi oxidu dusnatého (NO) aktivací NO-syntázy prostřednictvím SR-B1 signalizačních cest pro HDL. SR-B1 aktivuje enzymy pro fosforylaci NO-syntázy, která na tomto principu bude aktivována. HDL se podílí, jak ovlivňováním trombocytární aktivity, tak i vazokonstrikce na hemostáze. (Karathanasis, 2017)

V rutinních vyšetřeních se měří hladiny HDL, apoA-I, cholesterolu a TAG. Pro diagnostiku HDL se pozorují funkční a strukturní vlastnosti tohoto lipoproteinu kvantitativně. Laboratorní metody a postupy jsou zřehledněny v tabulce 3. (Karathanasis, 2017)

Tabulka 3 – Funkční metody a parametry pro diagnostiku HDL (Novotný, 2013)

Měřený parametr	Hypotéza	Laboratorní metoda
<b>HDL-cholesterol</b>	Rizikový faktor aterosklerózy	Přímá enzymatická metoda, nepřímá enzymatická precipitace a separace apoB
<b>apoA-I</b>	Rizikový faktor aterosklerózy	Imunoturbidimetrie, imunonefelometrie
<b>HDL2, HDL3 a další třídy</b>	Malé denzní molekuly HDL lépe akceptují cholesterol z makrofágů, sledování antiaterogenity	Hustotní gradientová ultracentrifugace, polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)
<b>Všechny třídy HDL</b>	Sledování antiaterogenity vzhledem k velikosti	Dvourozměrná elektroforéza

Měřený parametr	Hypotéza	Laboratorní metoda
Malé, střední, velké HDL částice	Sledování antiaterogenity vzhledem k velikosti	Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR)
apoA-II, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE	Protekční vlivy, apoA-II může negativně korelovat s rizikem aterosklerózy	Elektroimunodifúze (EID), imunoturbidimetrie, imunonefelometrie
apoA-I: apoA-II, také s apoC-III	Antiaterogenní vlastnosti apoA-I, příspěvek apoC-III k rozvoji aterosklerózy	EID
Cholesterolový efflux	Schopnost HDL odstraňovat z makrofágů cholesterol, funkčnost HDL	Metoda měření označených makrofágů, kvantifikace pomocí nuklidu tritia
Esterifikace cholesterolu	Schopnost HDL esterifikovat volný cholesterol, účinnost LCAT při nízkých koncentracích HDL, role velikosti HDL	Metody měření aktivity LCAT, frakční esterifikační rychlost HDL (FER-HDL)
Cholesterol-estery a jejich transport	Kapacita esterů transportovaných pro apoB, funkce CETP	Metody měření koncentrace či aktivity CETP
Antioxidační a protizánětlivá kapacita HDL	Protekční vliv HDL vůči oxidačnímu působení LDL lipidů a proteinů, PON1	Fluorescenční metoda s dichlorfluoresceinem, měření aktivity PON1 (paraoxon, diazoxon)

## 2.2 VZNIK HDL

HDL částice jsou komplexy z makromolekul. Vznikají v hepatocytech, enterocytech nebo v plazmě z vedlejších produktů lipolýzy ostatních lipoproteinů. Důležitou roli při syntéze HDL hrají triacylglyceroly, které společně s cholesterol-estery tvoří jádro HDL. Obal je tvořen jednou vrstvou fosfolipidů a volného cholesterolu s vmezeřenými bílkovinami sahajícími až k jádru. Bílkoviny i fosfolipidy jsou amfipatického charakteru. Jádro je lipidově bohaté – hydrofobní. Podíl bílkovin u HDL lipoproteinů je nejvyšší ze všech typů lipoproteinů, proto jsou označovány jako částice s vysokou hustotou. (Karathanasis, 2017)

Syntéza HDL počíná zvýšenou produkcí apoA-I (či apoE nebo také apoA-IV), viz obrázek 3, kde se setkává s molekulami volného cholesterolu, které za pomoci LCAT jsou esterifikovány. Je tomu tak, neboť nově vzniklé apoA-I jsou chudé na lipidy. Nejen cholesterolem, ale i fosfolipidy se o lipidové složky významně obohacují. (Lüscher, 2014)

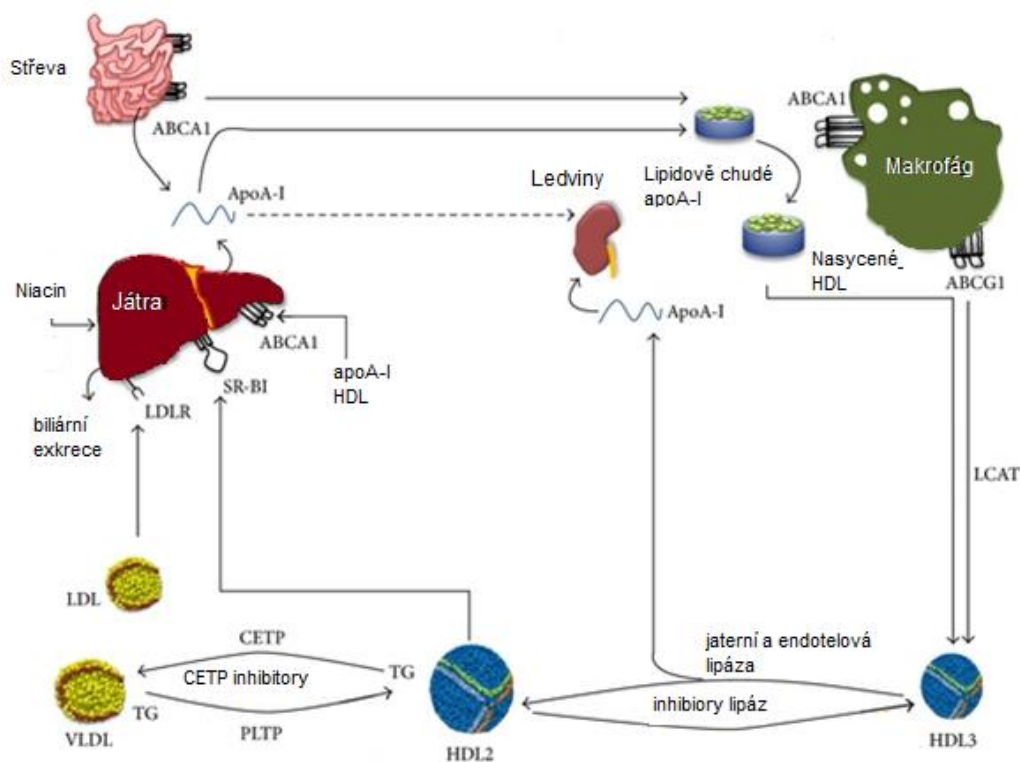
Tvar částice je nejdříve diskovitý a postupně je zakulacen a zahuštěn. Enzym LCAT spolupracuje s ATP-dependentními kazetovými transportéry (ABCA1, ABCG1), jak je znázorněno na obrázku č. 3. Činností plazmatických bílkovin se utváří směs více subpopulací HDL. Tvorba trvá několik dní, bylo zjištěno, že u osob trpících glukózovou intolerancí trvá déle. (Lüscher, 2014)

Asociaci apoA-I s lipidy a volným cholesterolem zprostředkovává ABCA1 transportér. Vzniklé diskoidní HDL částice jsou nazývány pre- $\beta$ -HDL. Právě esterifikací prostřednictvím LCAT získává nová lipoproteinová částice sférický tvar. V jádře jsou vlivem LCAT kondenzovány cholesterol-estery, které vznikly esterifikací části volného cholesterolu na povrchu pre- $\beta$ -HDL. Nadbytek cholesterol-esterů je transportován pro LDL či VLDL prostřednictvím apoB může být umožněna látková výměna za TAG. (Karathanasis, 2017)

Po esterifikaci následuje hydrolýza, kterou zajišťuje jaterní lipáza. Funkce jaterní lipázy je hydrolyzovat TAG lipoproteinů. Jaterní lipáza (HL) patří do rodiny lipáz, stejně jako lipoproteinová lipáza. Jaterní lipáza hydrolyzuje TAG obsažené v pre- $\beta$ -HDL právě proto, že jako zdroj energie pro lipázy jsou mastné kyseliny (tzn. jejich zbytky v TAG). (Vlček, 2010)

Pre- $\beta$ -HDL jsou menší než zralé HDL částice a mají diskoidní tvar, neboť obsahují v jádře méně hydrofobních lipidů. Zároveň mohou snáze procházet kapilárním řečištěm a lépe difundovat do intersticia, tam následně získávají volný cholesterol a fosfolipidy od buněk parenchymu. Pre- $\beta$ -HDL je lipidově zahuštěno a zvětší svou velikost. Průkazy o velikosti nezralých HDL částic jsou sledovány elektroforeticky na 2D agarózových gelech. Při změně migraci, tedy průkazu větších částic, se nazývají již sférické částice  $\alpha$ -HDL. Dále se dělí dle velikosti od nejmenších  $\alpha_1$ -HDL až po  $\alpha_4$ -HDL, které v oběhu převládají. Od dozrání HDL částic je možné je právě dělit na jednotlivé třídy. Malé husté a časté jsou HDL3 třídy a od nich odvozené větší a méně zahuštěné jsou poté HDL2. (Karathanasis, 2017)

Výměna cholesterol-esterů a TAG mezi HDL a LDL nebo VLDL je zprostředkována pomocí CETP. Lipoproteiny se mohou také obohacovat o své apoproteiny, ovšem jedná se pouze o apoC a apoE, tzn. ty, které mají společné. Účinkem enzymů se mohou HDL částice i zmenšit vlivem hydrolýz, např. vlivem jaterní lipázy nebo lipoproteinové lipázy. Hydrolyzované HDL částice již nemusí být funkční a podobně jako chylomikronové zbytky po své hydrolýze mohou být odstraněny játry případně ledvinami či znovu zahuštěny a obnoveny jako jiné částice. Pestrost a přeměny tříd HDL zajišťují správné fungování dráhy reverzního transportu cholesterolu a různorodost funkcí napříč HDL třídami (obrázek 3). (Karathanasis, 2017)



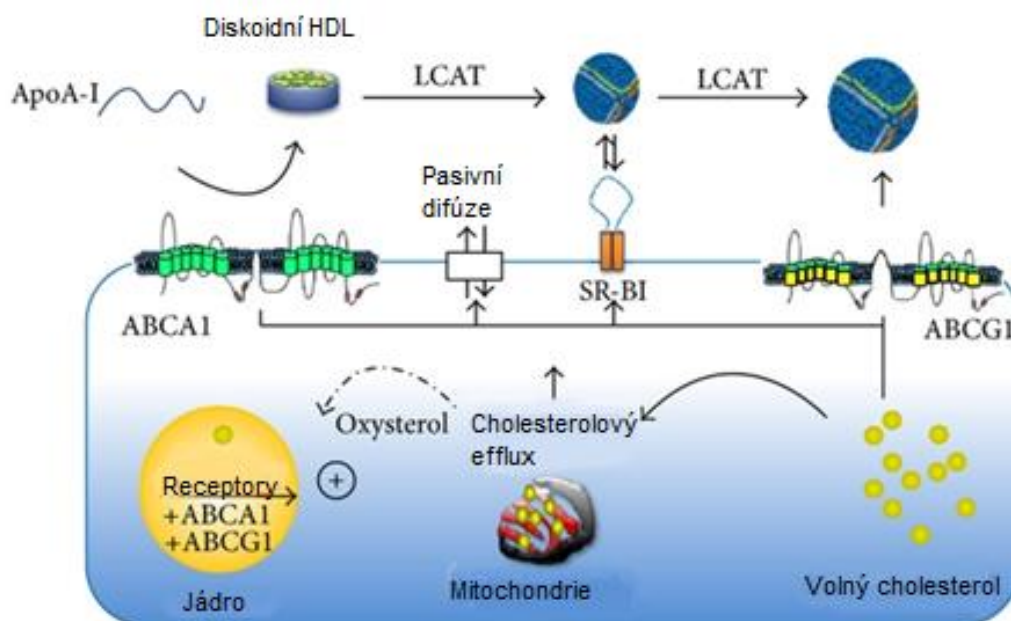
Obrázek 3 – Schematický diagram syntéz lipoproteinů dle metabolických cest (upraveno, Hafiane, 2013)

Ve směsi vznikajících HDL lipoproteinů nacházíme HDL částice s různým obsahem. Působením jaterní a endotelové lipázy dochází k přestavbám jednotlivých fenotypů HDL. Cholesterol-estery vytvořené působením LCAT pro syntézu HDL mohou být využity lipoproteiny o nižších hustotách, a to díky přítomnosti CETP. Naopak z LDL, VLDL a IDL za účinkování fosfolipid-transfer proteinu (PLTP) jsou k tvorbě HDL transportovány fosfolipidové částice, tak probíhá především syntéza HDL2 či HDL3. (Kontush, 2015)

