

Biochemie II

Jarní semestr 2020

Základní literatura

- Koolman J., Rohm K.H.

Barevný atlas biochemie. Překlad 4.vydání, 2012

- R.K.Murray , D.A.Bender ad.

Harperova ilustrovaná biochemie. Galén, 2013

- *Semináře z biochemie II* v IS MUNI včetně podkladů pro přípravu
- Přednášky – podklady na IS MUNI

Doplňující literatura

- Silbernagl S., Despopoulis A.

Atlas fyziologie. Překlad 8.vydání, 2016

- Vasudevan D. M. et al.:

Úvod do všeobecné a klinicky aplikované biochemie, 2015
(slovenský překlad).

Literatura v angličtině

- Murray R.K: *Harpers Illustrated Biochemistry* 27-30th ed.

Trávení a resorpce lipidů

Přeměny lipoproteinů

Transport cholesterolu

© 2020 Biochemický ústav LF MU (E.T.)



Trávení lipidů

Triacylglyceroly (TG)-90%

Fosfolipidy (PL)

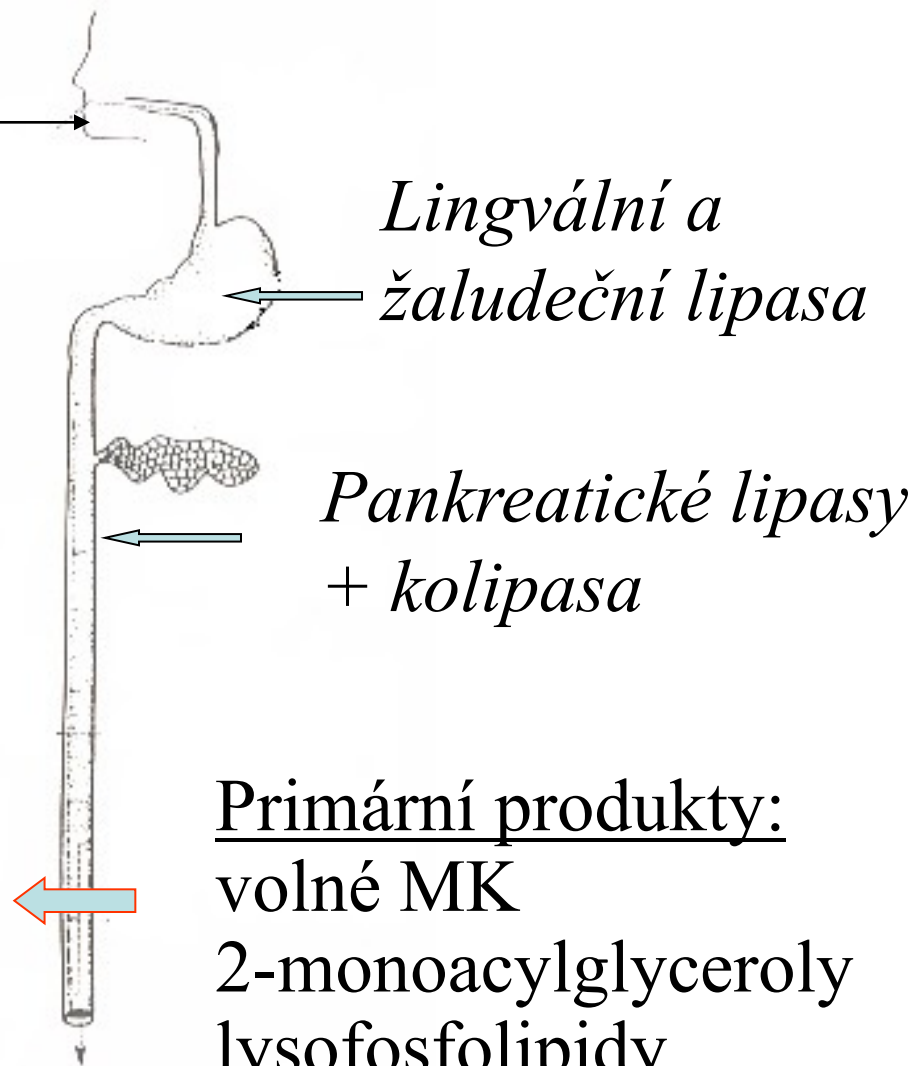
Cholesterolestery (CHE)

Glykolipidy (GL)

Lipofilní vitaminy (LV)

Žlučové kyseliny →

Resorpce do enterocytů
ve formě směsných micel
(částice < 20 nm)



*Lingvální a
žaludeční lipasa*

*Pankreatické lipasy
+ kolipasa*

Primární produkty:

volné MK

2-monoacylglyceroly

lysofosfolipidy

cholesterol

+ lipofilní vitaminy

Emulgace lipidů

- je podmínkou účinného trávení hydrofobních lipidů
- zvýšení účinného povrchu olej-voda, umožnění přístupu enzymů

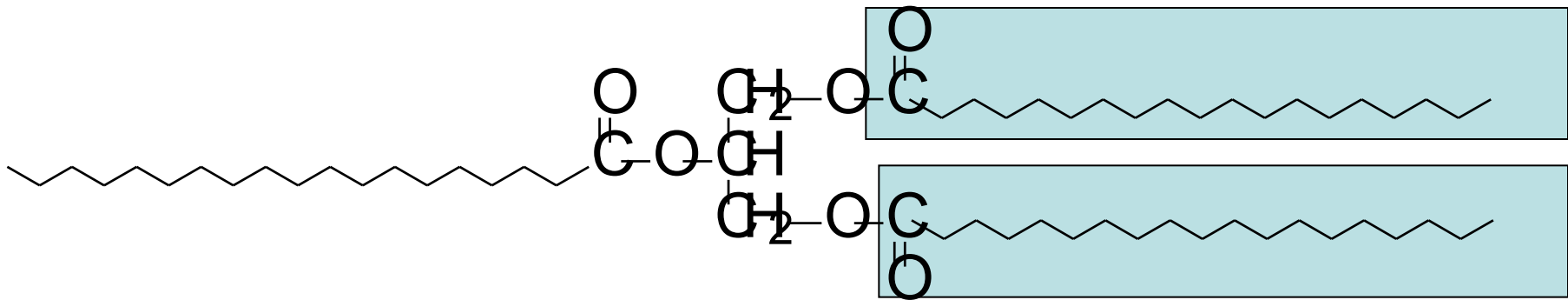
Emulgátory v tenkém střevě

- soli žlučových kyselin
(+ fosfolipidy, soli mastných kyselin)

Štěpení lipidů ve střevě pankreatickými enzymy

- **Pankreatická lipasa**

Triacylglycerol \rightarrow 2-monoacylglycerol + 2 MK

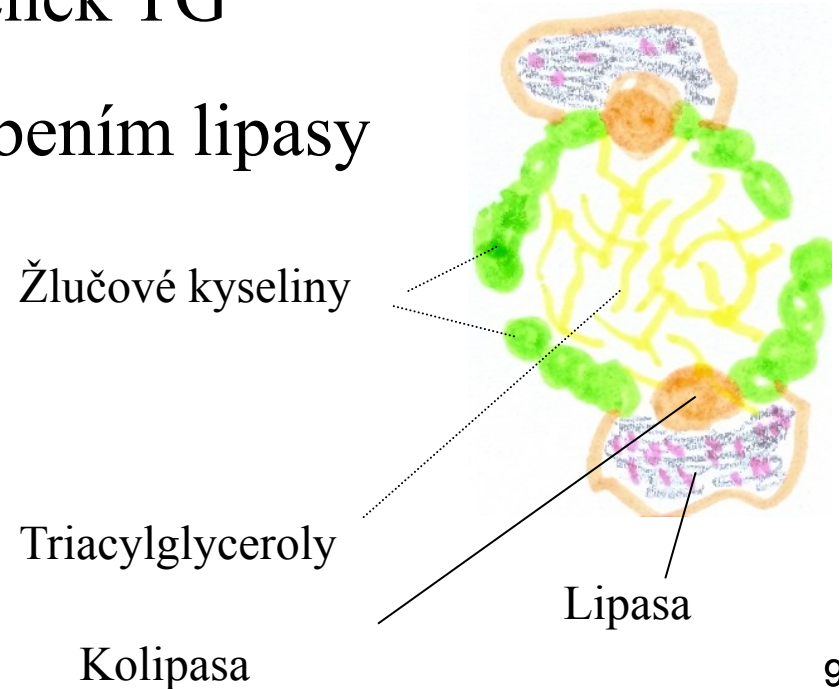


< 1/4 TG

triacylglycerol \rightarrow glycerol + MK

Kolipasa

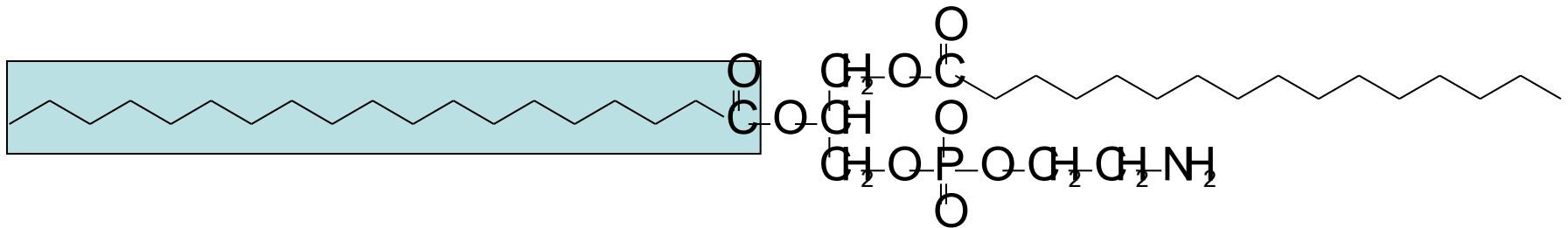
- protein secernovaný z pankreatu
- váže se s lipasou 1:1
- váže lipasu ke žlučovým kyselinám na povrchu emulgovaných kapének TG
- umožňuje štěpení TG působením lipasy



Štěpení fosfolipidů

- **Fosfolipasa A₂**

Fosfolipid → lysofosfolipid + MK



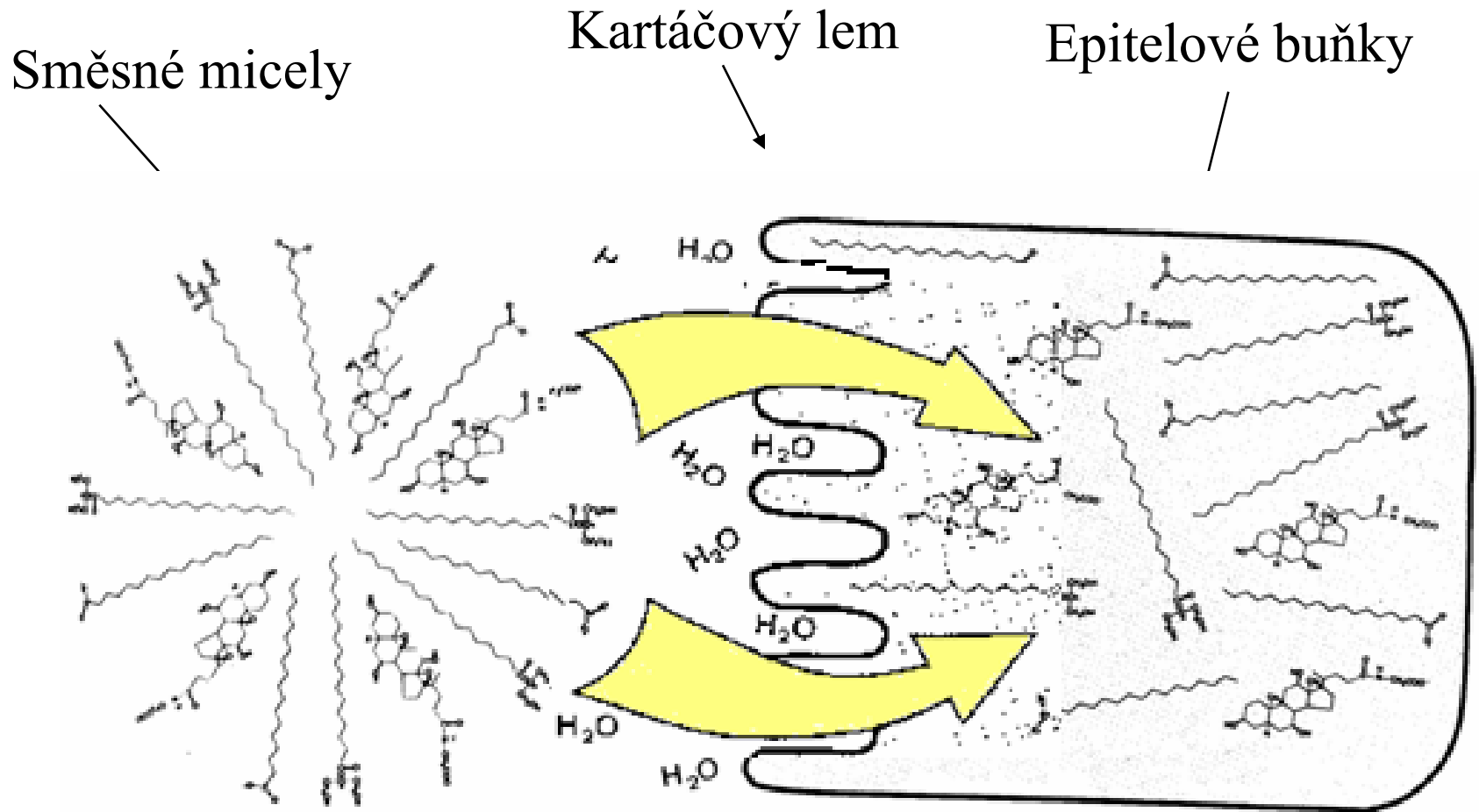
Štěpení esterů cholesterolu

- **Cholesterolesterasa:**

Cholesterolestery → cholesterol + MK

Resorpce lipidů buňkami střevní sliznice

(hlavně v jejunu, žlučové kyseliny až v ileu)



Průměr < 20 nm

Pasivní difuze monoacylglycerolů a MK

Resorpce lipidů buňkami střevní sliznice – pokr.