V membráně hepatocytů a v makrofázích jsou pro HDL scavengerové receptory SR-BI, které určují hospodaření s cholesterol-estery. SR-B1 mají za úkol přijímat z HDL částic vybrané cholesterol-estery dle nároků jaterní tkáně. Počty SR-B1 závisí i na koncentraci steroidních hormonů, dle toho je nastolena homeostáza jater, a tedy i koncentrace vznikajících HDL částic. (Kontush, 2015), (Röhrl, 2013)

Na obrázku 4 je možné vidět vznik HDL jako diskoidní částice, která je poté dalšími cestami přeměněna na objemnější a kulovitou částici HDL s vyšší hustotou. Základem pro vznik HDL částic jsou ABCA1 (ATP-vázaný kazetový transportér třídy A1) a ABCG1 (ATP-vázaný kazetový transportér podtřídy G1) transportéry kódované stejnojmennými geny. Tyto transportéry zajišťují přísun energie v podobě ATP v tzv. kazetách. (Hafiane, 2013)

Cesty transportérů ABCA1 a ABCG1 jsou zprostředkovány pomocí jaterních receptorů X, též LXR, které spolupracují s receptory kyseliny retinové (RXR). LXR regulují expresi genů ABCA1 a ABCG1. Tyto transportéry jsou na makrofázích a přenášejí cholesterol či fosfolipidy (viz obrázek č. 3), a to v závislosti na předchozím kódování. Přenos probíhá přes plazmatickou membránu jádra na lipoproteinové akceptory již vznikající částice HDL. (Hafiane, 2013)



Obrázek 4 – Cesta vzniku HDL (upraveno, Hafiane, 2013)

Transportér ABCA1 má schopnost tvorbu HDL i omezit. ABCA1 je zprostředkovatelem energetického toku a zároveň transportu cholesterolu pro HDL. Zajišťuje i obohacení apoA-I o lipidovou složku. Experimentálními daty byly podpořeny hypotézy, že apoA-I se dokáže přímo navazovat na ABCA1 při tvorbě HDL, přičemž apoA-I je schopný se kompozičně přizpůsobit pro vznikající HDL částici, právě kvůli rozdílům ve velikostech jednotlivých subpopulací HDL částic, a i vzhledem k tomu, že zralý HDL je velikostně objemnější než nezralý. ApoA-I zvyšuje množství ABCA1 tak, že jej stabilizuje a chrání vůči degradaci. Transport cholesterolu do plazmatické membrány je tak podporován a usnadňován. (Kontush, 2015), (Hafiane, 2013)

Oproti ABCA1 má jeho příbuzný transportér ABCG1 nižší rozsah působení. Je tomu nejspíš proto, že se na něj nemá schopnost vázat apoA-I, to je možné pouze pokud je apoA-I lipidově obohacen. ABCG1 též zprostředkovává cholesterolový efflux, který je jednosměrný, stejně jako ABCA1, ovšem jen pro větší HDL částice. ABCG1 společně s LXR zvyšuje efektivitu transportních mechanismů při tvorbě HDL3. (Hafiane, 2013)

Nové poznatky ve studii ATP-kazetových transportérů naznačují, že ABCA1 a ABCG1 jednají v synergických pochodech. ABCA1 podporuje vylučování fosfolipidů a cholesterolu z buněk do apoA-I lipidově chudších, se kterými spolupracuje. Kdežto ABCG1 zajistí stejný export, ale pro větší, a tedy vyzrálejší HDL částice. Touto kooperací je vycytán cholesterol z makrofágů. (Hafiane, 2013)

Za pomoci LCAT je část volného cholesterolu esterifikována na cholesterol-estery a následně je dotvářena kulovitá plně funkční částice HDL. Zralé HDL částice mohou putovat do jater, kde jsou přijaty prostřednictvím SR-B1 receptorů. Mohou být taktéž hydrolyzovány jaterní nebo endotelovou lipázou. Za takových podmínek se uvolní apoA-I, který může být katabolizován ledvinami a opět navrácen do jater pro další syntézy lipoproteinů a celý cyklus syntézy HDL může být opakován. (Kontush, 2015), (Hafiane, 2013)

### 2.3 APOPROTEINY

Každý apoprotein má svou specifickou úlohu. Často jsou kofaktory enzymů, které ovlivňují metabolismus lipidů. Mohou mít funkci ligandů pro lipoproteiny a jejich vazbu na receptory buněk. Dále mohou umožňovat transport lipidových částic mezi lipoproteiny (např. výměna TAG mezi HDL a VLDL). Za hlavní a nejvýznamnější apoprotein HDL je považován apoA-I, neboť má nejvyšší podíl na ateroprotektivních vlivech HDL a funkčnosti HDL i v dalších ohledech. Oproti tomu apoA-II nemá jednoznačně prokazatelnou ateroprotektivní funkci, pouze se předpokládá, že je podobná jako apoA-I (viz tabulka 4). Funkce méně zmiňovaného apoC-III je dokonce považována až za proaterogenní. (Vlček, 2010), (Silbernagel, 2015)

Tabulka 4 – Apoproteiny HDL a jejich základní funkce (Kontush, 2015)

Apoproteiny	Mr [kDa]	Funkce
<b>ApoA-I</b>	28	Hlavní protein, strukturní, funkční, aktivuje LCAT
<b>ApoA-II</b>	17	Strukturní, funkční
<b>ApoA-IV</b>	46	Strukturní, funkční
<b>ApoC-I</b>	6,6	Vliv na aktivitu CETP, aktivuje LCAT
<b>ApoC-II</b>	8,8	Aktivuje LPL
<b>ApoC-III</b>	8,8	Inhibuje LPL
<b>ApoC-IV</b>	11	Aktivuje LPL
<b>ApoD</b>	19	Reguluje přeměny TAG
<b>ApoE</b>	34	Váže malé hydrofobní molekuly

<b>Apoproteiny</b>	<b>Mr [kDa]</b>	<b>Funkce</b>
<b>ApoF</b>	29	Strukturní, funkční, ligand LDL-R a LPR
<b>ApoH</b>	38	Inhibitor CETP
<b>ApoJ</b>	70	Váže negativně nabitě molekuly
<b>ApoL</b>	45	Váže hydrofobní molekuly, reakce s receptory
<b>ApoM</b>	25	Váže malé hydrofobní molekuly

Apoprotein A-I je majoritní složkou HDL, je tvořen v játrech a tenkém střevě. ApoA-I váže fosfolipidy a cholesterol. Tvoří přibližně přes dvě třetiny molekuly HDL. Důležitou funkcí, kterou apoA-I zastává je aktivace LCAT. Protekční mechanismy apoA-I se s rostoucím věkem snižují, platí to hlavně u mužů. S vyšším věkem klesá i tvorba apoA-I v HDL. ApoA-I se uplatňuje jako ateroprotektivní složka HDL. ApoA-I zajišťuje transportem pomocí ABCG1 nebo prostřednictvím SR-B1 přenos přebytečného volného cholesterolu do HDL částice. HDL s navázaným cholesterolem opouští např. aterosklerotický plát prostřednictvím lymfocytů a *vasa vasorum*, dráha transportu pokračuje do jater. (Röhr, 2013), (Karathanasis, 2016)

ApoA-I má také antiapoptotickou funkci. Apoptózou buněk endotelu je přispíváno k rozvoji aterosklerotických plátů nebo jinému poškození buněk. ApoA-I může inhibovat signály endoteliálních buněk pro navození apoptózy, konkrétně ovlivní endoplazmatické retikulum, mitochondrie buněk i receptory na povrchu buněk. Proti inhibičnímu vlivu apoA-I na signály pro apoptózu buněk vystupují jako antagonisti oxidované formy LDL. ApoA-I tzv. lipidově chudší, tedy u HDL menších velikostí (hlavně HDL3) je v usměrňování apoptotických signálů účinnější než například u třídy HDL2 nebo než u jiných apoproteinů třídy apoA. ApoA-I se též podílí na antitrombogenních účincích v endotelu, může ovlivnit signální dráhy pro aktivaci trombocytů a také jejich agregaci. (Karathanasis, 2016)

Dále apoA-II, zaujímá asi jednu pětinu kapacity pro apoproteiny HDL, liší se od apoA-I svou funkcí i povahou. ApoA-II je hydrofobnější a jeho oxidace může být významným faktorem při vzniku diabetu typu 2. (Azizkhanian, 2016)

ApoA-IV je naopak nejhydrofilnější, to umožňuje jeho efektivnější cirkulaci a účinkování. Také oproti předchozím typům apoproteinů třídy Také není tvořen v játrech, ale především v enterocytech lačnicku. (Kohan, 2015)

Apoproteiny apoC-I se vyznačují velmi malou molekulou s pozitivním nábojem, což umožňuje vázat molekuly s negativními náboji na funkčních skupinách. Významnou roli



hraje v inhibici jaterní lipázy. Zároveň se ApoC podílí na aktivaci LCAT. Další apoproteiny třídy C jsou přítomny nejen v HDL, ale i ve VLDL. Většinou hrají důležitou roli v metabolismu lipoproteinové lipázy. (Kontush, 2015)

Oproti tomu apoD je významnou složkou lipoproteinů mnoha tkání v lidského těla – v játrech, ledvinách, mozku, dvanáctníku, varlatelych, plicích, slinivce, slezině, srdci a v kůži. Zajímavou funkci zaujímá apoD v mozku, neboť chrání mozkovou tkáň před oxidačním stresem, rovněž je vysoce afinní k molekule LDL. To může napomáhat regulaci hladin LDL. Také se spekuluje o protekční roli při vazbě na nádorové buňky. (Braesch-Andersen, 2014)

ApoE zajišťuje vazbu s glykosaminoglykany na povrchu buněk. Tento apoprotein je odvozen od LDL částice bohaté na TAG. Díky tomu je ApoE odolný vůči degradaci a má lepší schopnost zpětně se dostávat do tkání. Takové vlastnosti umožňují, aby ApoE zajišťoval regeneraci HDL bohatých na ApoE, což HDL částice činí odolnější vůči degradaci. Nestabilní hladiny ApoE jsou předmětem studií Alzheimerovy choroby. (Röhrl, 2013), (Soto, 2015)

ApoF je zcela odlišný od předchozích skupin, tento glykoprotein má na sobě navázané sialové kyseliny, je syntetizován pouze v játrech a inhibuje CETP. ApoH je též syntetizován játry, vyznačuje se svým pozitivním nábojem, a proto i schopností vázat se na fosfolipidy porušených buněk a narušovat průběh koagulační kaskády. ApoJ má též pozitivní náboj a je variabilní ve svých vazbách na negativně nabitě molekuly. ApoL je proteinem regulujícím apoptózu vazbami na buněčné receptory, tuto funkci umožňuje jeho glykosylační místo. ApoM má specifickou strukturu s takzvanou hydrofobní kapsou, která umožňuje vazbu malých hydrofobních molekul, uváděny jsou např. molekuly odvozované od sfingosinu. (Kontush, 2015)

## 2.4 ENZYMY, PROTEINY DALŠÍ SLOŽKY HDL

Nejvýznamnějším enzymem HDL je lecitin-cholesterolacyltransferáza (LCAT). Jedná se o enzym syntetizovaný játry, v menším množství např. i v mozku a varlatelych. Hlavní funkcí LCAT je katalýza přenosu acylu z lecitinu na cholesterol, tzn. že tento enzym umožňuje esterifikovat plazmatický cholesterol na cholesterylester. LCAT je unikátní tím, že je jediným enzymem katalyzujícím esterifikaci cholesterolu. (Holeček, 2006)

LCAT je obsažena v apoproteinech, hojně v apoD nebo apoB. Je na apoproteiny HDL navázána, stejně tak je možné, aby vytvářela vazbu s apoB apoproteiny LDL. LCAT interaguje ve vazbě na apoproteiny s HDL či LDL změnou jejich konformace. Aktivaci LCAT zprostředkovává apoA-I, sekundárně i apoE. (Kontush, 2015)



Další apoproteiny náležící HDL z tříd apoA a apoC mohou též LCAT aktivovat, ale nikoli v takové míře jako již zmíněné apoB. Existují studie, které se zabývají nepřímým vlivem aktivity LCAT na vznik aterosklerózy. Testy na zvířatech bylo zjištěno, že zvýšená aktivita LCAT toto riziko zvyšuje, nedostatek LCAT se naopak prokazuje jako ateroprotektivní faktor. (Kontush, 2015)

LCAT je považována za ústřední enzym metabolismu lipoproteinů. Je tomu tak, neboť LCAT zajišťuje dozrání HDL. Pre- $\beta$ -HDL pod vlivem LCAT interaguje s apoA lipidově různě sycenými, interakce probíhá společně s ABCA1. Následuje efflux fosfolipidů a volného cholesterolu, pre- $\beta$ -HDL částice jsou syceny a zahušťovány, dokud nejsou zralými HDL. LCAT také přispívá k udržování gradientu volného cholesterolu mezi extracelulárním prostorem a buněčnou membránou. Má také funkci podporovat cholesterolový efflux tím, že brání buňkám zpětně přijímat cholesterol, umožňuje tedy reverzní transport cholesterolu. (Ossoli, 2016)

Při dysfunkcích LCAT (např. genetickými vlivy u syndromů jako je familiární deficiencie LCAT nebo FED – fish eye disease) ztrácí LCAT schopnost zprostředkovávat esterifikaci cholesterolu, jak u HDL, tak i u LDL částic. Projevy nedostatečnosti LCAT mohou souviset s anémiemi, onemocněními ledvin nebo neprůhledností rohovky. Při laboratorních vyšetřeních byly pozorovány poklesy hladin HDL a apoA-I, koncentrace volného cholesterolu může stoupat až k hypercholesterolémii. (Ossoli, 2016)

Dalším enzymem významným pro metabolismus HDL je paraoxonáza (PON). Svou povahou je tento enzym laktonázou, neboť je závislý na přísunu vápníku. Název enzymu se odvíjí od jeho funkce, kterou je hydrolýza paraoxonu a dalších příbuzných organických látek. Skupina PON je dělena na tři subpopulace, a to PON1, PON2 a PON3. (Kontush, 2015)

K HDL se PON váže prostřednictvím fosfolipidů na povrchu. Nejznámější jsou PON1. PON2 nejsou v séru detekovatelné. PON3 jsou strukturálně podobné PON1 a také závisí na přísunu vápníku. (Kontush, 2015)

Faktor aktivující krevní destičky-acetylhydroláza (PAF-AH), známý také jako lipoproteinem asociovaná fosfolipáza-A2 (LpPLA2), je enzym se schopností hydrolyzovat PAF a zajišťovat degradaci tohoto faktoru. PAF-AH je nezávislý na přísunu vápníku, rozpoznává oxidované formy fosfolipidů od neoxidovaných. Oxidované mají prozánětlivé účinky eliminuje jejich hydrolýzou. PAF-AH nacházíme ve tkáních, především v makrofázích, mimo jiné také v mozku. V krevním oběhu se PAF-AH nachází vázán na LDL či HDL částice, v naprosté většině případů je vázán k HDL a k lipoproteinu (a). (Kontush, 2015)

Glutathion-selenoperoxidáza-3 (GSPx-3) nebo také pouze glutathionperoxidáza 3, je enzymem z rodiny GSPx enzymů, které mají za hlavní funkci ochranu buněk tkání před oxidačním poškozením. Enzymy GSPx-1 a GSPx-2 se nacházejí hlavně v erytrocytech a cytosolu hepatocytů. GSPx-3 je enzymem tvořeným játry, ledvinami, plícemi a srdcem, dokonce i placentou. V plazmě ho najdeme ve vazbě k HDL. (Kontush, 2015)

Částice HDL obsahuje mnoho proteinů. Jedním z nich je cholesterol-ester transferový protein (CETP). CETP je proteinem, který má klíčovou funkci v reverzním transportu cholesterolu. Nachází se v játrech a tukové tkáni. Zajišťuje přenos cholesterol-esterů i TAG mezi HDL a LDL nebo VLDL. Tento přenos může být obousměrný. Princip transportu je založen na hydrofobní povaze a struktuře CETP, která je schopna nést dvě molekuly cholesterol-esterů a zároveň se přizpůsobovat svou velikostí v závislosti k nárokům HDL. (Holeček, 2006)

Fosfolipidový transfer protein (PLTP) patří stejně jako CETP mezi skupinu proteinů označovaných BPI (bacterial permeability increasing protein = protein zvyšující propustnost bakteriálních stěn). Funkcí PLTP je přizpůsobení velikosti HDL částic, tzn. přeměny HDL na jednotlivé třídy HDL. Dále se PLTP podílí i na transportu fosfolipidů. PLTP je na HDL neustále přítomen, tvořen je ve všech orgánech klíčových pro metabolismus lipoproteinů, tedy v játrech, pankreatu, ledvinách, srdci, kosterním svalstvu a mozku. (Kontush, 2015)

Proteiny asociované s HDL jsou také proteiny akutní fáze. Jejich množství je malé, ale funkčně významné. Během zánětlivé reakce je jejich množství navýšeno tak, že přesahuje početně i apoproteiny, souvisí to zároveň i s tím, že hladiny konkrétně apoA-I i apoA-IV se během zánětu snižují. Pozitivními proteiny akutní fáze jsou sérové amyloidy-A (SAA). Při reakci akutní fáze pozorujeme jejich zvýšené vylučování na tři jaterní formy: SAA1, SAA2 a SAA4. Hlavním proteinem tříd sérových amyloidů, který tvoří vazbu k HDL, je SAA1. (Holeček, 2006), (Kontush, 2015)

Dalším proteinem, který je rovněž tvořen játry, je fibrinogen. Během hemokoagulace je přetvářen ze své rozpustné struktury na nerozpustný fibrin. Dalšími složkami HDL částic jsou také glykoproteiny: alfa-1-kyselý glykoprotein (alfa-1-AG) a alfa-2-HS. Oba glykoproteiny jsou syntetizovány v játrech a nachází se volně v séru. Alfa-1-AG patří také mezi proteiny akutní fáze, ale jeho vylučování je mnohem pomalejší než u předchozích. Jeho funkce není zcela známa, ale předpokládá se, že se podílí na imunitní odpovědi během zánětlivých procesů. Alfa-2-HS, jinak nazýván též fetuin A, je nalézán hojně v krevním oběhu již u plodu a až do dětského věku. Tomu odpovídá jeho funkce, poněvadž se podílí na metabolismu kalcifikace kostí. (Kontush, 2015)

HDL částice jsou asociovány i se složkami komplementu. Zmínit se dají hlavně složky C3 a C4, které komplement aktivují. Dále pak skupina inhibitorů serinových proteináz, které mají proteolytické funkce. Jsou nazývány serpiny a podílejí se na hemokoagulaci, zánětlivé reakci a angiogenezi. Jedná se např. o alfa-1-antitrypsin, který v HDL běžně nacházíme, méně pak alfa-2-antiplazmin. V částicích HDL je možné nalézt i modifikovaný haptoglobin, protrombin či angiotensinogen, také serpiny inter-alfatrypsinu a bikunin, kininogen-1, které inhibují plazmin a elastázu. Dále také albumin, hemopexin, protein vitamínu D a mnohé peptidy. (Kontush, 2015)

Zmiňované proteiny nacházené v HDL nebo na jejich povrchu, jsou v naprosté většině případů tvořeny v játrech, k HDL se vážou disulfidicky nebo N-glykosidovými vazbami či jiným způsobem. Jejich funkce jsou různého charakteru. Zabraňují nežádoucím přeměnám HDL částic na patologicky změněné a udávají jakou měrou se budou HDL podílet na protizánětlivých odpovědích a jak budou odolné např. mikrobiálnímu působení nebo autoimunitním reakcím nebo zda využívají HDL částici jako přenašeče k prodloužení svého biologického poločasu. (Lüscher, 2014)

Je také možné, že pokud dojde k patologickým změnám ve struktuře HDL, pak enzymy, proteiny i látky zastoupené ve velmi nízkých koncentracích mohou své protektivní funkce změnit na nebezpečně patogenní, tzn. podporovat zánětlivou imunitní odpověď nebo zablokovat receptory pro enzymy funkčních HDL částic. (Lüscher, 2014), (Kontush, 2015)

Kromě převažujících proteinů jsou HDL lipoproteiny bohaté na lipidy, a to jak na svém povrchu, tak i v jádře. Na povrchovém obalu nacházíme bohatě sfingolipidy, mezi které patří sfingomyelin, sfingosin-1-fosfát (zajišťující antitrombogenní vlastnosti HDL). Dále jsou to fosfolipidy a volný cholesterol, v jádře cholesterol-estery, mohou zde být i další sterolové sloučeniny. Sfingosin-1-fosfát je markerem pro prevenci KVO, pacientů s diabetem mellitem, s artritidou i dalších onemocnění. Podílí se na vasoprotektivní funkci endotelu, inhibici aktivace monocytů, a naopak na navýšení účinnosti reverzního transportu cholesterolu. Sfingosin-1-fosfát je přítomen u menších hustších HDL částic, což potvrzuje hypotézu, že menší HDL částice, mají větší protektivní potenciál. Sfingosin-1-fosfát byl experimentálně podáván pacientům po infarktu myokardu a byla pozorována částečná obnova dysfunkčních HDL na funkční HDL částice. U pacientů trpících KVO nebo diabetem mellitem byly často pozorovány společně se sníženými hladinami HDL i snížené koncentrace sfingosin-1-fosfátu. (Karathanasis, 2016)

## 2.5 PROTIZÁNĚTLIVÉ PŮSOBENÍ

Ochranná funkce HDL ve vztahu k buňkám endotelu cév arterií je založena na protizánětlivém působení a antioxidační aktivitě. Velké epidemiologické studie popisují, že zvýšení hladin HDL o 0,025 mmol/l znamená prokazatelně nižší riziko KVO, u žen o 3 % a u mužů o 2 %. Více přínosná se ukázala analýza studií zaměřená na zvýšené hladiny TAG v souvislosti s výskytem zánětlivých onemocnění. Při zvýšení HDL-cholesterolu a snížení TAG hladin, které byly mírně zvýšeny, se rovněž riziko KVO snižuje. (Hafiane, 2013), (Soška, 2009)

Protizánětlivé účinky HDL byly studovány pro potřebnou inhibici aktivace monocytů. HDL má schopnost proliferovat progenitory myeloidní řady, soustředí se jak na monocyty, tak i na tkáňové makrofágy, dendritické buňky, inhibici exprese chemokinů, cytokinů a omezení funkce antigen-prezentujících buněk. Platí, že HDL menších velikostí s vyšší hustotou mají vyšší protizánětlivé účinky. Například HDL částice třídy HDL3 inhibují oxidační procesy v endotelu výrazněji než větší HDL částice. (Karathanasis, 2016)

Protizánětlivé účinky HDL jsou zajišťovány z velké části prostřednictvím apoA-I, kterého mají ve svém obalu hojně. ApoA-I se účastní inhibice vylučování chemotaktického faktoru v adipocytech, poté je možné ovlivnit aktivované monocyty. Makrofágům je zabraňováno se shlukovat, tím je zpomalována zánětlivá odpověď na přebytek cholesterolu v krevním oběhu. (Han, 2015)

V kooperaci s ApoA-I je produkován oxid dusnatý, jeho produkce zajišťuje ochranu endotelových buněk před adhezí progenitorů zánětlivé imunitní odpovědi, která by nastala jejich proliferací. Podobně přispívá i receptor SR-B1, účinkuje proti produkci protilátek (plazmatickými buňkami ve tkáních) prostřednictvím předchozí signalizace od ApoA-I a to tak, že ApoA-I vysílá pro SR-B1 receptory takové signály právě v případě, že je třeba zvýšit senzitivitu na oxidované formy 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholinu (oxPAPC), které jsou hlavním oxidačním produktem oxidovaných LDL částic a považovány za vysoce aterogenní efektoři. (Emert, 2014)

HDL také výrazně snižuje adhezivitu leukocytů. Inhibuje expresi tkáňového faktoru, a proto působí antitrombogenně. Další protizánětlivou funkcí je, že HDL působí jako inhibitor aktivátorů krevních destiček a zároveň podporuje regeneraci poškozených tkání. HDL dokáže přímo snižovat množství aktivovaných makrofágů. (Lüscher, 2014), (Hafiane, 2013)

Lipidy pohlcené makrofágy v endotelu mohou být odstraněny sterolovým effluxem. Mechanismus sterolového effluxu je jednou z posledních možností, jak odvrátit přeměnu

akutního zánětlivého procesu na chronický, který by mohl vyústit ke vzniku aterosklerotických plátů. Sterolový efflux je podporován kazetovým transportérem ABCG1. Zprostředkovávají ho apoproteiny ApoA-I a ApoE a to tak, že ApoE je exprimován na povrch makrofágů a ApoA-I při kontaktu makrofágů s HDL. Pokud propukne akutní zánětlivý proces, který by protizánětlivé působení HDL utlačil, vymizí i schopnost HDL podporovat sterolový efflux. Narušením homeostázy endotelu cév by mohlo dojít k rozvoji chronického zánětu. Během působení HDL vůči zánětlivým procesům byly pozorovány významné změny v poměrech jednotlivých složek HDL, kterými jsou: ApoJ, ApoE, ApoM, ApoA-IV, ApoC, LCAT, PON1 a fosfolipid transfer-proteinu. (Didichenko, 2016)

Subtyp lidského apoA-I stanovený dle fosfatidylcholinu (jedna z metod stanovení množství apoproteinů pro terapie KVO) je označován jako CSL112. Nacházíme ho u velmi malých HDL částicích. Množství tohoto subtypu apoA-I z celkového počtu apoproteinů třídy A-1 tvoří 5 %. Do studie, která se vlastnostmi CSL112 zabývala, byli zahrnuti dobrovolníci, kterým byly podávány infuze CSL112. Po stanoveném čase u nich byl pozorován nárůst apoA-I chudého na lipidovou složku. Stalo se tak v důsledku působení subtypu apoA-I CSL112 na HDL, konkrétně na HDL2 a HDL3 třídy. ApoA-I chudé na lipidovou složku vznikají lipolýzou HDL indukovanou jaterní lipázou nebo lipázou endoteliální. (Didichenko, 2016)