- monoacylglyceroly a dlouhé mastné kyseliny přestupují difuzí ze směsných micel
- krátké mastné kyseliny (do 10 C) nevstupují do micel, jsou absorbovány přímo
- žlučové kyseliny postupují do ilea, zde je většina aktivním transportem zpětně resorbována
- transport cholesterolu je zprostředkován NPC1L1 (Nieman-Pick C1 like 1) (viz přednáška 1.ročník)

Hormonální kontrola trávení lipidů

Sekretin

- Je secernován do krve “S-buňkami“ duodena po stimulaci H^+ v lumen
- indukuje sekreci HCO_3^- z pankreatu

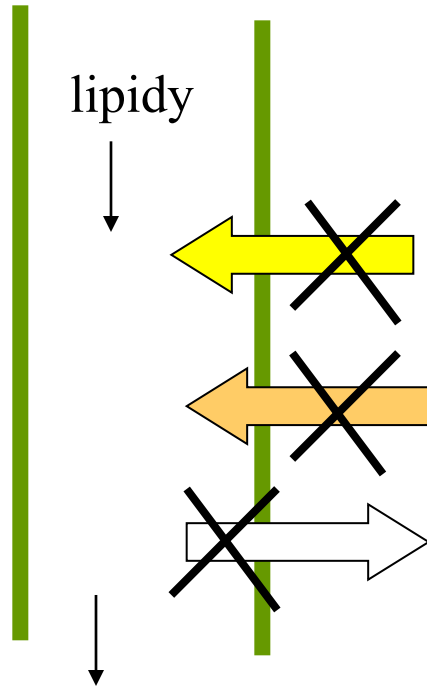
Cholecystokinin

- je secernován “I-buňkami“ duodena po stimulaci malými peptidy, AK, mastnými kyselinami v lumen
- sekrece amylasy, lipasy a proteas z pankreatu
- potencuje účinek sekretinu na vylučování HCO_3^-
- sekrece žlučových kyselin ze žlučníku

Steatorrhoea (lipidová malabsorpce)

ztráta lipidů stolicí

(normálně resorbováno ~ 98% lipidů z potravy)



Možné příčiny

Nedostatečný přívod žluče (porucha jater,
obstrukce žlučovýchodů)

Porucha ve funkci pankreatu

Porucha ve funkci střevní sliznice
(trávení probíhá, porušená resorpce)

Nadbytek lipidů ve
stolici

Nedostatečný příjem lipofilních vitaminů

Význam krátkých mastných kyselin ve výživě při malabsorpci

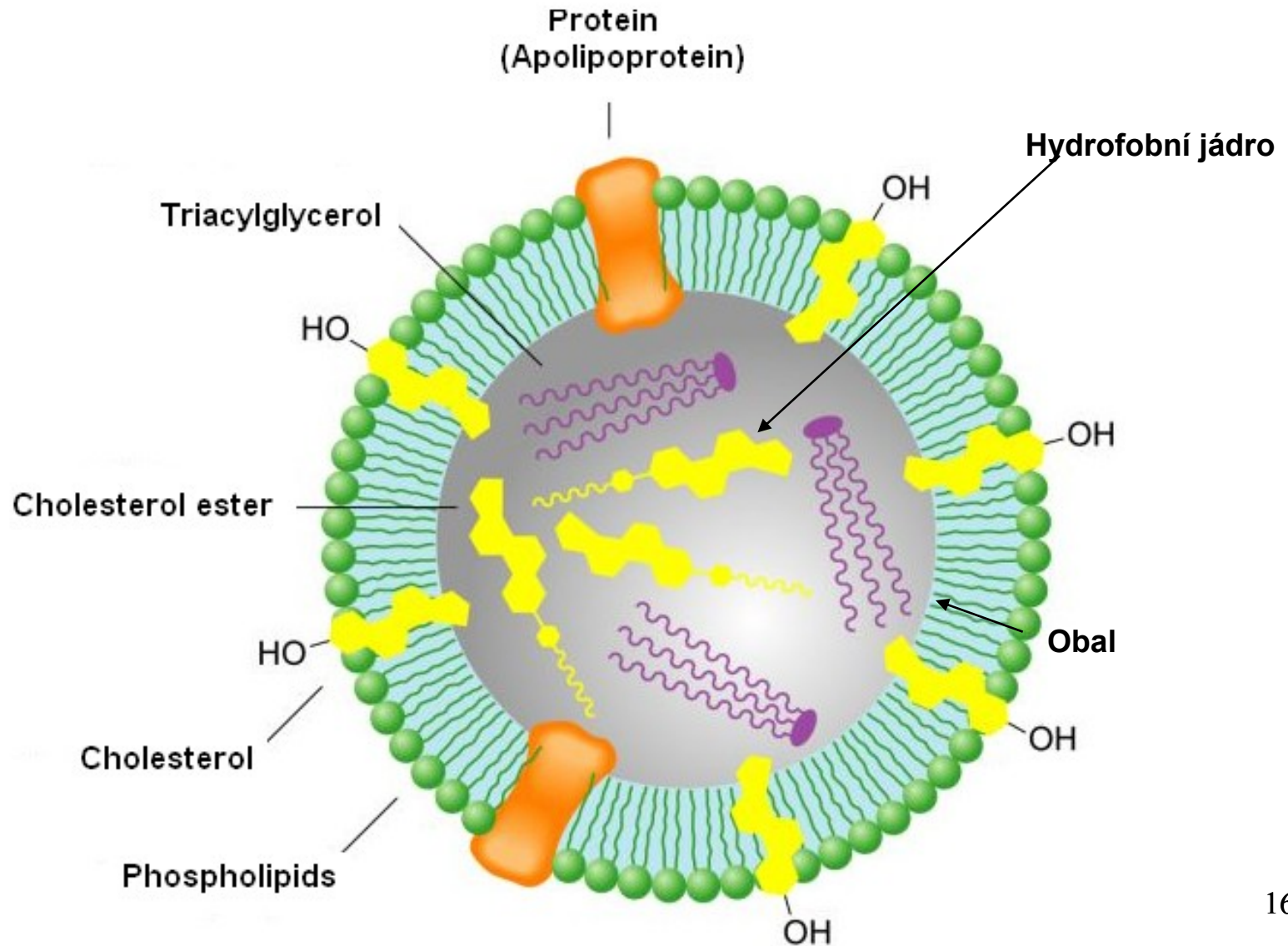
Mohou být resorbovány do enterocytů bez účinku žlučových kyselin

Lipidy v krevní plazmě

Transport převážně ve formě lipoproteinů

Lipid	Koncentrace v plazmě (mmol/l)	Transport
Triacylglycerol	0,9 - 2	CHM, VLDL
Celkový CH	3,0 - 5,0	LDL, HDL (CHM, VLDL)
Neesterifikovaný CH	~1,3 - 1,9	HDL (LDL)
Celkový fosfolipid	1,8 - 5,8	LDL, HDL, CHM, VLDL
Volné mastné kyseliny	0,4 - 0,8	albumin

Obecná struktura lipoproteinu



Apoproteiny

- proteinová složka lipoproteinů
- funkce AP: aktivátory a inhibitory enzymů
 interakce s receptory
 strukturální role
 (transportní)
- některé jsou vestavěny do LP (apo B), jiné jsou periferní a mezi částicemi se vyměňují
- syntéza v hrubém ER, připojení k lipidové micelle