Zda je CSL112 vhodným preparátem pro prevenci KVO nebo jako složka léčiv po již proběhlých cévních onemocněních je předmětem dalších probíhajících klinických studií. CSL112 nemá v lidském organismu vedlejší účinky, především neovlivňuje se s apoA-II, dokonce ani s apoB-48. Účinky CSL112 jsou silně protizánětlivé, vzhledem k HDL částicím mají protekční schopnosti. CSL112 podporují vychytávání cholesterolu z makrofágů a inhibují produkci cytokinů zánětlivé imunitní odpovědi, konkrétně TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) a IL-6. (Didichenko, 2016)

TNF- $\alpha$  je uvolňován makrofágy adhezanými na povrchu endotelu cév. Výzkumy zabývající se problematikou vzniku aterosklerózy potvrdily, že TNF- $\alpha$  je v aterosklerotických lézích hojně přítomen. TNF- $\alpha$  má negativní vliv na interakci transportérů ABCA1 s pěnovými buňkami, v důsledku znemožňuje fyziologické probíhání reverzního transportu cholesterolu. (Novotný, 2013)

Při porušení mechanismů protizánětlivého působení HDL částic se nabízí reparace sterolového effluxu pomocí sérového amyloidu-A jako možná obnova poškozených mechanismů. Reparace probíhá na základě obohacení HDL částic o sérový amyloid-A. Při dosažení dostatečného nasycení sérovým amyloidem-A se obnoví narušené funkce HDL,

konkrétně funkce vychytávat sterolové látky z makrofágů endotelových tkání. Princip reparace pomocí SAA spočívá ve schopnosti SAA navyšovat expresi ABCG1. (Vaisar, 2015)

U jednotlivých podtříd HDL částic během zánětlivé reakce nastávají viditelné rozdíly v obsahu částic, mění se strukturální uspořádání složek HDL. Děje se tak nejen při infekčně zánětlivých onemocněních, ale i u diabetiků, pacientů s kardiovaskulárními chorobami a lidí trpících onemocněním ledvin. Bylo prokázáno, že tato onemocnění potlačují ochranné vlivy jednotlivých HDL částic, buď ztrátou či eliminací HDL částic nebo častěji právě prostřednictvím jejich strukturální přeměnou. Tak tomu bývá často u pacientů trpících obezitou s metabolickým syndromem, z čehož se poté mohou odvozovat již zmíněná onemocnění. U pacientů s metabolickým syndromem jsou pozorovány snížené hladiny HDL cholesterolu a počínající chronický zánět endotelu cév (nejčastěji se jedná o onemocnění SLE – systémový lupus erythematoides, revmatoidní artritidu). (Lüscher, 2014), (Han, 2015)

HDL působí protekčně především v endotelu cév, kde stimuluje odstraňování reaktivních molekul kyslíku. Předpokládá se, že protizánětlivé působení HDL z hlediska evoluce bylo více univerzálním než je tomu dnes. Až postupem času se více studovaly protekční mechanismy např. v antiaterogenní, antiapoptotické či antitrombogenní. Je tomu tak pravděpodobně proto, že cévní onemocnění byla a jsou čím dál častějšími příčinami úmrtí. Také u pacientů trpících rakovinou se zánětlivými projevy byla objevena přítomnost HDL právě v oblastech center zánětlivých procesů u poškozených tkání. Často tomu bylo po chemoterapiích, konkrétně u pacientů s rakovinou prsu. S rostoucí závažností rakovinného onemocnění hladiny HDL klesají. (Lüscher, 2014), (Wolfe, 2015)

Ve studiích zabývajících se příčinami a léčbou karcinomu prsu bylo objeveno, že kombinovaná léčba založená na navyšování hladin HDL byla v mnohých ohledech přínosnější než pouhé podávání cytostatik. Výsledky terapie s HDL ukazovaly, že karcinom mohl být redukován průměrně až o 20 %. Při pozorování hladin HDL částic u jednotlivých pacientů v období pěti let se ukázalo, že jedinci s nižšími hladinami HDL, než jsou minimální fyziologické hodnoty, podléhali nádorovým onemocněním snáze. Studie demonstrovala důležitost monitorování HDL, ale i VLDL koncentrací, u nádorových onemocnění. HDL částice mohou tedy posloužit jako jeden z markerů rizik vzniku časných nádorů. (Wolfe, 2015)

Z pohledu genetiky se u osob s nízkými hladinami HDL objevují snížené hladiny mRNA potřebné pro expresi ABCA1 a ABCG1 genů, které kódují ABCA1 a ABCG1 kazetové transportéry, na kterých závisí zajišťování dostatku scavengerových receptorů. Z toho plyne, že vlivem snížených hladin mRNA je ovlivněn reverzní transport cholesterolu. Indikují jej také snížené počty SR-B1. (Holyen, 2013)

IL-6 zvyšuje aktivitu receptorů pro HDL a podporuje tak reverzní transport cholesterolu. S vyšší aktivací reverzního transportu cholesterolu se zánětlivá odpověď imunitního systému neuplatňuje v takové míře. A tedy ačkoli je IL-6 prozánětlivým cytokinem, ukazuje se, že tomu je tak pouze při zánětlivé imunitní odpovědi, bez signalizace imunitního systému je protizánětlivým, a dokonce kooperuje pozitivně s endotelovou lipázou. HDL je účastníkem imunitní odpovědi, a to nejen v interakci s cytokiny. HDL má vliv i na proliferaci pluripotentních kmenových buněk, progenitorů myeloidní a lymfoidní řady. A může ovlivňovat i jejich diferenciaci. Takové zasahování do imunitního systému je pro organismus prospěšné hlavně ve vztahu k autoimunitním onemocněním. Takové působení HDL však je pouze ojedinělé. (Run-Lu, 2016), (Novotný, 2013)

Během probíhající zánětlivé reakce se HDL modifikuje a ve svých protizánětlivých účincích ochabuje. Při již vzniklém chronickém zánětu cévních stěn je IL-6 silně prozánětlivý a také se ukazuje, že samotné protizánětlivé působení některých HDL bylo narušeno natolik, že se působení HDL částic na endotel cév též časem změnilo na prozánětlivé. V hladkých svalech cévních stěn působí prozánětlivě i IL-8. HDL má schopnost jej inhibovat podobně jako myeloperoxidázu (MPO). (Hafiane, 2013), (Run-Lu, 2016)

V návaznosti na produkci cytokinů se při již vzniklém chronickém zánětu cév vyskytují vyšší hladiny sérového amyloidu A (SAA). Takové nálezy jsou především u pacientů s KVO. SAA tvoří skupinu proteinů reakce akutní fáze. Koncentrace SAA narůstají ihned po navýšení koncentrací C-reaktivního proteinu. SAA je stejně jako C-reaktivní protein produkován játry a přenášen na HDL částicích. Během imunitní odpovědi se tedy SAA uvolňuje z HDL. Působení SAA je protizánětlivé, právě tyto proteiny mají totiž schopnost inhibovat účinkování adipocytů ve prospěch zánětlivé reakce. Účinky SAA jsou dokonce protektivní ve vztahu k HDL, chrání jeho enzymy před poškozením, které by mohlo vyústit ve ztrátu jejich enzymové aktivity. Dané enzymy mají antioxidační funkce. (Han, 2015)

Význam přítomnosti SAA pro kardiovaskulární systém je potvrzován mnohými studiemi. Bylo prokázáno, že SAA má schopnost zpětně aktivovat patologicky inhibovaný reverzní transport cholesterolu vlivem makrofágů během zánětlivého působení. SAA se zároveň podílí na hojení poškozeného endotelu cév vlivem zánětlivých procesů. Proti působení SAA vystupuje negativně enzym myeloperoxidáza, jež je aktivována signály z reakcí radikálů kyslíku. Vlivem radikálů kyslíku je ochranný vliv SAA inhibován, to může vést k vážným poškozením apoA-I. (Han, 2015)

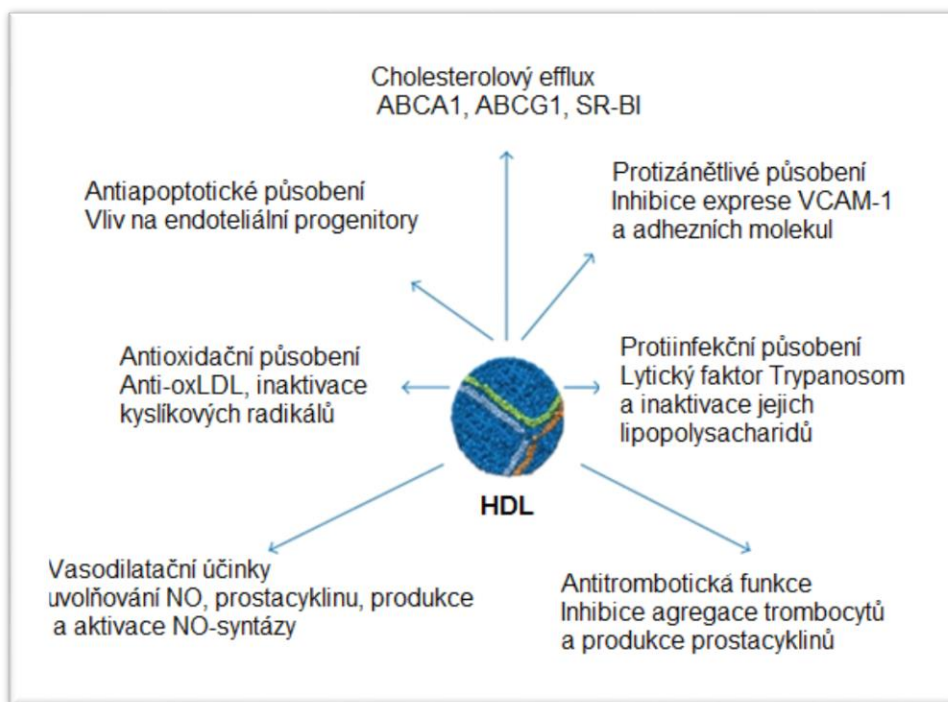
Konkrétně SAA1, SAA2 a SAA3 jsou složkami HDL, které se při zánětlivých procesech uvolňují do plazmy, a proto mohou při krevních vyšetřeních sloužit jako markery počínajícího

zánětu. Teoreticky by se mohlo jednat i o SAA4. Tyto čtyři skupiny sérových amyloidů A se též mohou podílet na vychytávání hydroperoxidů z radikálových reakcí a podílet se tak i na antioxidačním působení HDL částic. (Brites, 2017)

HDL je součástí nespecifické imunity. Při bakteriálních infekcích může apoprotein apoA-I vyvolat neutralizační reakce proti lipopolysacharidům, které některé bakterie obsahují a působí toxicky na buňky hostitele. Lipopolysacharidy bakteriálních stěn putují do krevního oběhu, reprodukují se a lyzují buňky tkání, imunitní odpovědí hostitele je zánětlivá reakce. HDL inhibuje zánětlivý proces vyvazováním lipopolysacharidů z buněk pomocí SR-B1 receptorů a odstraňuje je jejich neutralizací i inhibicí antigenů bakterií. (Hafiane, 2013), (Karathanasis, 2016)

Reakce bakteriálních lipopolysacharidů s HDL částicemi jsou někdy využívány ve výzkumu pro pozorování protizánětlivého a funkčního charakteru HDL lipoproteinů. HDL dokážou v určité míře eliminovat rozvoj bakteriální infekce, která by potenciálně mohla vést k zánětlivým procesům, které by podpořily rozvoj aterosklerózy. (Hafiane, 2013)

Rozšířenou antibakteriální funkci mají HDL částice, které na svém povrchu obsahují apoA-I a méně známou třídu apoL společně s jedním z proteinů akutní fáze – haptoglobinem. U bičíkovců rodu *Trypanosoma*, pro které je typické, že sají krev hostitele, je známa imunologická léčba komplexem hemoglobinu a haptoglobinu. HDL mající apoA-I a apoL tvoří



Obrázek 5 – Souhrn vlastností HDL částic (upraveno, Hafiane, 2013)



s haptoglobinem vazbu, ve vazebném komplexu haptoglobin následně aktivní Trypanosomy likviduje tak, že se naváže na jejich lytický faktor, který přivodí bakteriálním buňkám lýzu. Haptoglobinový komplex s HDL má k receptoru Trypanosom vysokou afinitu, proto může efektivně lytický faktor přenést do lysozomu, apoL-1 indukuje lýzu lysozomu a rozklad zbytků Trypanosomu kyselým obsahem lysozomu (viz obrázek 5). (Karathanasis, 2016)

Další složkou, jež má podíl na protizánětlivém působení částice HDL je nukleární faktor kappa B (nf- $\kappa$ B). Jedná se o transkripční faktor, který obsahuje více proteinů, které mají za hlavní funkci vázat se na sekvence DNA určené pro vazbu s RNA polymerázami. Ovlivňují expresi genů pro imunitní odpovědi a další důležité procesy a sama tato skupina transkripčních faktorů je ovlivňována interleukiny a také TNF- $\alpha$ . Po své aktivaci nf- $\kappa$ B vstupuje do jader buněk a má schopnost přepisovat geny ve prospěch obranných mechanismů např. vůči patogenům. Bylo zjištěno, že přítomnost nf- $\kappa$ B klesá úměrně s narůstajícím podílem patologicky změněných HDL. Kromě nf- $\kappa$ B se na protizánětlivém působení HDL účastní ještě sfingosin-1-fosfát (S1P) podrobněji zmíněn v této práci v kapitole o diabetu mellitu. (Hafiane, 2013)

Také typ HDL částic označovaných jako velmi malé HDL se podílí významně na protizánětlivém působení ve tkáních. Ukázaly se vysoce afinní k ABCA1 kazetovým transportérům. U HDL o větších rozměrech probíhají interakce s ABCA1 v menší míře. Bylo také potvrzeno, že jako důsledek modifikačních přeměn velmi malých HDL částic vlivem vysoké afinity k ABCA1 jsou v závislosti na cholesterolovém effluxu protizánětlivé účinky HDL silně potencovány. Podobných studií, které by se zabývaly blíže působením velmi malých HDL částic, je však zatím velmi málo. (Didichenko, 2016)

## 2.6 ANTIOXIDAČNÍ PŮSOBENÍ

HDL zajišťuje ochranu endotelu cév vůči tvorbě radikálových molekul LDL. Oxidované formy LDL by mohly vést k oxidativnímu stresu a ten k poškození tkání. Antioxidační funkci zastávají enzymy HDL, např. LCAT, destičky aktivující faktor (PAF-AH) acylhydrolázy, redukováná glutathion-selenoperoxidáza (GSPX) a paraoxonázy, především PON-1. Přičemž je známo, že pacienti trpící kardiovaskulárním onemocněním mají antioxidační funkce daných enzymů narušené nebo jsou enzymy inaktivovány. Úměrně s poklesem koncentrace HDL způsobeným patologickými vlivy klesají i aktivity enzymů HDL zajišťujících antioxidační působení, jsou to především PON-1 a PON-2. (Hafiane, 2013), (Holyen, 2013)

Je nutno podotknout, že u paraoxonáz a apoproteinů třídy J neboli clusterinů, byly objeveny jak antioxidační, tak i protizánětlivé účinky v závislosti na zánětlivém procesu. Stejně

jako může při rozsáhlejších akutním zánětu ochabnout sterolový efflux, může ApoJ i PON ztratit své funkce. Poté je daná částice HDL nadále dysfunkční, a tedy nezastává protektivní funkce. (Vaisar, 2015)

Principem působení paraoxonáz je hydrolyza paraoxonu. Nejaktivnější paraoxonázou je PON-1. PON1 je schopna hydrolyzovat laktony a jejich deriváty, glukuronidy, deriváty glukózy, látky pesticidní povahy nebo uhličitany. Paraoxon, po kterém se PON jmenují, je právě jedním z pesticidů. Obecně je hlavní funkcí paraoxonáz hydrolyza oxidovaných fosfolipidů. Přeměna HDL na dysfunkční lipoproteinovou částici je pro PON1 fatální, jelikož bude inhibována antioxidační funkce enzymu. (Brites, 2017), (Novotný, 2013)

Při přenosu molekuly cholesterolu prostřednictvím reverzního transportu cholesterolu je indukováno vylučování NO. Tento děj probíhá v závislosti na vazbě HDL k SR-B1. To signalizuje spuštění kaskády aktivace enzymů. Jedním z prvních je fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K), která zajišťuje fosforylaci NO-syntázy (NOS) a následně spouští produkci NO. Tvorbu NO podporuje přítomnost aktivované PON-1. (Hafiane, 2013)

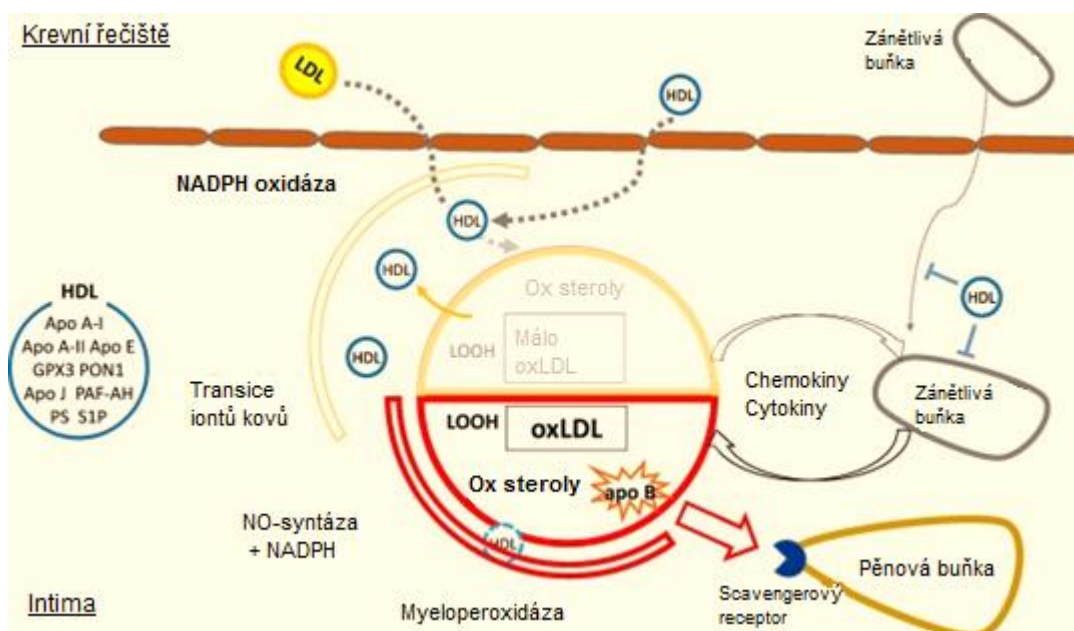
Měření antioxidační aktivity enzymů HDL je možné provádět nepřímo měřením míry oxidace fosfolipidů. Je možné také vyšetřit aktivitu PON, produkci superoxidů a aktivitu NADPH-oxidáz. Antioxidační aktivitu je možné měřit i testem založeným na principu fluorescence, kde se měří signál oxidovaných fosfolipidů ve vztahu k oxLDL. Hledí se na schopnost HDL inhibovat tvorbu daných produktů oxidačních reakcí. Na podobném principu se měří i oxidace dihydrorhodaminu 123, který indikuje reaktivní formy kyslíku a charakterizuje ho, že je sám látkou fluorescenčně neaktivní. Test s použitím dihydrorhodaminu 123 je fluorometrický a sleduje se míra oxidačních reakcí. Oxidace fosfolipidů lze sledovat i klasicky hmotnostní spektrometrií nebo imunoterapeuticky. (Hafiane, 2013), (Karathanasis, 2016)

Se sníženou antioxidační funkcí HDL roste stimulace nežádoucích oxidačních reakcí, vznikají tak oxidované LDL částice zvané oxLDL. S rostoucími počty oxLDL se uvolňují prozánětlivé mediátory součástí imunitní odpovědi na zvýšený oxidační stres. Expres ABCG1 a ABCA1 je snížena, a to natolik, že jsou dráhy reverzního transportu cholesterolu inaktivovány. OxLDL byly nalezeny v aterosklerotických plátech a je možné je z poškozených tkání i izolovat. Oxidace LDL je radikálovou reakcí, která probíhá ve dvou krocích, podnětem pro vznik radikálů je přeskupení elektronů. (Brites, 2017)

Děje se tak i působením enzymů myeloperoxidázy, NO-syntázy, NADPH-oxidázy apod. Zvýšená aktivita oxidujících enzymů přímo indukuje a alarmuje na sníženou antioxidační

aktivitu HDL (viz obrázek 6). HDL snáze likviduje jedno-elektronové volné radikály vzniklé oxidačními vlastnostmi oxLDL částic. Kdežto proti dvou-elektronovým oxidantům HDL částice působí s nižší efektivností. (Holyen, 2013), (Brites, 2017)

V krevním oběhu není vznik přiměřeného oxLDL patologickým dějem, jelikož v plazmě cirkuluje velké množství antioxidantů. Jsou jimi bilirubin, vitamin C a E, soli kyseliny močové, kataláza, glutathion-peroxidáza nebo superoxid-dismutáza. Z toho důvodu nemusí k interakci oxLDL s cévními stěnami vůbec dojít. Antioxidační působení HDL a zmíněných látek s antioxidační funkcí je společně se vznikem oxLDL a jejich oxidačních produktů (PAPC) v určité rovnováze, která může být narušena ztrátou jedné z antioxidačních funkcí nebo snížením cholesterolového effluxu, a to z různých příčin, kterými jsou většinou onemocnění související s cévním systémem nebo s metabolismem lipidů. (Brites, 2017)



Obrázek 6 – Mechanismus antioxidačního působení HDL na oxLDL (upraveno, Brites, 2017)

Schopnost HDL působit ateroprotektivně je založena na předcházení vzniku oxLDL, principem je tomu účinkování enzymů HDL, které mají antioxidační vlastnosti. Působí proti radikálovým reakcím a brání ukládání hydroperoxidů, vzniklých radikálovou reakcí počínající na LDL částicích, do tkání. (Brites, 2017)

Aby HDL částice mohla zastávat plný potenciál své antioxidační aktivity, je třeba, aby byla obsahově kompletní. Hlavní apoprotein HDL, apoA-I, se podílí na aktivaci LCAT a PON-1. ApoA-I inaktivuje hydroperoxydy z radikálových reakcí s LDL, dále inhibuje oxidace LDL již od jejich počátku. U ApoA-II se předpokládají obdobné antioxidační vlastnosti, ovšem

mnohé novější studie se zabývají i možnostmi proaterogenního vlivu apoA-II. Je možné, že apoA-II inhibuje interakce PON-1 s HDL, tudíž by se antioxidační aktivita nemohla zcela projevit. U apoA-IV jsou výsledky antioxidačních vlastností jasnější, apoA-IV má k apoA-I vysokou afinitu, a tudíž i funkční podobnost. (Brites, 2017), (Karathanasis, 2016)

Podobně jsou na tom i apoE a apoM. ApoM apoprotein má navíc schopnost vyvazovat oxidované fosfolipidy, které se mohou chovat podobně jako oxLDL. ApoD apoprotein oproti tomu zajišťuje kooperaci HDL a LDL částic v rámci zachování rovnováhy vychytávání cholesterolu a hospodaření s TAG a fosfolipidy. ApoD se v HDL nachází v oblasti s přítomností LCAT, mohou se tak vytvářet vazby, které potencují antioxidační potenciál LCAT. Podobně funguje i sdružování apoF s CETP. U CETP je známo, že dokáže pozitivně přispívat k inhibici průběhu reakcí vedoucích ke vzniku oxLDL. ApoJ a apoL apoproteiny zastávají více protektivních funkcí, jsou zaměřeny na odstraňování nefunkčních proteinů a buněk s nežádoucí patologií, např. autoimunogenů. (Brites, 2017)

Částice HDL3 obsahuje zpravidla ze všech tříd HDL nejvíce složek s antioxidačním potenciálem, konkrétně podtřída HDL3c. Tento údaj však zatím nebyl zkoumán podrobněji. (Brites, 2017)

Tabulka 5 – Typy dysfunkčních HDL dle svého vzniku (Novotný, 2013)

Typ modifikace	Faktory pro stanovení	Výsledný efekt
Ztráta vázaných enzymů	Pokles PON-1, PAF-AH	Ztráta antioxidačních vlastností
Ztráta či náhrada apoA-I	Vzestup SAA, TNF- $\alpha$ , ceruloplazminu	Ztráta protizánětlivých funkcí, poškození mechanismu RTC
Ztráta různých HDL proteinů	Pokles apoA-II	Strukturální přeskupení HDL
Ztráta protizánětlivých ligandů	Pokles estradiolu, sfingolipidů	Ztráta protizánětlivých funkcí
Modifikace lipidových či bílkovinných složek	Oxidované fosfolipidy, modifikace apoA-I	Dysfunkční HDL, poškození mechanismu RTC
Strukturální modifikace apoA-I	Oxidace methioninu, modifikace tyrosinu	Dysfunkční HDL, poškození mechanismu RTC, ztráta protizánětlivých funkcí

Hladiny dysfunkčních HDL lze měřit klasicky metodami, u nichž je principem měření počtu monocytů endoteliálních buněk. Metoda je však náročnější oproti novější jednodušší metodě využívající měření monocytů zvané MCA – monocytární chemotaktická metoda, jejíž principem je sledování monocytární chemotaxe ve vztahu k HDL částicím a dysfunkčním

HDL částicím. Aktivitu monocytů navyšují právě dysfunkční HDL částice. Pozorovacím prostředím je linie endoteliálních buněk. Jiná moderní metoda, zvaná „cell-free“ je rychlejší. Principem „cell-free“ metody je aplikace dichlorfluoresceinu, dle kterého lze pozorovat kapacitu protizánětlivého působení HDL ve vztahu k oxidačním reakcím LDL částic. Výsledkem je výpočet inflamačního indexu. Hodnoty indexu zdravých jedinců jsou  $> 1$ , hodnoty infalamečního indexu pacientů s dysfunkčními HDL  $< 1$  (většinou se ICHS stanovuje i pacientům s KVO). (Novotný, 2013)