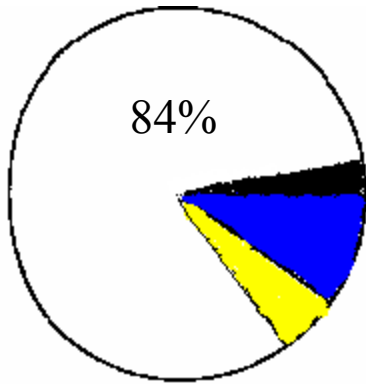
Typy lipoproteinů

TG

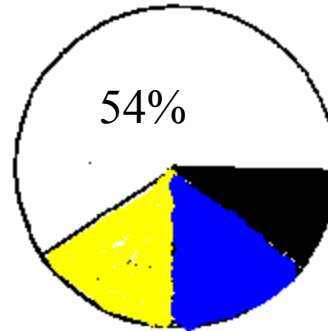
PL

CH

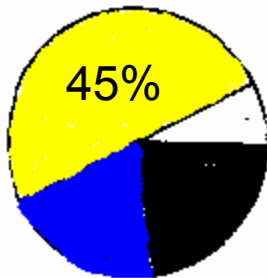
Prot



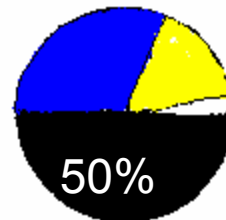
Chylomikron CM



VLDL



LDL



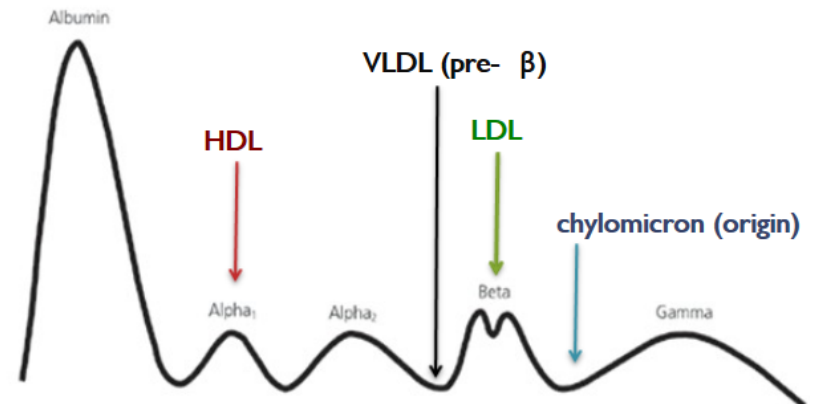
HDL

Charakteristika lipoproteinů

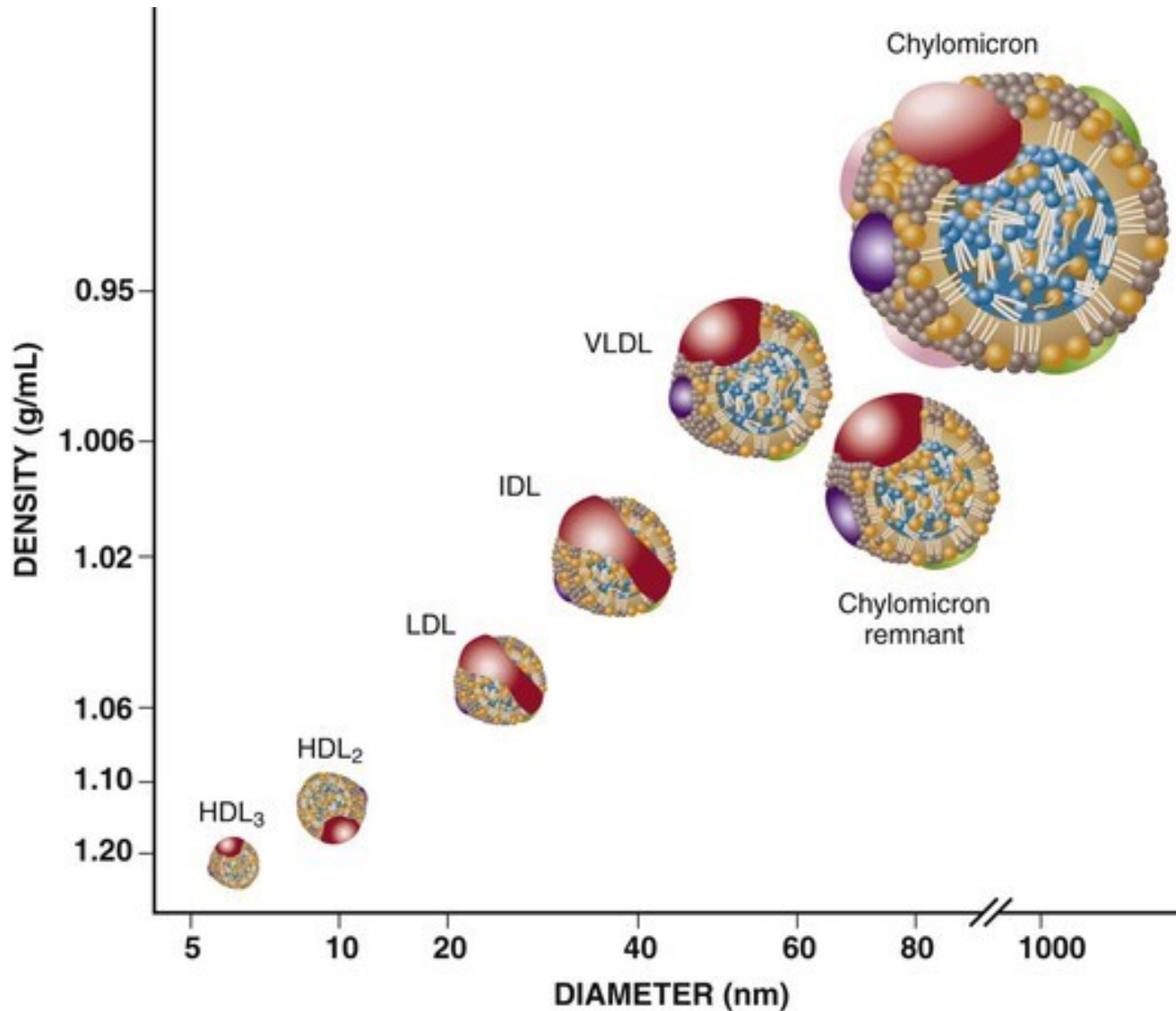
Třída	Průměr (nm)	Poločas přeměny	Hlavní lipid	Hlavní apo
CM	100-1000	~5-15 min	TG	B48
VLDL	30-90	~2h	TG	B100
IDL	25-35	~2h	TG/CHE	B100
LDL	20-75	~2-4 dny	CHE	B100
HDL	5-12	~10 h	PL/CHE	AI

Separace lipoproteinů

- ultracentrifugace v roztoku soli
- elektroforéza
- (viz semináře a praktická cvičení)



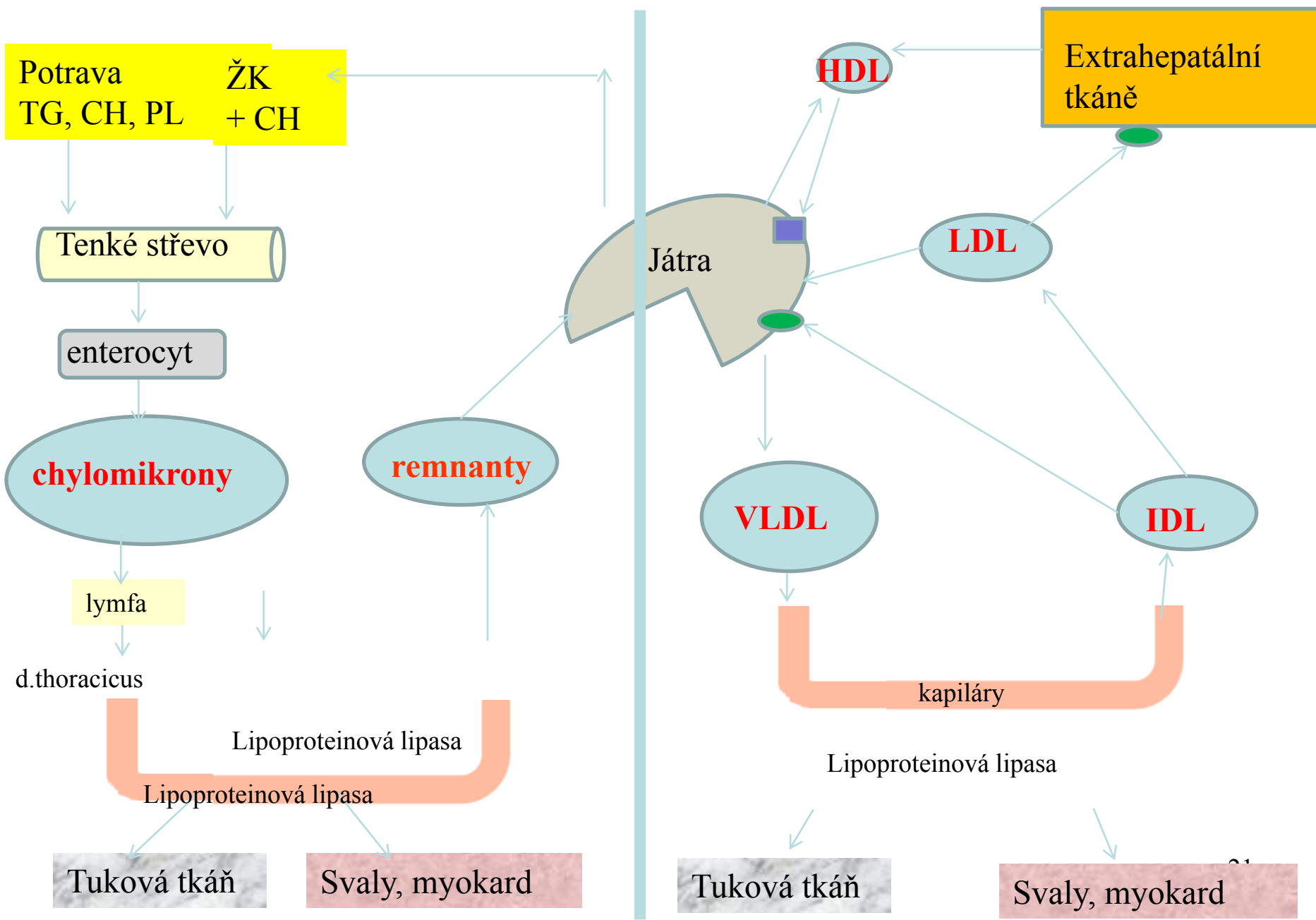
Velikost a hustota lipoproteinů



Exogenní

Metabolismus lipoproteinů - přehled

Endogenní



Chylomikrony (CM) – vznik a metabolismus

- vznikají v absorpčních buňkách střevní sliznice
- **nesou TG, CH a lipofilní vitaminy přijaté potravou**
- obsahují apo-B 48, stopy apoA (jiné neumí střevní buňka syntetizovat), syntéza apoB-48 limituje tvorbu CM
- jsou reverzní pinocytosou uvolněny do extracelulárního prostoru a pronikají do lymfy
- prostřednictvím lymfatických cév jsou transportovány do krve (hrudní duče) – plazma po jídle je zakalená

Resyntéza lipidů v epiteliálních buňkách střevní sliznice

1. Aktivace MK



2. Resyntéza triacylglycerolů



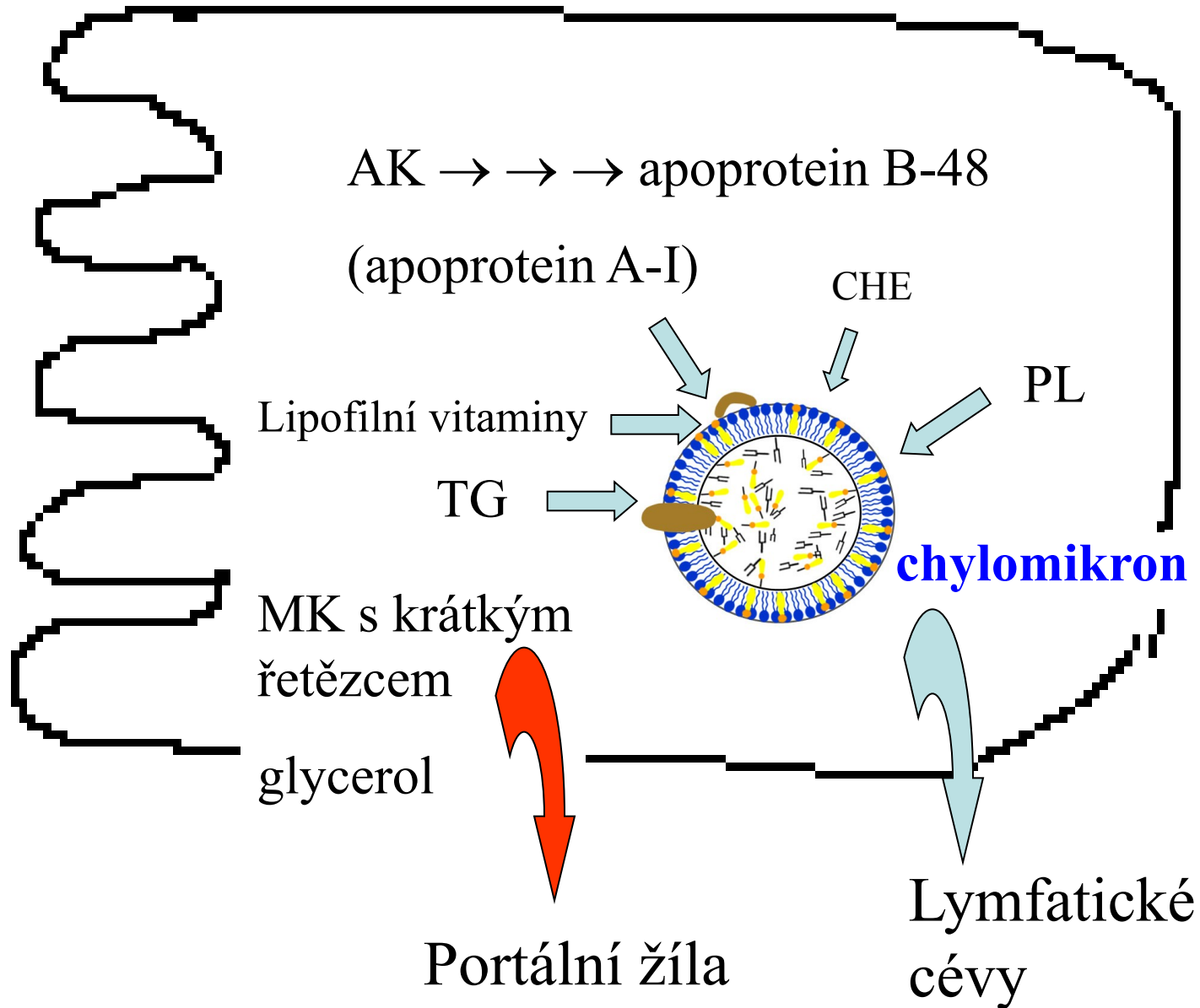
3. Resyntéza fosfolipidů z lysofosfolipidů

4. Resyntéza cholesterolesterů

Syntézy probíhají v ER

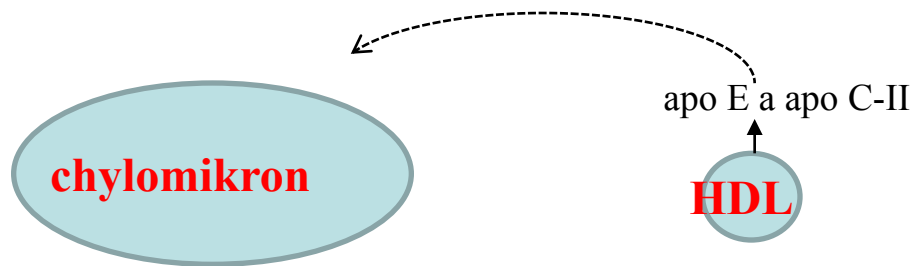
MK s krátkým řetězcem, volný glycerol → přímý transport do portálního oběhu – nezapojují se do syntézy

Transport lipidů z buněk střevní sliznice



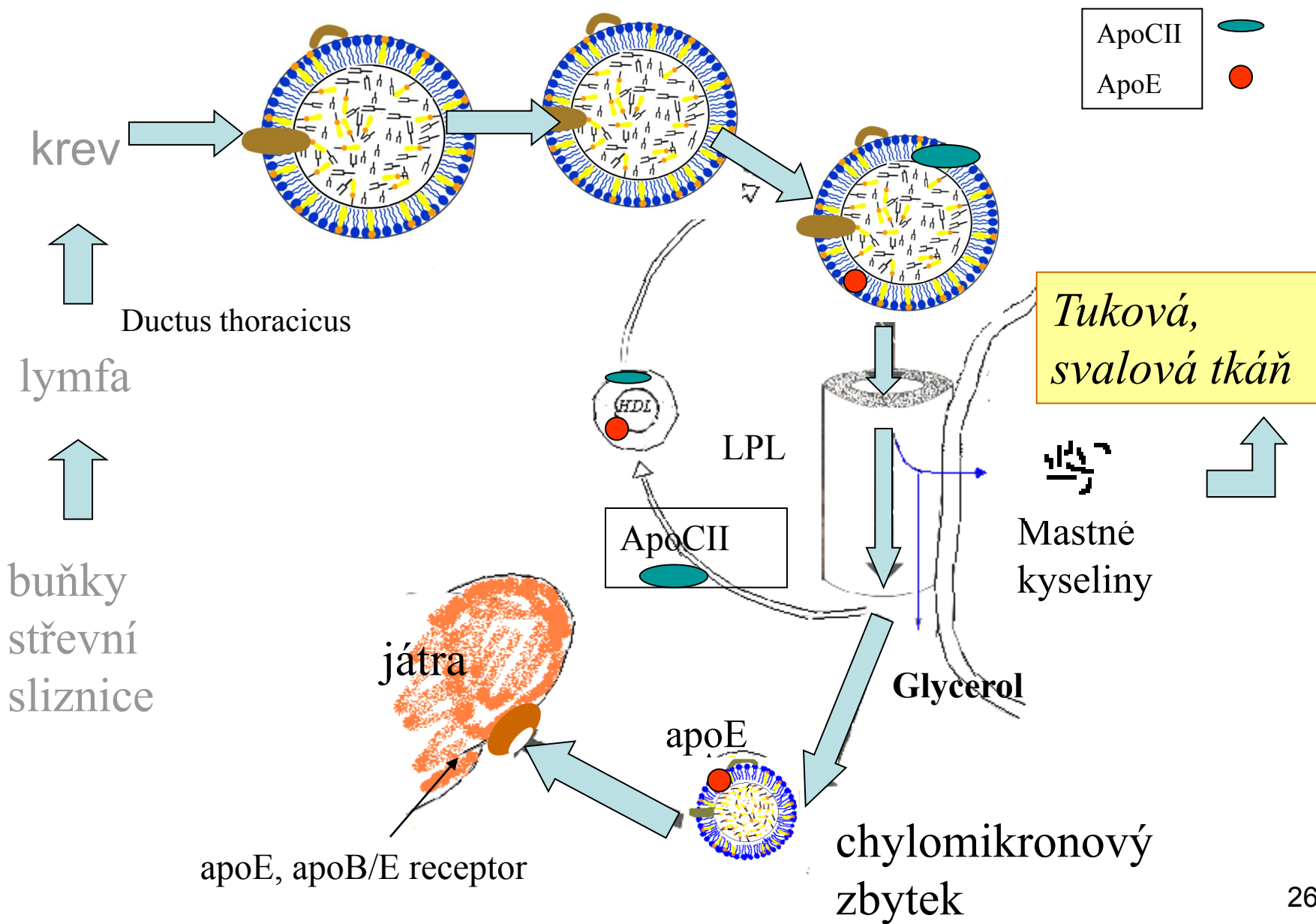
Jaký je osud chylomikronů v krvi ?

- do krve vstupují přes ductus thoracicus 1-2 hod po zahájení jídla (koncentrace vrcholí 3-6 h po jídle)
- z HDL jsou na CM přenášeny apo E a apo C-II



- v krevních kapilárách na CM působí lipoproteinová lipasa (LPL)

Přeměny chylomikronů

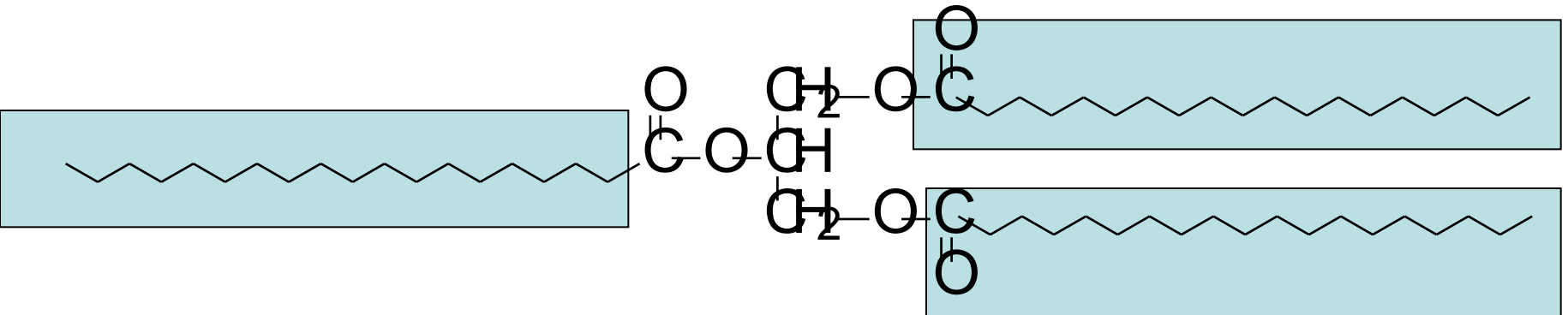


Lipoproteinová lipasa (LPL)

- negativně nabitý enzym na povrchu endotelových buněk kapilár tkání (vázáno pomocí heparansulfátu)
- přednostně na povrchu kapilár **tukové tkáně, srdečního a kosterního svalu**
- je aktivován apo-CII
- syntéza isoenzymu v tukové tkáni je stimulována insulinem, v srdečním a kosterním svalu ne
- deficit LPL způsobuje triacylglycerolemii (1/1 000 000)

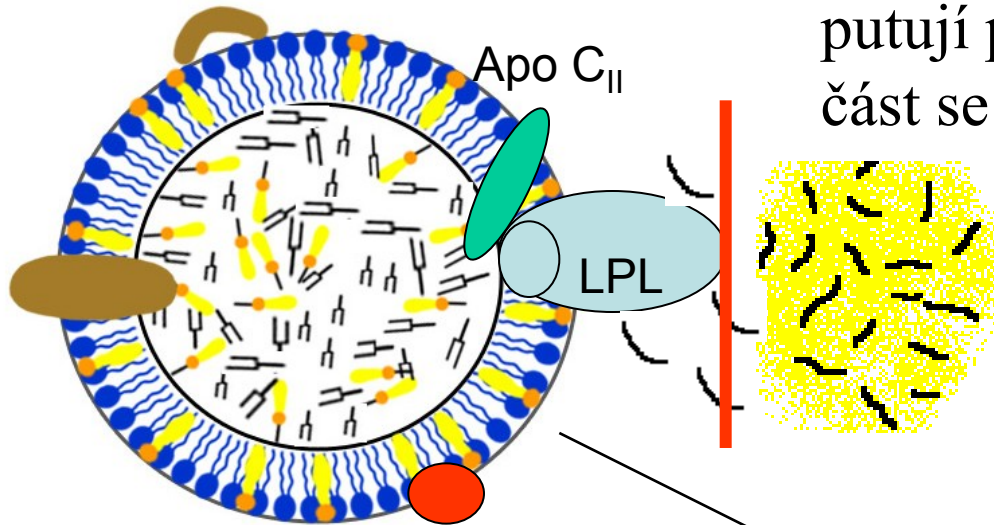
Účinek LPL

- lipoprotein se připojí na enzym vázaný na endotelu
- LPL katalyzuje hydrolýzu TG obsažených v cirkulujících lipoproteinech:



Účinek LPL na CM

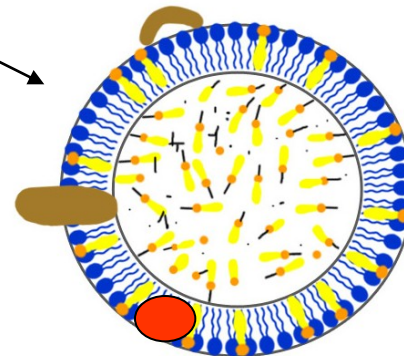
CM



- volné mastné kyseliny putují přímo do tkání, část se vrací do plasmy

- LPL odbourává cca 80% TG v chylomikronech
- chylomikrony v krvi vymizí účinkem LPL do cca 60 min

- lipoproteinová lipasa štěpí TG na mastné kyseliny a glycerol
- částice se zmenšuje, přechází na chylomikronový zbytek (může přejímat CHE z HDL)



**CM-zbytek
(remnant)**

vychytání
játry (Apo-E)

Osud MK uvolněných působením LPL

- β - oxidace ve tkáních (svalová, myokard) - získá energie
- ukládání do TG v tukové tkáni - zásoba

Další osud chylomikronového zbytku

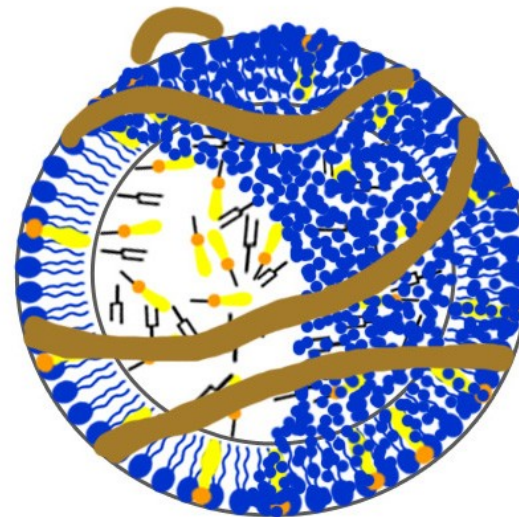
- vychytán játry (receptorově zprostředkovaná endocytóza)
- dva typy receptorů v játrech:
 - receptor apo B,E (LDL receptor)
 - LRP (LDL receptor related protein –též apoE receptor)
- **tím se do jater dostává cholesterol přijatý potravou**

VLDL – vznik a metabolismus

- vznikají v hepatocytech
- syntéza probíhá kontinuálně dle potřeby (nejen po jídle)
- **nesou CH převážně přijatý potravou**
- **nesou TG syntetizované v játrech**
- obsahují apo-B 100, malá množství Apo-A a Apo-C
- jaterním parenchymem vylučovány do Dissova prostoru, odtud do jaterních sinusoidů

Apo-B 100

- apoprotein v LDL a VLDL
- Je integrálním proteinem
- velmi dlouhý řetězec (4 536 AK)
- stejný genetický základ apo-B 48 a apo-B 100 (stejná mRNA), apo-B 48 má jen 48% délky apo-B 100)



Z čeho pochází TG v játrech ?