Pomocí technik hmotnostní spektrometrie byly stanoveny závěry, že dysfunkční HDL lze identifikovat na základě pozorování změn poměrů apoproteinů HDL částic. Předpokládá se, že složení HDL2 je zásadní pro identifikaci jedinců s dysfunkčními HDL částicemi. Bylo zjištěno, že u pacientů s dysfunkcemi HDL se vyskytují zvýšené koncentrace apoC-III i lipoproteinu (a) a také strukturně pozměněné apoA-I. Technikám hmotnostní spektrometrie daných apoproteinů předcházela izolace HDL ultracentrifugací a posuzování proteinů u pacientů s ICHS vztažených na hodnoty zdravých jedinců. (Novotný, 2013)

## 2.7 VZTAH HDL K ATEROSKLERÓZE

Ateroskleróza je jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých státech. Definice dle WHO (World Health Organization) uvádí, že aterosklerózou se rozumí změny struktur *intimy* arterií jako důsledek ukládání lipidových částic, hlavně cholesterolu, dále polysacharidů atd. Vzniká fibrózní tkáň, jejíž struktura se mění s rozvojem zánětlivého působení na ateromy (viz obrázek 7). Jedná se o onemocnění charakterizované chronickým zánětem v důsledku endoteliální dysfunkce. Chronický zánět postihuje velké a střední tepny, zúžení cév se projevuje nejvíce na menších a středních tepnách. Ateroskleróza je nejčastější příčinou zúžení cév. Je hlavním patologickým mechanismem ischemické choroby srdeční (ICHS). (Brites, 2017)

Ateroskleróza vzniká aktivací buněk endotelu cév (v *intimě*) které počnou produkovat adhezní molekuly a ty se budou shlukovat. Jedná se o buňky leukocytární řady, jimiž jsou především lymfocyty a monocyty, dále lipidy, buňky hladké svaloviny a jiné. Produkce cytokinů vzroste aktivací buněčné imunitní odpovědi a poté nastane migrace cytokinů do *intimy* a *médie* cév. Tím je spuštěna zánětlivá reakce. Následuje sled cyklických destrukčních a reparačních procesů poškozeného endotelu, který může vést k tvorbě aterosklerotických plaků. Počátkem tomu je tvorba pěnových buněk, které později tvoří jádro. Příčinou vytváření pěnových buněk je vznik oxLDL v subendotelu v důsledku zvýšeného oxidačního stresu tkání. OxLDL vychytávají makrofágy, které zároveň iniciují produkci řady cytokinů a kooperují

s T-lymfocyty. Pěnové buňky vznikají kvůli nekontrolovatelnému pohlcování oxLDL scavengerovými receptory makrofágů. (Brites, 2017), (Novotný, 2013)

V endotelu působí adhezní molekuly VCAM (vascular cell adhesion molecule) a ICAM (intercellular cell adhesion molecule), které jsou příčinou změn propustnosti endotelu a touto cestou umožňují aktivaci monocytů. VCAM a ICAM tvoří skupinu imunoglobulinových adhezních látek na endotelu cév, které zajišťují adhezi leukocytů a vazbu integrinů na leukocyty. Aktivace VCAM a ICAM probíhá prostřednictvím cytokinů, které jsou produkovány v rámci zánětlivé odpovědi organismu. (Brites, 2017), (Novotný, 2013)

Vzniklé makrofágy prostupují endotelem a navozují kaskádu reakcí, během kterých se začnou uvolňovat další cytokiny (IL-1, IL-12, IL-8, interferony). Počíná aktivace protekčních složek lipoproteinových částic, rozvíjí se specifická imunitní reakce aktivací Tc a Th-lymfocytů. (Brites, 2017)

Kromě VCAM a ICAM adhezních molekul je zde i PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule), neboť se trombocyty účastní antiaterogenního působení této kaskády dějů. Je možné, že HDL může inhibovat vlastnosti adhezních molekul podtříd ICAM-1 a VCAM-1. (Novotný, 2013)

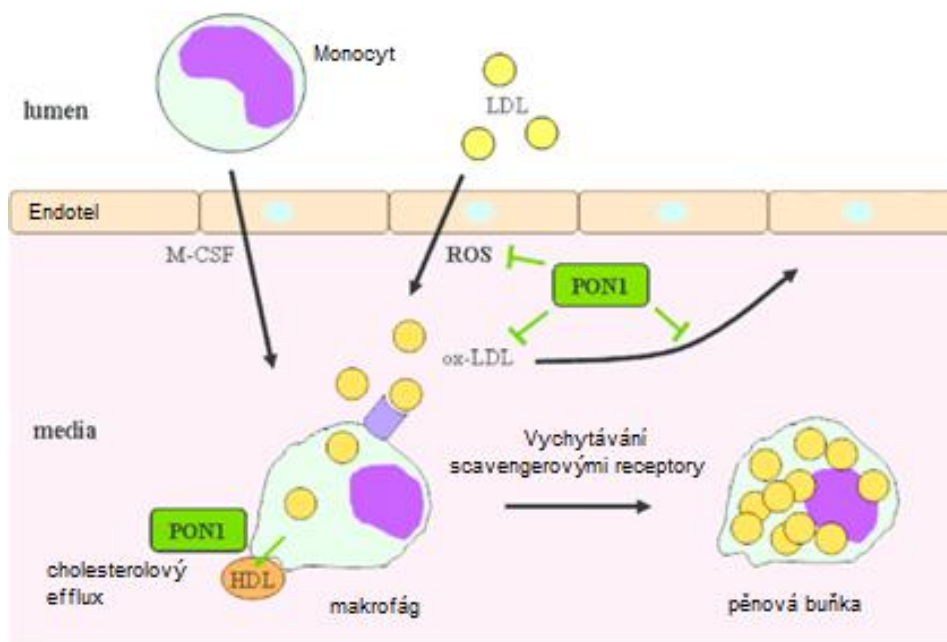
Rozvoj zánětlivého procesu naopak potencuje působení LDL. LDL podporuje vznik pěnových buněk potencováním signálů pro aktivaci monocytů. Přítomnost přílišného množství makrofágů zapříčiní zvýšené produkce prozánětlivých cytokinů, které podpoří oxidační procesy, díky čemuž hladiny oxLDL nadále porostou. Makrofágy budou oxLDL vychytávat, ovšem nad svou fagocytární kapacitu, proto se po určité době stanou pěnovými buňkami. Hromaděním pěnových buněk mohou vzniknout lipidní proužky, které jsou prvním z pěti stadií chronického aterosklerotického zánětu. (Kulka, 2016)

Vzniku pěnových buněk zabraňují paraoxonázy a to tak, že inhibují okysličování LDL částic pomocí radikálových oxidantů. PON1 zvyšují efektivnost odtoku cholesterolu z makrofágů (viz obrázek 7), které oxLDL fagocytovaly, aby předešly jejich přeměně v pěnové buňky. PON1 mají také vliv na tzv. chemoatraktantní protein endotelu, který udává signály pro syntézu aktivaci a syntézu monocytů, PON1 produkci tohoto proteinu inhibují. (Kulka, 2016)

Reakcí cévy je snaha opravit poškozený endotel zmnožením buněk hladké svaloviny, reparace změny endotelu na sekreční typ a produkce růstových faktorů. Reparační procesy vedou ke vzniku vazivového plátu, který charakterizuje druhé stádium aterosklerózy. V pěnových buňkách je hromaděn cholesterol, který nelze vychytávat cholesterolovým effluxem. Tyto buňky proto praskají, jejich obsah se vylévá do okolí a dává vzniknout jádru

ateromového plátu. Toto třetí stadium je hraničním bodem pro překročení kapacity antiaterogenních účinků HDL. (Brites, 2017), (Kulka, 2016)

Čím více je lipidové jádro ateromu zahušťováno, tím jsou omezovány protekční vlastnosti HDL. Protizánětlivé působení apoproteinů na povrchu HDL vyčerpáno oxidačními reakcemi, které apoproteiny funkčně eliminují a aktivita enzymů náležících HDL klesá, neboť dráhy pro jejich aktivace a rovnovážné prostředí látek je zánětlivými mediátory nevratně narušeno. (Brites, 2017)



Obrázek 7 – Protektivní funkce PON1 vůči pěnovým buňkám (upraveno, Kulka, 2016)

Čtvrtým stadiem je vznik fibroateromů, kdy lipidové jádro ateromového plaku získá vazivovou strukturu. To se projevuje výrazným snížením lumen cévy. Hladiny dysfunkčních HDL jsou velmi vysoké, zároveň nacházíme i vysoké množství oxLDL forem a jejich produktů. Takové stavy jsou typické pro první závažnější projevy selhání kardiovaskulárního oběhu. (Brites, 2017)

Přeměna HDL na dysfunkční částici se děje především inaktivací enzymů a antioxidačním potenciálem, děje se tak jako důsledek rozvoje zánětu. Antioxidační funkce enzymů je narušena, a to konkrétně tak, že HDL podléhá oxidačním procesům, které převažují. Protizánětlivé působení apoproteinů bude ještě po určitý čas zachovááno, ale později se proteiny obsažené v HDL mohou též pozměnit oxidacemi na nefunkční a časem až na prozánětlivé. (Novotný, 2013)

Dysfunkce protekčních mechanismů HDL se prvně projeví na paraoxonázách, následně na apoproteinech. Strukturními změnami je morfologicky atakován i ABCA1 kazetový transportér. Jakmile ABCA1 transportéry ztratí své funkce, je inaktivován reverzní transport cholesterolu. Taková situace je pro povahu HDL částice rozhodující, neboť při inaktivaci reverzního transportu cholesterolu a většiny základních složek HDL, bude nadále taková HDL částice označována jako dysfunkční. Svými projevy se dále bude více a více podobat oxLDL částici. Dysfunkční HDL tzv. oxHDL s oxLDL interagují a již nejsou antagonisty. (Novotný, 2013), (Hafiane, 2013)

Vznik dysfunkčních HDL provází zvýšená aktivita enzymu myeloperoxidázy, která patří do skupiny peroxidáz. MPO je řazena mezi prediktory KVO i vzniku dysfunkčních HDL. MPO je produkována fagocytujícími leukocyty. Paradoxem je, že MPO přítomna v aterosklerotických plátech vznik samotného ateromu nepodporuje, naopak je oponentem takového dění. (Novotný, 2013)

MPO je však proaterogenním účastníkem v tom smyslu, že podporuje svým oxidačním působením vznik oxLDL. Taktéž násobí aktivitu makrofágů, které zároveň produkují další MPO, k aktivní fagocytóze lipidových částic. Na tomto principu dochází k překročení kapacit makrofágů a vzniku mnoha linií pěnových buněk v zacykleném ději procesů, které vedou k rozvoji chronického zánětlivého onemocnění. MPO endoteliální dysfunkci podporuje také uvolňováním reaktivních forem oxidů a inhibicí reverzního transportu cholesterolu svým negativním vlivem na ABCA1. (Novotný, 2013)

S onemocněními endotelu cév bývá dle studií spojována nízká hladina HDL v plazmě. Zda její přímé navýšení může působit preventivně vůči vzniku aterosklerózy, nebylo zatím prokázáno. Rizikovým faktorem vzniku a rozvoje aterosklerózy jsou zvýšené a neregulované hladiny LDL v kombinaci s přítomností dysfunkčních HDL. (Hafiane, 2013)

Antiaterogenní působení HDL je založeno na spektru dějů, které na sebe navazují, závisí především na dostatečné množství apoA-I na povrchu HDL. Působením více prospěšných účinků najednou vzniká „obranná linie“ HDL vůči počínající ateroskleróze a je dokonce možné ji zvrátit, pokud nepřeváží oxidační procesy a zánětlivé projevy. (Fernandes, 2008)

Většina ICHS je způsobena aterosklerózou, v následující tabulce 6 je znázorněn přehled změn na lipoproteinech pozorovaný u pacientů s ICHS. (Hafiane, 2013)

V každé z epidemiologických studií, které se zabývaly vznikem aterosklerózy v souvislosti s HDL a LDL, zaznívají poněkud odlišné závěry. Vztah HDL a KVO začal proto být označován jako „HDL hypotéza“. Ve většině studií z nedávné doby je uváděno, že postupným navyšováním koncentrací HDL v lidské plazmě se snižuje riziko vzniku



aterosklerózy. Proti takovému předpokladu stojí fakt, že u pacientů s poruchou metabolismu HDL, ale zachovanými fyziologickými funkcemi lipoproteinů, bylo riziko vzniku aterosklerózy nezávislé na jejich koncentracích. (Hafiane, 2013)

Tabulka 6 – Pozorování HDL u pacientů s ICHS (Karathanasis, 2016)