PO JÍDLE

v játrech probíhá syntéza MK z acetyl-CoA

acetyl-CoA pochází převážně z metabolismu sacharidů

POSTRESORPČNÍ FÁZE, HLADOVĚNÍ

volné MK jsou uvolňovány tukovou tkání, částečně jsou vychytány játry

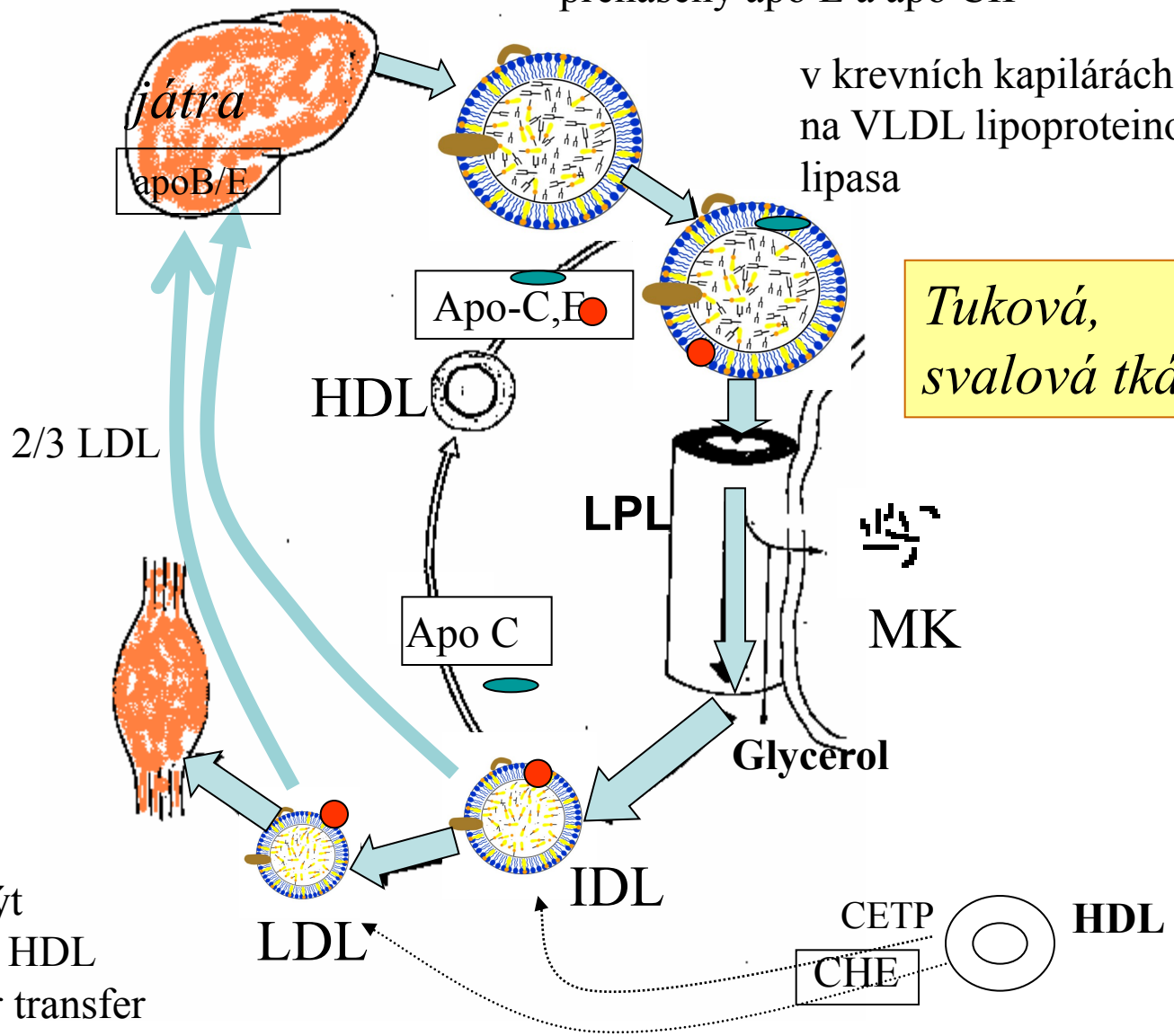
pokud MK nejsou rozloženy β -oxidací, jsou z nich resyntetizovány TG

Přeměny VLDL-přehled

z HDL jsou na VLDL přenášeny apo E a apo CII

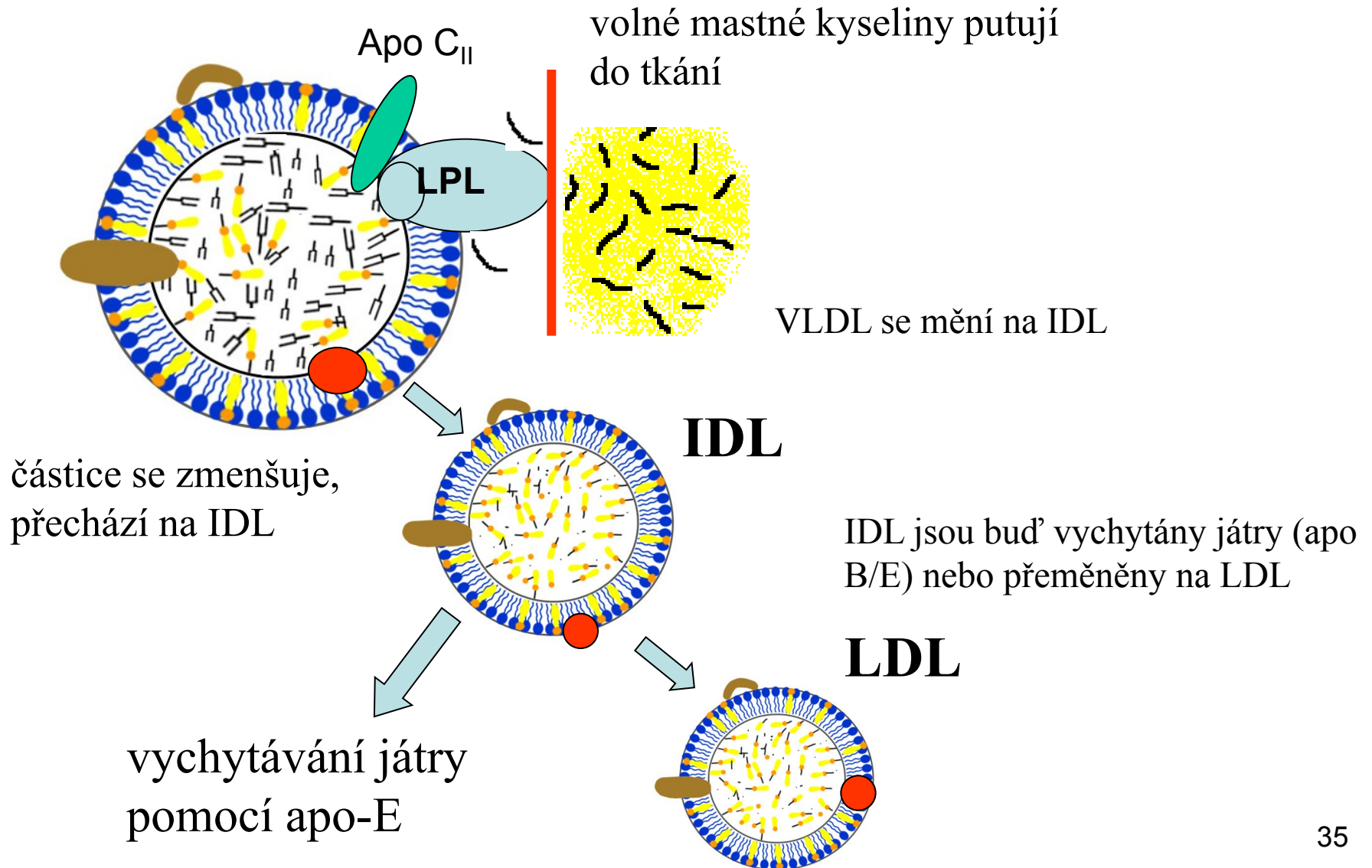
v krevních kapilárách působí na VLDL lipoproteinová lipasa

Tuková, svalová tkáň



IDL i LDL mohou být obohacovány CHE z HDL (role cholesterolester transfer proteinu CETP)

Účinek LPL na VLDL



Jaterní lipasa

- enzym na luminální stěně jaterních sinusoidů
- obdobný účinek jako LPL
- působí na remnanty, IDL, VLDL a HDL při průtoku krve játry a odbourává v nich TG

Srdeční a adipocytární LPL

Srdeční LPL má K_M cca 10x menší než adipocytární.

Syntéza adipocytární LPL je aktivována insulinem

Co to znamená ?



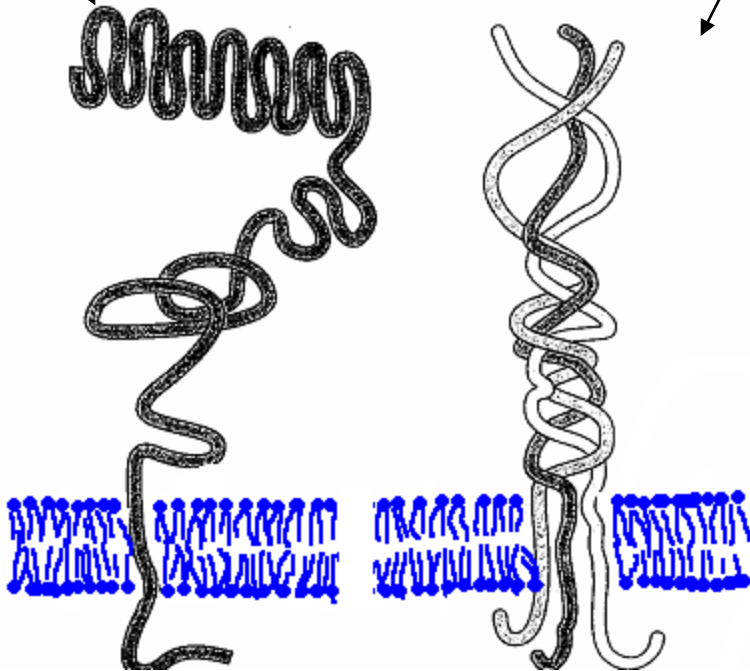
Další osudy IDL a LDL

- IDL i LDL mohou být obohacovány CHE z HDL (role cholesterol ester transfer proteinu CETP)
- IDL částice jsou vychytávány játry pomocí Apo-B/E receptoru
- LDL jsou vychytávány periferními tkáněmi (1/3) a játry (2/3) receptorově zprostředkovanou endocytózou (Apo-B/E)
- za fyziologických podmínek je během 24 hodin katabolizováno 30-40% vzniklých LDL

Receptory LDL

LDL receptor (apo B/E receptor)

je regulován intracelulárním obsahem cholesterolu



Nespecifické (scavengerové) receptory (SRA, SRB)

membránové receptory se širokou specifitou

přítomny na povrchu fagocytujících buněk, cévního endotelu a Kupferových b. v játrech

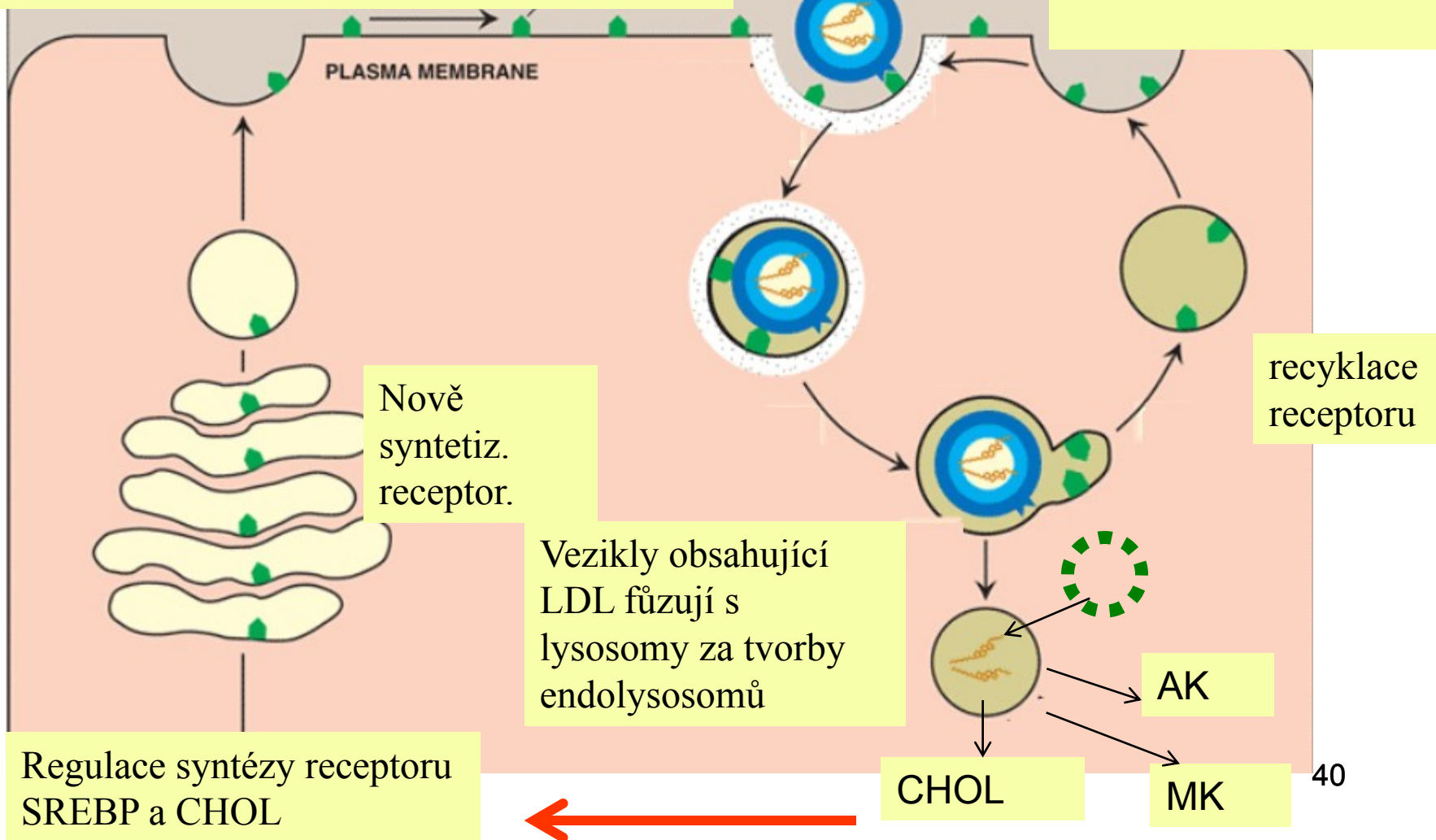
nemají zpětnou regulaci

vychytávají poškozené a nadbytečné LDL

Vychytávání LDL pomocí specifických receptorů

LDL receptor je negativně nabitý membránový glykoprotein lokalizovaný na povrchu klatrinem povlečených jamek, váže apo E a apo B

po navázání LDL na receptor je komplex internacionalizován endocytózou



Hladina cholesterolu v buňce je striktně regulována

- **down- regulace příjmu ve formě LDL** (zvýšená hladina cholesterolu v buňce reguluje počet LDL receptorů)

→ na základě regulace transkripce prostřednictvím SREBP

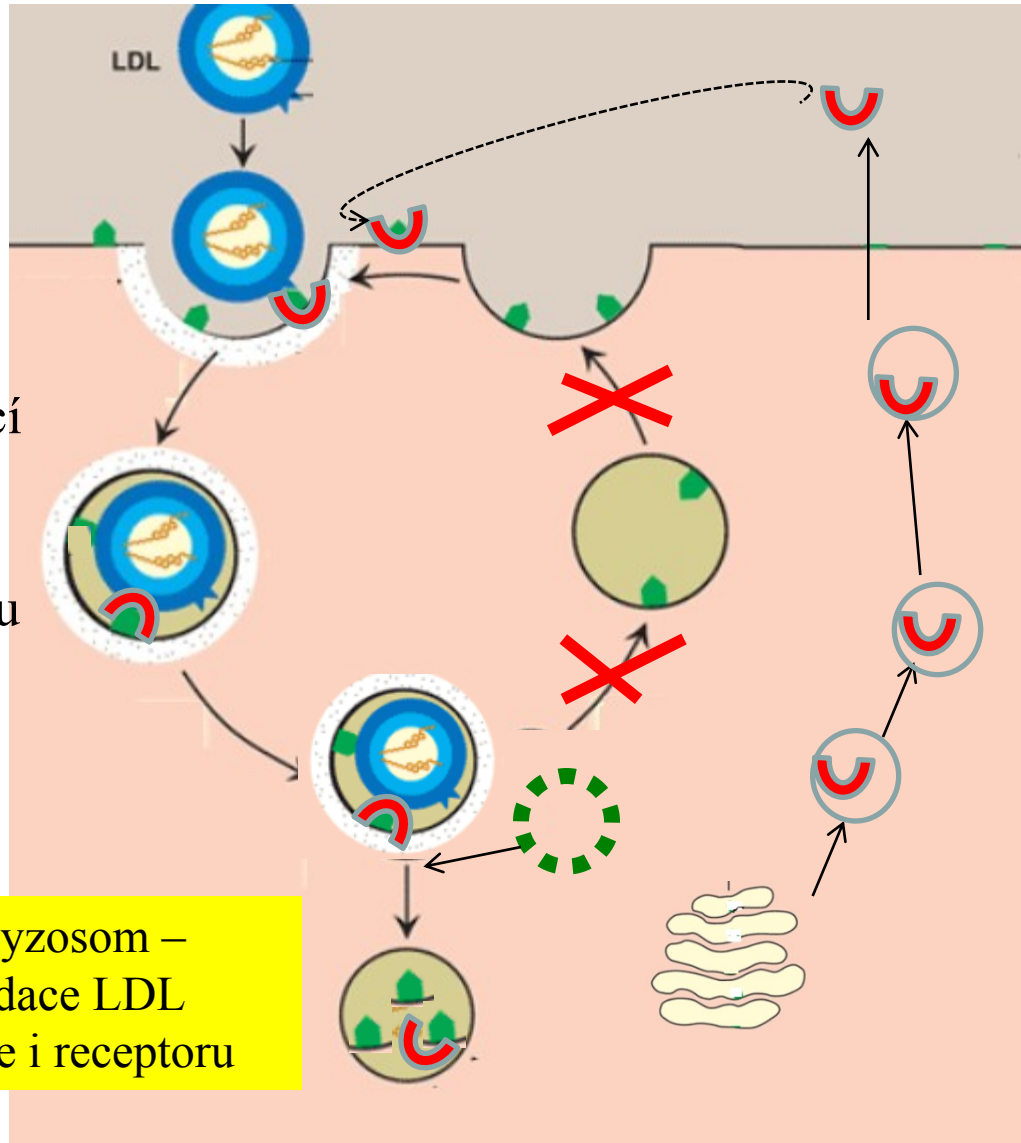
→ na základě regulace recyklace LDL receptoru proteinem PCSK9

- **regulace syntézy cholesterolu**

→ regulace transkripce genu pro HMG-CoA synthasu prostřednictvím SREBP

→ inhibice HMG-CoA – reduktasy cholesterolem

Role proteinu PCSK9 v regulaci počtu LDL receptorů



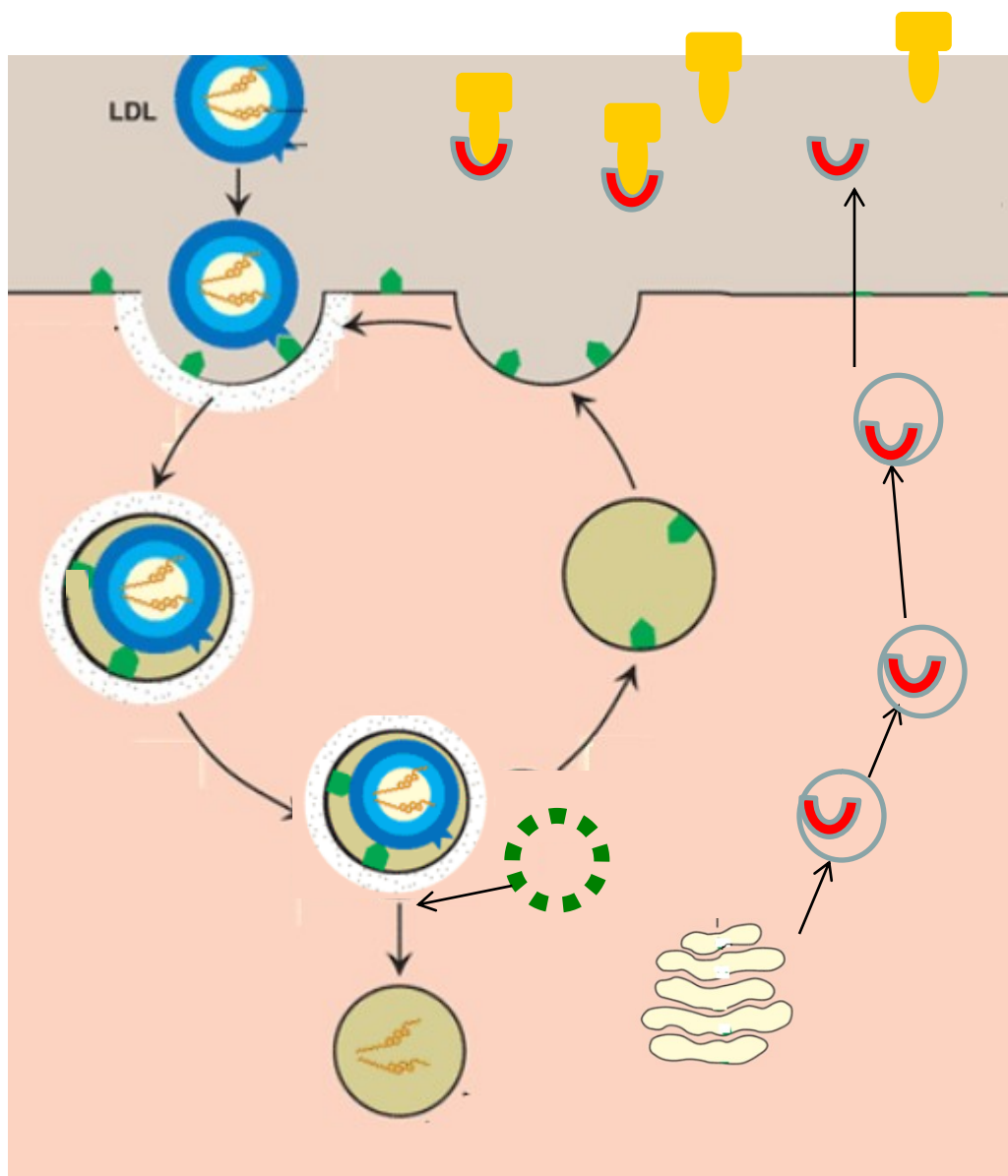
- PCSK9* je protein syntetizovaný v hepatocytech v závislosti na množství cholesterolu v buňce
- je z nich uvolněn a váže se na povrchu hepatocytu k LDL receptoru.

Buňka se brání dalšímu příjmu cholesterolu

Endolyzosom – degradace LDL částice i receptoru

*proprotein konvertáza subtilisin/kexin typ 9

Inhibitory PCSK9 snižují hladinu cholesterolu



Inhibitory PCSK9 na bázi monoklonálních protilátek byly nedávno schváleny pro použití v klinické praxi

Inhibice PCSK9 zabraňuje degradaci receptorů, zvyšuje tedy jejich počet na membráně jaterní buňky

zvyšuje vychytávání LDL v jaterní buňce

Léky alirocumab a evolocumab – nová třída hypolipidemik

Hladinu LDL-CH. snižují v průměru o 50–60 %

Alirocumab a evolocumab – nová třída hypolipidemik

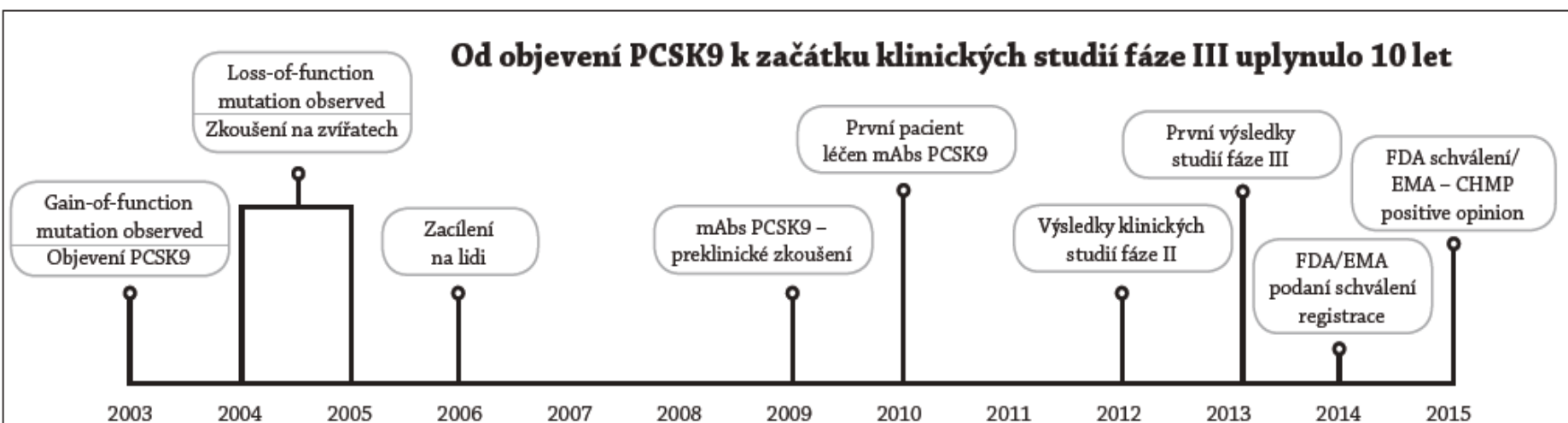
Food and Drug Administration (FDA) a EMA (European Medicines Agency – Evropská léková agentura) schválily indikace k léčbě alirocumabem (Praluent, Sanofi/Regeneron) a evolocumabem (Repatha, Amgen) na konci roku 2015. V ČR k dispozici ke klinickému použití od 2016.