Sledovaný parametr	Dysfunkce a změny
<b>HDL</b>	Nižší sérové koncentrace HDL2 vlivem nárůstu VLDL
<b>Apoproteiny</b>	Nárůst hladin apoB a apoE
<b>Enzymy náležící HDL</b>	Snížení aktivity PON1 Zvýšení aktivit fosfolipáz

„Hypotéza HDL“ předpokládá, že zvyšováním hladin HDL bude dosaženo vyššího ateroprotektivního působení. Sledováním kyselých fibrátových derivátů, tzn. fibrátů, které se podílí na proliferaci peroxizomů a které zároveň aktivují receptory  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), bylo zjištěno, že tyto fibrátové deriváty mají hlavní podíl na zvyšování aktivity lipoproteinové lipázy (LPL). LPL následně může stimulovat produkci HDL o 10 – 15 %. (Hafiane, 2013)

Při aplikování inhibitorů enzymů CETP se koncentrace HDL může navýšit i více než o 70 %, ale přesto se riziko vzniku a rozvoje aterosklerózy nemusí snížit. Mezi inhibitory CETP patří např. torcetrapid, dalcetrapid. Novějšími jsou anacetrapid a evacetrapid. U anacetrapidu se zvýšily hladiny HDL i o více než 100 % a zároveň o 40 % snížily koncentrace LDL, u evacetrapidu to bylo obdobně. Jedná se o výsledky nedávných studií, které spekulují o vhodnosti využití novějších CETP inhibitorů pro terapii aterosklerózy. (Hafiane, 2013)

Jedním z prvních léčiv pro pacienty s KVO byl niacin (kyselina nikotinová). Niacin má schopnost stimulovat syntézu HDL a částečně redukovat hladiny LDL. Působí na principu ovlivňování DGAT-2-diacylglycerol acyl-transferázy 2, která je enzymem, jež se podílí v játrech na syntéze HDL. U pacientů s diabetem mellitem I. typu (DM1T) pozitivních na výskyt snížených hladin HDL podávání niacinu působilo ateroprotektivně. Stejně tomu bylo i u pacientů po infarktu myokardu či po mrtvici. Niacin je dodnes v terapii vůči KVO využíván, ale postupem času jsou více uplatňovány i experimentální léčby s využitím účinnějších látek, např. jsou hledány antioxidanty s protizánětlivými účinky. (Hafiane, 2013)

V nedávných studiích bylo zjištěno, že vyšší riziko vzniku KVO a hlavně aterosklerózy, nesouvisí s nízkými hladinami HDL, které jsou geneticky podmíněné. Jedná se o osoby s patologicky sníženými koncentracemi HDL a zvýšenými LDL. V séru jsou pozorovány

nárůsty hladin CRP, aktivovaných prozánětlivými interleukiny (IL-6, IL-1 s TNF-alfa, TNF-gama). (Holyen, 2013)

Pokud je mutace genů pro syntézu HDL natolik rozsáhlá, že jsou koncentrace HDL příliš nízké, pacient je potenciálně náchylný ke vzniku KVO nehledě na jiné rizikové faktory. Může tomu tak být u pacientů s Tangierovou chorobou. Jedná se o onemocnění, kdy dochází k mutaci genu ABCA1. Takoví jedinci mají nedostatek apoA-I. Pokud jsou ovšem přítomné apoA-I funkční, riziko KVO je stále nižší než u jedinců s obezitou nebo diabetem mellitem. (Hafiane, 2013)

Při pozorování ovlivňování HDL a ligandu CCL2 (CC-chemokine ligand 2) v séru u pacientů trpících kardiovaskulárními onemocněními, bylo zjištěno, že CCL2 hladiny vzrůstají v séru při počínající ateroskleróze a funkce HDL jsou působením tohoto chemokinu omezovány, neboť CCL2 zamezuje vazbě HDL na buňky endotelu cév a zároveň inhibuje mechanismy reverzního transportu cholesterolu. Je také zmiňováno, že se CCL2 může podílet přímo na poškození HDL mechanismů, které zajišťují protizánětlivá působení. (Run-Lu, 2016)

K CCL2 ligandům mají vysokou afinitu receptory CCR2, CCR3 a CCR5, které nalezneme též v endotelu cév. Nejčastěji se vyskytuje ligand CCL2 vázán s CCR2 receptorem. Bylo zjištěno, že u myši, kterým byla odebrána podstatná část CCR2 se rozsáhlost aterosklerotických plátů významně snížila a imunitní systém snížil produkci prozánětlivých látek. (Run-Lu, 2016)

Vyplývá také, že CCL2 poškozuje průběh reverzního transportu cholesterolu tím, že inhibuje ABCA1, ABCG1 a SR-B1, a to již v hepatocytech. Závěrem studie bylo, že CCL2 má silně proaterogenní vliv. U pacientů s KVO byly nalezeny o mnoho vyšší hladiny CCL2 než u těch zdravých, přičemž koncentrace CCL2 korelovala negativně s HDL2 nikoli s LDL a TAG koncentracemi. (Run-Lu, 2016)

HDL působí protekčně i proti mechanismům spouštějícím nežádoucí apoptózu buněk. Děje se tak na principu blokování intracelulárních signálů pro apoptózu, které vznikají vlivem oxLDL. HDL také dokáže podpořit migraci endoteliálních progenitorů (EPCs) směrem k místu poškození cév. (Emert, 2014)

Produktem oxLDL jsou oxPAPC, které vznikají oxidacemi přítomných fosfolipidů a zbytků kyseliny arachidonové, celým názvem 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin. OxPAPC jsou označovány za hlavní aterogenní produkt oxLDL. Po svém vzniku z oxLDL se oxPAPC shlukují na povrchu endotelu cév a působí ve prospěch zánětlivého procesu. Jsou ovšem i hypotézy, že oxPAPC mohou působit i jako antagonisti zánětu. OxPAPC stimulují transkripci genů pro vázání monocytů na povrch endotelu, také stimulují expresi

IL-8 a tkáňového faktoru, čímž se ukazuje prozánětlivý a trombogenní vliv oxPAPC. Na druhou stranu oxPAPC umožňují aktivaci enzymových komplexů rozpoznávajících cizí agens a po své aktivaci mohou inhibovat účinky bakteriálních produktů a potlačovat rozsah zánětlivé odpovědi v akutní fázi. (Emert, 2014)

HDL částice mají na oxPAPC inhibiční vliv, tlumí jejich schopnost indukovat expresi prozánětlivých produktů. V důsledku se inhibice oxPAPC projeví sníženou expresí genů pro IL-8, MPC (monocytární chemotaktický protein), IL-6. Inhibici zprostředkovává faktor ATF3 (transkripční aktivující faktor-3). Jedná se o transkripční faktor, prostřednictvím kterého HDL částice indukují inhibici aktivace monocytů i jejich funkci produkovat některé cytokiny. Bylo zjištěno, že u pacientů se systémovým lupus erythematoses je aktivita ATF3 u HDL inhibována kvůli modifikacím lektinové dráhy s manózou. (Emert, 2014), (Karathanasis, 2016)

V navazující studii zabývající se vlivem HDL na lidské endoteliální buňky bylo objeveno, že HDL částice jsou schopné nepřímo utlumit nežádoucí expresi genů kódujících části buněk endotelu, které jsou při ateroskleróze klíčové pro reparaci poškozené tkáně, až o polovinu hodnot. Principem je regulace účinků oxPAPC. Z toho vyplývá, že HDL má k oxPAPC antagonistický vztah a současně se s některými svými mechanismy nepřímo doplňují. (Emert, 2014)

Jak již bylo zmíněno, inhibiční schopností makrofágů a dalších buněk endotelu, působí HDL nepřímo vůči zánětu a zároveň i antitrombogenně, neboť HDL má schopnost inhibovat tkáňový faktor a zabraňovat tak aktivaci faktoru X koagulační kaskády. Zároveň zabraňuje aktivaci trombocytů inhibiční tromboxanu A2 a syntáza destičky aktivujícího faktoru. (Hafiane, 2013)

## 2.8 VZTAH K DIABETU MELLITU

Diabetes mellitus 2. typu (DM2T) zahrnuje onemocnění způsobené narušenou glukózovou tolerancí, většinou se jedná o autoimunitní onemocnění, které může být kombinované s jinými chorobami nebo vzniklé jejich důsledkem. DM2T bývá spjat s obezitou, hyperlipidemiemi, vlivy užívaných léků a s aterosklerózou. Diabetes mellitus 1. typu (DM1T) může souviset s poruchami lipogeneze. (Murray, 1998)

Vyšší riziko vzniku KVO mají pacienti s diabetem 2. typu, neboť s inzulínovou rezistencí souvisí snižující se hladiny HDL v séru. Uvádí se, že jsou poškozeny antioxidační mechanismy enzymů náležících HDL. Také byly nalezeny vyšší hladiny TAG a snížený výskyt apoA-I oproti jedincům netrpícím diabetem. (Ebtehaj, 2017), (Karathanasis, 2017)

U pacientů s DM2T, kteří prodělali infarkt myokardu, byla často nalezena narušená protizánětlivá funkce HDL. Z toho důvodu jsou takoví pacienti dlouhodobě pozorováni právě proto, že riziko vzniku KVO je u nich vyšší. Narušena se u nich ukázala i antioxidační aktivita enzymů HDL, jedná se především o PON-1. Hladiny CRP a TNF-alfa byly dlouhodobě zvýšeny. (Ebtehaj, 2017)

U osob trpících DM1T aktivita PON-1 i potenciál HDL působit protizánětlivě korelovaly negativně s naměřenými hladinami hyperglykemie i glykovaného hemoglobinu typu A1c (HBA1C). Byla pozorována i souvislost s věkem pacienta a rozsahem chronického zánětu cév. Je nutno podotknout, že riziko aterosklerózy u pacientů s diabetem se mění s věkem, nikoli s pohlavím. Starší jedinci jsou k rozvoji aterosklerózy náchylnější, a to vzhledem k ochabování regeneračních schopností endotelových tkání. (Ebtehaj, 2017)

HDL částice mohou mít inhibiční vliv na procesy aktivace i agregace trombocytů. Roli zde hraje apoA-I, který aktivuje SR-B1 receptory k signalizaci pro zvýšení exprese NO v buňkách endotelu. ApoA-I také aktivuje syntézu prostacyklinů, které indukují expresi cyklooxygenáz. (Karathanasis, 2017)

HDL může tuto antitrombotickou dráhu aktivovat i skrze sfingosin-1-fosfát (S1P). U osob s diabetem DM2T se může jednat o komplikaci, neboť při snižování rizik vzniku KVO terapií založenou na navyšování HDL hladin prostřednictvím daných medikamentů a diet, u nich může dojít k nežádoucím snížením účinnosti koagulační kaskády důsledkem toho, že pacienti s DM2T mají v krvi vyšší koncentrace sfingosin-1-fosfátu (viz tabulka 7). Tento fosfolipid má také výrazně kardioprotektivní funkce, u pacientů s diabetem mellitem by měly být pozorovány jeho koncentrace a působení společně s HDL a LDL, a to i proto, že principy fungování sfingosin-1-fosfátu nejsou ještě zcela známy. (Karathanasis, 2017), (Ebtehaj, 2017)

Tabulka 7 – Pozorované změny HDL u pacientů s DM2T (Karathanasis, 2017)

Sledovaný parameter	Dysfunkce a změny HDL u DM2T
<b>HDL</b>	Redukce antioxidační funkce HDL3 Narušena protekce endotelu
<b>Apoproteiny</b>	ApoA-I ztrácí protizánětlivou funkci vlivem glykace
<b>Enzymy a proteiny náležící HDL</b>	Snížení aktivity u PON1 a LCAT Zvýšená aktivita enzymů aktivujících sfingosin-1-fosfát Zvýšení aktivity C-peptidu (polypeptid syntézy inzulínu) v souvislosti se sníženou koncentrací HDL2

U pacientů trpících DM2T byl pozorován pokles hladin hormonu adiponektinu (hormon tukové tkáně), stejně tak i u lidí trpících obezitou. Snížení adiponektinu je důsledkem změn

metabolismu lipidů. Jelikož adiponektin působí protizánětlivě a prospěšně koreluje s hladinami HDL, je markerem rizik koronárních onemocnění u pacientů s DM2T. Sledováním hladin adiponektinu je možné predikovat rozvoj aterosklerózy a inzulinové rezistence. Protizánětlivé působení adiponektinu je založeno právě na schopnosti zvyšovat expresi ABCA1 transportéru a zvyšovat efektivitu reverzního transportu cholesterolu. (Novotný, 2013)

### 3 ZÁVĚR

Od ostatních lipoproteinových částic se HDL liší tím, že zajišťuje odstraňování cholesterolu z endotelu cév prostřednictvím reverzního transportu cholesterolu, který právě umožňují apoproteiny přítomné na povrchu HDL částic a také enzymy, které jsou přítomné na povrchu i v obalu HDL. Tímto způsobem jsou zajištěny protizánětlivé a antioxidantní funkce tohoto lipoproteinu, dále také antitrombogenní a antiapoptotická aktivita. Hlavním enzymem, díky kterému je možné cholesterol z buněk vychytávat je lecitin-cholesterolacyltransferáza.

Protizánětlivé funkce zajišťují především proteiny přítomné na povrchu i uvnitř HDL, hlavně apoproteiny třídy apoA. Jednotlivé subpopulace apoproteinů se od sebe liší funkcemi, které zastávají. Apoproteiny (především apoA-I) také spolupracují s kazetovými transportéry ABCA1 a ABCG1, které vazbami s apoproteiny mohou ovlivňovat exprese zánětlivých progenitorů v místech poškození cévy a také mohou mít vliv na samotnou aktivaci monocytů.

Antioxidantní působení HDL zastávají hlavně enzymy HDL, které jsou aktivovány vazbou na povrchové proteiny HDL a interagující s dalšími složkami HDL dle své specifity např. s SR-B1 receptory nebo s fosfolipidy. Jsou to enzymy z rodiny paraoxonáz třídy PON1 a PON2. Paraoxonázy mají schopnost zabraňovat tvorbě oxidačních procesů, které by vedly k oxidaci LDL lipoproteinových částic a vzniku oxLDL. PON1 také mohou oxidativní působení vzniklých oxLDL a jejich produktů, tzv. OxPAPC, inhibovat.

Při zvýšeném množství vznikajících oxLDL jsou narušeny mechanismy reverzního transportu cholesterolu, to vede k aktivaci velkého množství monocytů, které jako makrofágy ve tkáních budou fagocytovat zvýšené množství lipidů z endotelu, které je důsledkem navýšení oxLDL. Makrofágy současně produkují prozánětlivé cytokiny. Po překročení své fagocytární kapacity se makrofágy přeměňují na tzv. pěnové buňky právě vlivem vysokého obsahu lipidů (fosfolipidů a volného cholesterolu) a také proto, že lipidy nejsou zpětně vychytávány cholesterolovým effluxem HDL částic, který je narušen.

Vznikem pěnových buněk počíná 1. fáze aterosklerózy. Během této fáze je možné aterogenní změny zvrátit antioxidantními aktivitami společně s protizánětlivým působením HDL a dalších antioxidantů. Pokud se homeostáza LDL a HDL lipoproteinů naruší a budou nadále rozvíjeny aterosklerotické procesy, pak se hladiny HDL částic vůči těm LDL výrazně sníží. Právě převažující množství LDL a oxLDL může HDL částice strukturně natolik ovlivnit, že mohou být funkčně změněny, a to až na tzv. dysfunkční HDL. Aktivita enzymů náležících HDL by byla u dysfunkčních HDL inhibována a apoproteiny by se mohly začít chovat jako mediátory zánětlivého procesu.

HDL částice zajišťují soubor mechanismů, kterými přispívají k ochraně endotelu před vznikem aterosklerózy, ale také k regeneraci již poškozených endotelových tkání, a to inhibičními vlivy na expresi prozánětlivých progenitorů. HDL částice mají také vliv na regulátory imunitní odpovědi. Je však důležité zmínit, že mechanismy protizánětlivých účinků, nezáleží přímo na koncentracích HDL v plazmě, ale především na zachování jejich funkčních potenciálů. Proto s rostoucími hladinami HDL v plazmě nemůžeme předpokládat plnohodnotné protizánětlivé působení. Je třeba počítat s možnou přítomností dysfunkčních HDL částic a dle jejich poměru k nezměněným HDL částicím může vyjít najevo, zda protizánětlivé i antioxidantní působení HDL mohlo být inhibováno nebo patologicky ovlivněno. Může se tak stát prostřednictvím látek vylučovaných při imunitní odpovědi na poškození cév jako jsou např. interleukiny, chemokiny, proteiny s koagulační aktivitou nebo produkty bakterií a oxidačního stresu či komplikace při různých onemocněních, např. diabetu mellitu, hyperlipidemií, dyslipidemií. Tzn. při onemocněních zasahujících do metabolismu lipidů, proteinů, kardiovaskulárního systému nebo jedná-li se o geneticky vrozené onemocnění komplikující funkčnost a účinnost složek HDL.

Z toho vyplývá, že je třeba nezaměřovat se pouze na koncentrace lipoproteinů a jejich obsah, ale také sledovat, zda jsou aktivity enzymů – PON, LCAT a dalších zachovány a také jestli je reverzní transport cholesterolu dostatečně efektivní.

Rozvoj aterosklerózy je obrazem narušené homeostázy mezi HDL a jinými lipoproteiny, konkrétně LDL a také Lp(a). Ateroskleróza je důsledkem selhání obranných mechanismů HDL (v první řadě snížení aktivit antioxidantních enzymů) vůči chronickému zánětlivému procesu. Jako prevence jejího vzniku se může nabízet navýšování hladin HDL a snaha obnovit protekční působení. Nárůstem aterogenních dějů v endotelu cév vzniká více dysfunkčních HDL částic a je těžší tento proces zvrátit.

U pacientů s diabetem mellitem byly pozorovány snížené aktivity LCAT a PON1. Pacienti s diabetem mellitem 2. typu mají zvýšené hladiny sfingosin-1-fosfátu, které jsou zároveň kardioprotektivní povahy, ale zároveň se s HDL ovlivňují, a to může mít za následek nežádoucí snížení koagulačních procesů.

Pro pacienty s diabetem mellitem 2. typu jsou typické poruchy lipogenze a zvýšené riziko vzniku KVO. Antioxidantní funkce paraoxonáz mohou být narušeny, pozorovány bývají také vyšší hladiny TAG a snížené hladiny apoA-I právě vlivem glykace. Oproti tomu u pacientů s diabetem mellitem 1. typu jsou nejdříve inaktivovány protizánětlivé funkce HDL.

## POUŽITÁ LITERATURA

- AGNOLETTO L.: Effects of oxysterols on cell survival and proliferation pathways in human endothelial cells. *Department of Pharmacology and Anesthesiology, University of Padova*, (2008), 1:11-18.
- AZIZKHANIAN I., Trenchevska O., Bashawri Y., Jiaqui Hu a kol.: Posttranslational modifications of apolipoprotein A-II proteoforms in type 2 diabetes. *Journal of clinical lipidology*, (2016), 10(4):808-815.
- BORJA M. S., Zhao L., Hammerson B., Tang C. a kol.: HDL-apoA-I Exchange: Rapid detection and association with atherosclerosis. *Public Library of Science: PLoS ONE*, (2013), 8(8).
- BRAESCH-ANDERSEN S., Beckman L., Paulie S., Kumagai-Braesch M.: ApoD mediates binding of HDL to LDL and to growing T24 carcinoma. *Public Library of Science: PLoS ONE*, (2014), 9(12).
- BRITES F., Martin M., Guillas I., Kontush A.: Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL). Mechanistic insights into potential clinical benefit: *Biochimica et biophysica acta: Clinical*, (2017), 8:66-77.
- DIDICHENKO S. A., Navdaev A. V., Cukier A. M. O., Gille, A. a kol.: Enhanced HDL functionality in small HDL species produced upon remodeling of HDL by reconstituted HDL, CSL112: effects on cholesterol efflux, anti-inflammatory and antioxidative activity. *Circulation Research*, (2016), 119(6):751-763.
- EBTEHAJ S., Gruppen E. G., Parvizi M., Tietge U. J. F. a kol.: The anti-inflammatory function of HDL is impaired in type 2 diabetes. role of hyperglycemia, paraoxonase-1 and low grade inflammation. *Cardiovascular Diabetology*, (2017), 132(16):132.
- EMERT B., Hasin-Brumshtein Y., Springstead J. R., Vakili L. a kol.: HDL inhibits the effects of oxidized phospholipids on endothelial cell gene expression via multiple mechanisms. *The Journal of Lipid Research*, (2014), 55(8):1678-1692.
- FEINGOLD K. R., Grunfeld C.: Introduction to Lipids and Lipoproteins. Editoři: Feingold K. R., Anawalt B., Boyce A. a kol. *Endotext [Internet], Comprehensive FREE Online Endocrinology Book* [Aktualizováno 2. 2. 2018]. South Dartmouth (MA): MDText.com, (2000-2019). Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>.



- FERNANDES, J., Saudubray, J.M., Berghe, G., Walter, J.: *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. Praha: Triton, (2008), 793–799, ISBN: 978-80-7387-096-6.
- HAFIANE A., Genest J.: HDL, Atherosclerosis and emerging therapies. *Hindawi Publishing Corporation*, (2013), 5: 891403.
- HAN Ch. Y., Tang Ch., Guevara M. E., Wei H. a kol.: Serum amyloid A impairs the antiinflammatory properties of HDL. *The Journal of Clinical Investigation*, (2015), 29(10):266-281.
- HOLEČEK M.: *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada Publishing, (2006), 117-145, ISBN: 80-247-1562-7.
- HOLVEN B. K., Rettorsol K., Ueland T., Ulven M. S. a kol.: Subjects with low plasma HDL cholesterol levels are characterized by an inflammatory and oxidative phenotype. *Public Library of Science: PLoS ONE*, (2013), 8(11).
- KARATHANASIS S. K., Freeman L. A., Gordon S. M., Remaley A. T.: The changing face of HDL and the best way to measure it. *Clinical Chemistry*, (2017), 63(1):196-210.
- KOHAN A. B., Wang F., Lo C. M., Liu M. a kol.: ApoA-IV: current and emerging roles in intestinal lipid metabolism, glucose homeostasis, and satiety. *American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology*, (2015), 308(6):472-481.
- KONTUSH A., Lindahl M., Lhomme M., Calabresi L. a kol.: Structure of HDL: Particle subclasses and molecular components. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (2015), 224:3-51.
- KOOLMAN J., Röhm J. a K.-H.: *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, (2012), 788-793, ISBN: 978-80-247-2977-0.
- KULKA M.: A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, (2016), 19(1):225-232.
- LÜSCHER T. F., Landmesser U., A. von Eckardstein, Fogelman A. M.: High-density lipoprotein, vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circulation Research*. (2014), 114(1):171-182.
- MARANHÃO R. C., Carvalho P. O., Strunz C. C, Pileggi, F.: Lipoprotein (a): Structure, pathophysiology and clinical implications. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, (2014), 103(1):76–84.

- MERHAUTOVÁ J.: Hypolipidemia, základní krevní lipoproteiny, metabolismus lipoproteinů, složení lipoproteinů, dyslipidémie, poruchy metabolismu lipidů. *Lékařská fakulta Masarykovy univerzity*, (2012),10:3-5.
- MURRAY R. K.: *Harperova biochemie*, 2. vyd. Jinočany: H & H, *Lange medical book*, (1998), 512-638, ISBN 80-85787-38-5.
- NARDO D. D., Labzin L. I., Kono H., Seki R. a kol.: High density lipoprotein anti-inflammatory transcriptional reprogramming of macrophages via the transcriptional repressor ATF3. *Hospital for Special Surgery: HSS, Public Access – Nature Immunology*, (2014), 15(2):152-160.
- NOVOTNÝ D., Karásek D., Vaverková H., Malina P.: HDL: Funkce, Dysfunkce a laboratorní metody stanovení. *Klinická biochemie a metabolismus*, (2013), 21(42):122-128.
- OSSOLI A., Simonelli S., Vitali C., Franceschini G. a kol.: Role of LCAT in atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, (2016), 23(2):119-127.
- RÖHRL C., Stangl H.: HDL Endocytosis and resecretion. *Biochimica et Biophysica Acta*, (2013), 1831(11):1626-1633.
- RUN-LU S., Can-Xia H., Jin-Lan B., Jie-Yu J. a kol.: CC-Chemokine Ligand 2 (CCL2) Suppresses high density lipoprotein (HDL) internalization and cholesterol efflux via CC-chemokine receptor 2 (CCR2) induction and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in human endothelial cells. *The Journal of Biological chemistry* (2016), 291(37): 19532–19544.
- SILBERNAGEL G., Genser B., Drechsler Ch., Scharnagl H. et al.: HDL cholesterol, apolipoproteins, and cardiovascular risk in hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology*, (2015), 26(2):484–492.
- SOŠKA V.: Stačí dosahovat cílového LCL cholesterolu, nebo je nutná kompletní intervence reziduálního rizika? *Interní medicína pro praxi*, (2009), 11(10):449-451.
- SOTO I., Graham L. C., Richter H. J., Simeone S. N. a kol.: APOE stabilization by exercise prevents aging neurovascular dysfunction and complement induction. *Public Library of Science: PLoS Biology*, (2015), 13(10).
- VAISAR, T., Tang, C., Babenko, I., Hutchins, P. a kol.: Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *Journal of Lipid Research*, (2015), 56(8):1519–1530.

VLČEK J., Fialová D., Kuliš F., Macek K. a kol.: *Klinická farmacie I*, Praha: Grada Publishing, (2010), 94-95, ISBN: 978-80-247-3169-8.

WOLFE A. R., Atkinson R. L., Reddy J. P., Debeb B. G. a kol.: High-density and very-low-density lipoprotein have opposing roles in regulating tumor-initiating cells and sensitivity to radiation in inflammatory breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, (2015), *91*(5):1072-1080.