Léčba je indikována u dospělých pacientů s primární hypercholesterolémií (heterozygotní familiární a nefamiliární) nebo smíšenou dyslipidémií

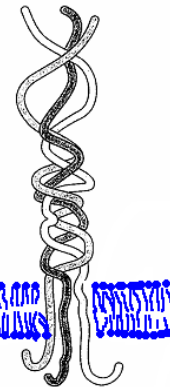
Snížení koncentrace LDL cholesterolu o 60%

Léčiva se aplikují v podkožní injekci do oblasti břicha, stehů nebo paží, 1krát za dva týdny nebo 1krát měsíčně

Od objevení PCSK9 k začátku klinických studií fáze III uplynulo 10 let



Obr. 1: Historie vývoje objevu PCSK9



Vychytávání lipoproteinů scavengerovými receptory SRA a SRB

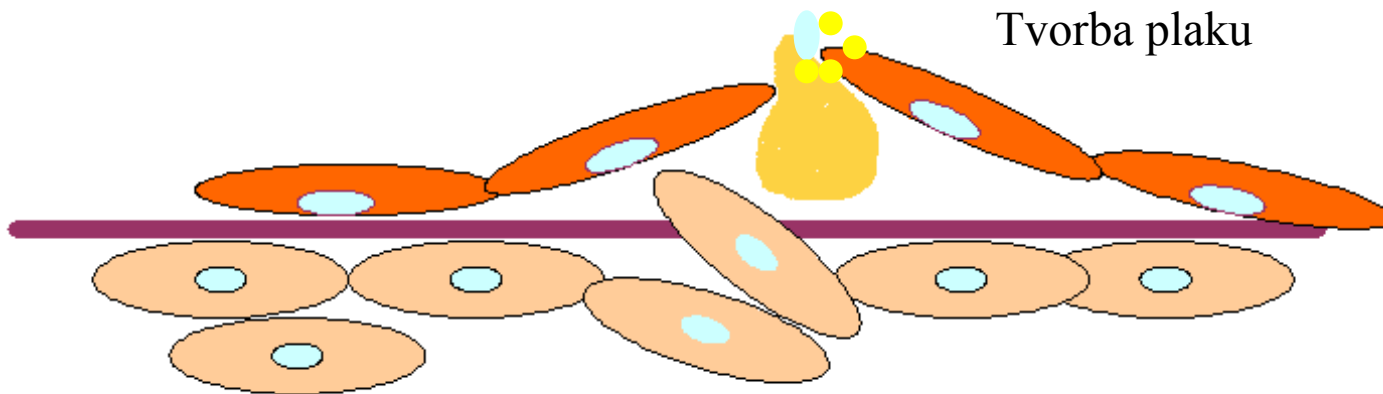
- receptory jsou přítomny na povrchu fagocytujících buněk (makrofágy v cévní stěně, v plicních alveolech a peritoneu, Kupferovy buňky, cévní endotel)
- **receptor nemá zpětnou regulaci**
- přednostně vychytává chemicky modifikované LDL (oxidované, glykované)
- vychytává též nepoškozené LDL, pokud kapacita jejich přirozeného vychytání je překročena (při hypercholesterolemii)

Tvorba pěnových buněk a vznik plaku

- makrofágy naplněné lipidy se stávají pěnovými buňkami
- mohou se akumulovat v subendotelové oblasti cév
- růstové faktory a cytokiny stimulují migraci buněk hladkého svalů a jejich proliferaci

Místo pro adhezi a agregaci destiček

Tvorba plaku



Fáze vývoje aterosklerotické léze

Izolované pěnové buňky

Tukové proužky (hromadění pěnových buněk)

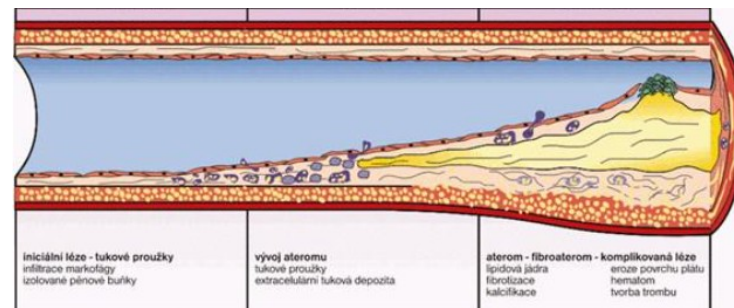
Intermediární léze (akumulace extracelulárně uložených lipidů z odumřelých tukových buněk)

Tvorba ateromu (vznik lipidového jádra)

Tvorba fibroateromu) proliferace buněk hl.svalstva a zvýšená syntéza extracelulární matrix

Komplikovaná léze (kalcifikace, ruptura, vznik trombu....

(dále patofyziologie)



Vliv hormonů na vychytávání LDL v játrech

Insulin a trijodthyronin zvyšují vychytávání LDL játry,
Glukokortikoidy mají opačný efekt.

(mechanismus není znám)

Proč nekontrolovaný diabetes a hypothyroidismus jsou rizikovým faktorem aterosklerozy a jsou často spojeny s hypercholesterolemií?



Familiární hypercholesterolemie

autosomálně dominantně přenášené monogenní onemocnění

Příčiny:

- **Defekt tvorby LDL-receptorů**

v důsledku mutace genu pro LDL-receptor

- **Defekt apolipoproteinu B-100**

(familiárně defektní apoB - FDB)

- **Mutace genu PCSK9**

V krvi koluje velké množství LDL
(ateroskleróza s rychlou progresí)

Buňka produkuje nadměrné množství
cholesterolu

Zvýšené riziko srdečního infarktu



Charakteristické xantomy
na šlachách

Role HDL v metabolismu

reverzní transport cholesterolu (RTC)

- HDL přejímají cholesterol z periferních tkání a zprostředkují jeho transport do jater

Existuje několik typů HDL

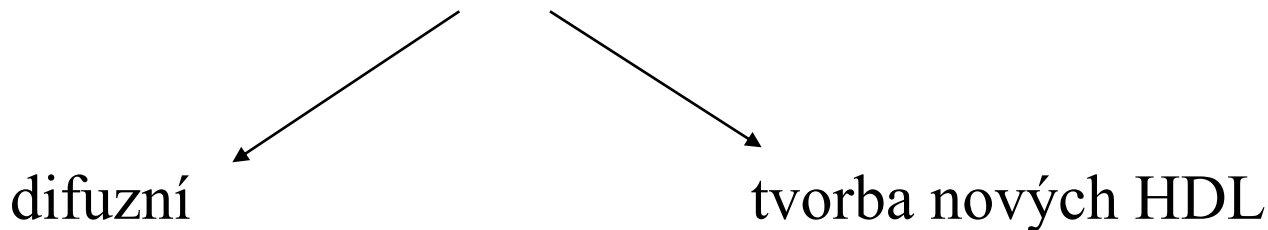
- liší se velikostí, tvarem, obsahem lipidů a apoproteinů
- mají i různé funkce
- hlavní subfrakce dle denzity: HDL₂, HDL₃
- HDL podléhají v cirkulaci přeměnám (**remodelace HDL**)

Jak je cholesterol skladován v buňce?

- Estery cholesterolu jsou uchovány ve formě kapének cytoplazmě
- Reverzní transport cholesterolu je zahájen hydrolýzou pomocí cholesterylesterhydrolázy
- Volný cholesterol je transportován k buněčné membráně

Jak HDL přejímá cholesterol ze tkání ?

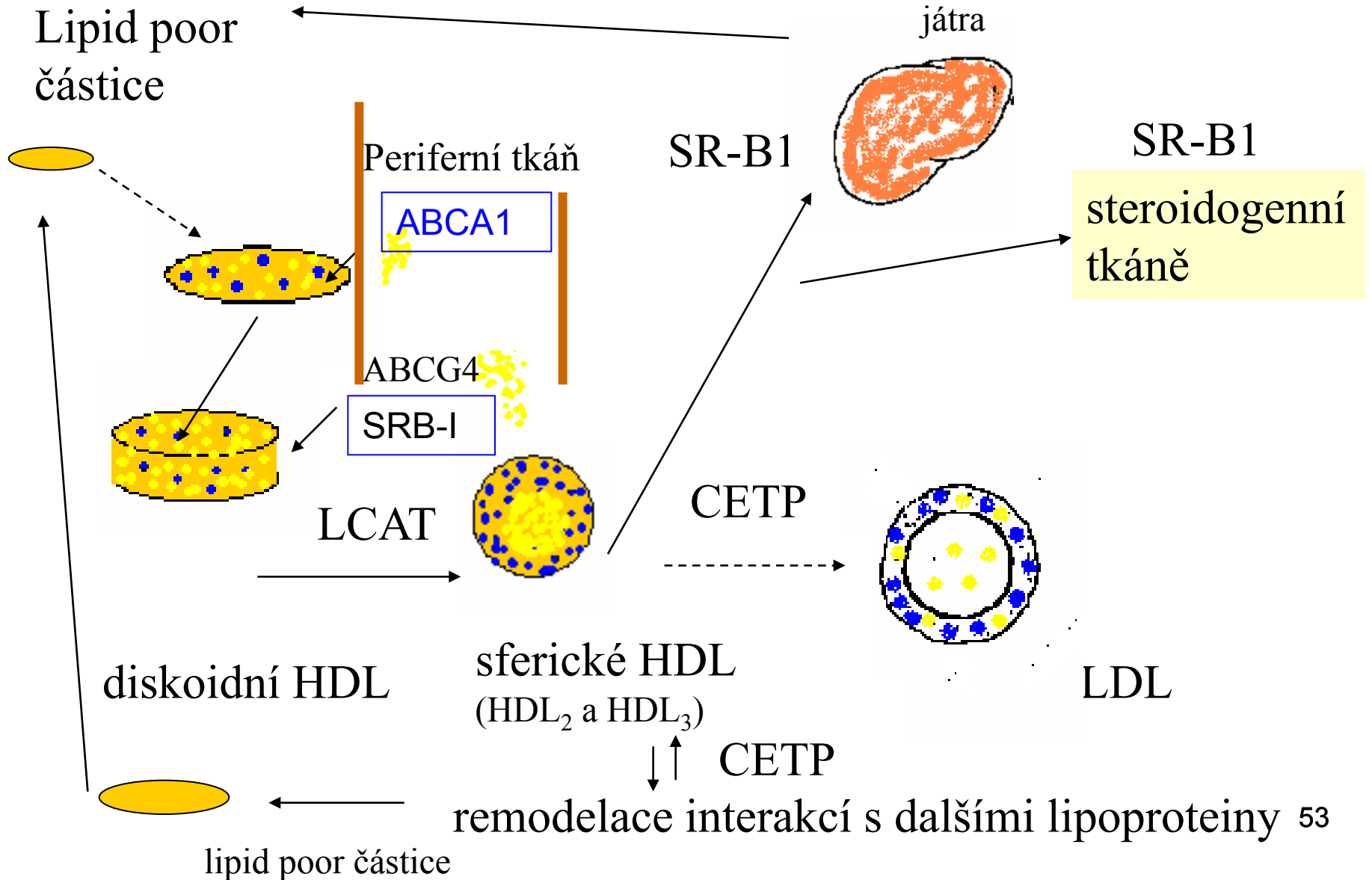
dva předpokládané mechanismy



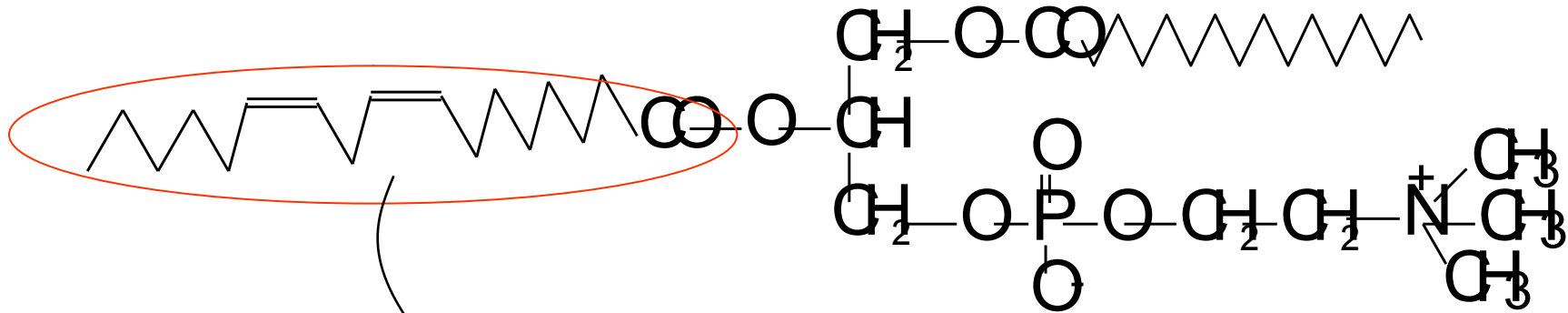
HDL – vznik a metabolismus

- základem HDL je apo AI a apo AII (z jater, apo AI též ve střevě), obsahují též apoC a apo E
- pro transport cholesterolu ze tkání mají význam malé částice tzv. „*lipid free*“ a „*lipid poor*“ apo A
- jsou secernovány játry a enterocyty a rovněž vznikají v cirkulaci z velkých HDL částic, povrchových vrstev VLDL a chylomikronů

Přeměny HDL



Funkce LCAT



- plasmatický enzym, působí na povrchu HDL, je aktivován apo A-I
- přenáší acyl MK na OH skupinu cholesterolu
- neesterifikovaný cholesterol se přeměňuje na esterifikovaný – ten je méně polární a objemnější, zanořuje se do nitra HDL
- deficit LCAT vede k zastavení zpětného transportu cholesterolu, HDL zůstává v diskoidní formě

Další osudy HDL

- esterifikovaný cholesterol vznikající účinkem LCAT je nepolární a zanořuje se do nitra částice
- tak vznikají sferické HDL částice
- sferické HDL interagují s ostatními lipoproteiny
- rychlá esterifikace cholesterolu účinkem LCAT způsobuje, že většina HDL v plazmě má sférický tvar
- Postupným přibíráním CH a též přenosem TG a fosfolipidů do HDL₃ se částice mění na větší a méně denzní HDL₂
- v játrech (a steroidogenních tkáních) jsou HDL vychytány pomocí SR-B I receptoru a pravděpodobně i dalšími mechanismy

SR-B1 receptor

HDL-receptor s dvojakou rolí při metabolismu HDL

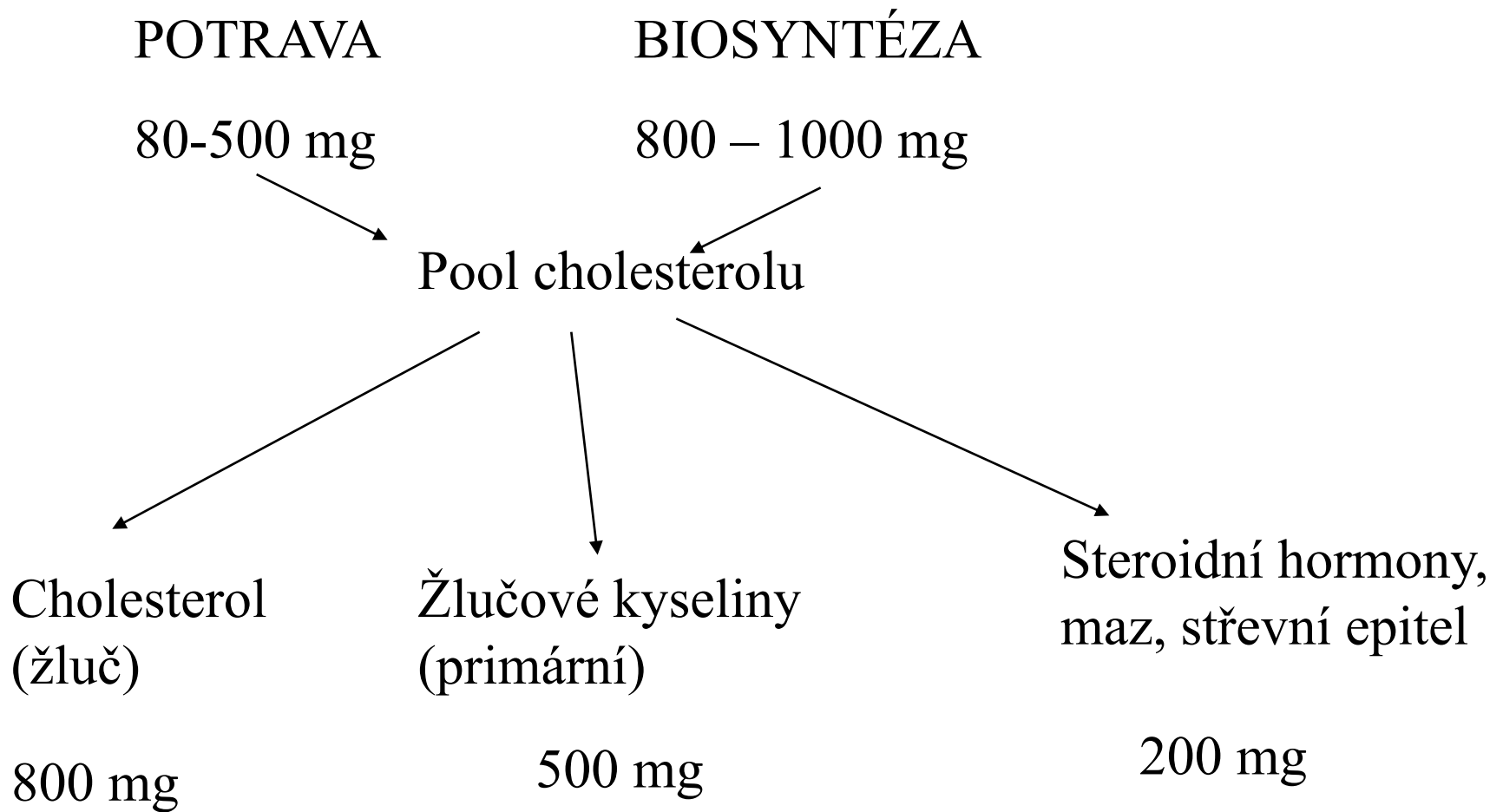
- V játrech a steroidogenních tkáních váže HDL pomocí apo A-I a zajišťuje transport cholesterolu z HDL do buňky, nedochází k endocytóze
- Ve tkáních zajišťuje transport cholesterolu z buňky do HDL. Reaguje i s makrofágy.

Výměna látek mezi lipoproteiny

mezi lipoproteiny probíhá výměna lipidů i proteinů:

- výměna periferních apoproteinů
- výměna fosfolipidů
- výměna cholesterolesterů (cholesterol ester transfer protein CETP)- z HDL do VLDL, IDL, CM – část cholesterolu ze tkání je transportována do jater formou LDL a IDL
- výměna TG mezi VLDL, CM a HDL

Bilance cholesterolu za 24 h

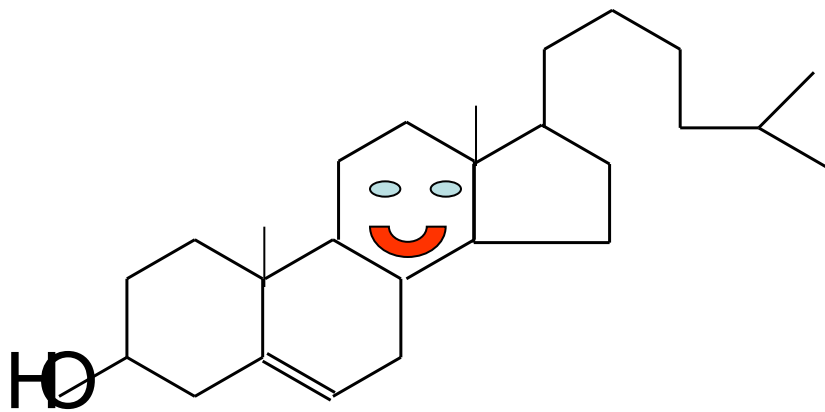


1000-1500 mg/den je vylučováno

“Hodný” a “zlý” cholesterol

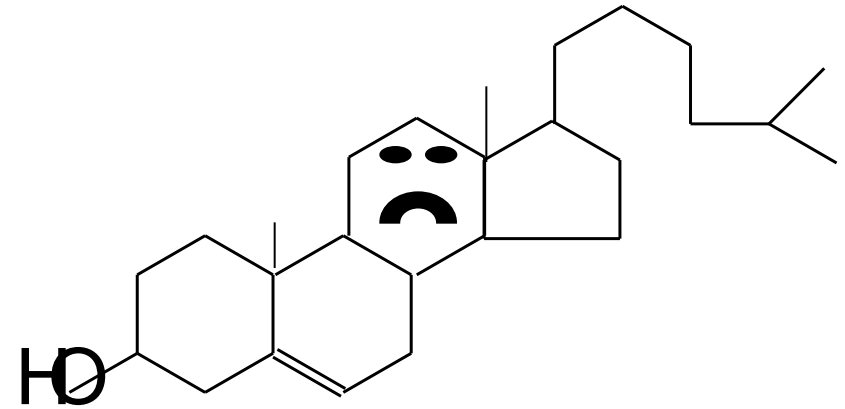
Celkový cholesterol v krvi má být < 5 mmol/l

Vysoká hladina cholesterolu je jeden z rizikových faktorů srdečně cévních onemocnění



Cholesterol přítomný v HDL

Má být >1 mmol/l



Cholesterol přítomný v LDL

Má být <3 mmol/l

Viz praktická cvičení

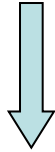
Vysoké hladiny HDL-cholesterolu

- prognosticky příznivý faktor pro riziko koronárních onemocnění

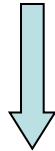
HDL-cholesterol = Hodný cholesterol

Při zjištění vyšší hladiny cholesterolu v krvi je sledováno jeho zastoupení v LDL a HDL frakci – stanovení HDL- a LDL-cholesterolu – viz praktické cvičení

Zvýšený příjem cholesterolu nebo poruchy LDL receptorů
zvýšená hladina LDL v plasmě,

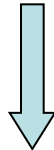


dlouhý poločas LDL, možnost oxidace MK



Poškozené a nadbytečné LDL jsou vychytávány SRA
receptory makrofágů, tvorba pěnových buněk

oxidované LDL jsou silně aterogenní



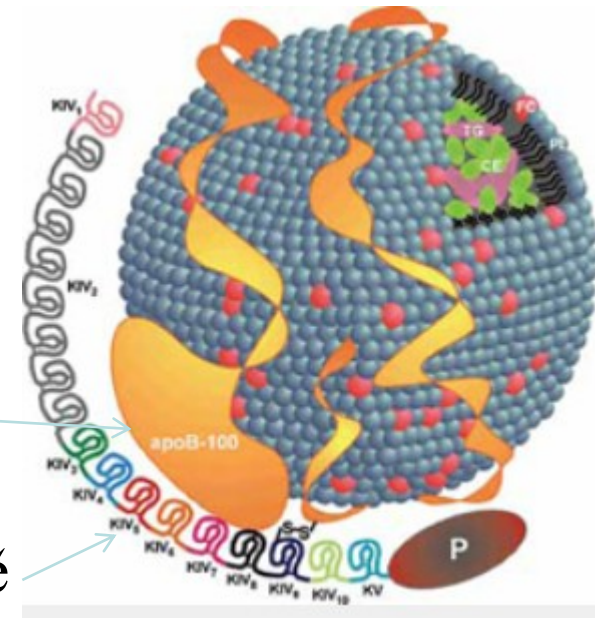
LDL cholesterol – zlý cholesterol

Snižování hladiny cholesterolu

Farmakologická léčba	
Typ léčiva	Mechanismus účinku
statiny	inhibice HMG-CoA reductasy
Ezetimib	snížení intestinální resorpce CH
alirocumab evolocumab	inhibice PCSK9
pryskyřice	zvýšení exkrece žlučových kyselin
Nefarmakologická léčba	
Dieta, pohybová aktivita	

Lipoprotein (a) – nezávislý rizikový faktor aterosklerózy a trombozy

- Lp(a) má obdobné složení jako LDL
- koncentrace >300 mg/l jsou vysoce rizikové
- obsahuje apo B 100
- navíc obsahuje glykoprotein nazývaný apolipoprotein (a) [apo(a)], který je kovalentně vázán k apo B-100
- apo(a) má strukturu homologní s plazminogenem



Teorie: Lp(a) zpomaluje odbourání krevní sraženiny v důsledku kompetice s plazminogenem ve vazbě na fibrin a může usnadňovat vazbu molekul LDL na stěny arterií .



“You haven’t been taking your cholesterol medication, have you Mr. Grosshart?”