

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

HDL LIPOPROTEINY A JEJICH ÚLOHA PŘI ZÁNĚTU

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233218502

Praha 2008

Denisa Krychtálková

Školitel: RNDr. František Novák, CSc

OPRAVNÝ LIST

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta, katedra biochemie
Bakalářská práce

Student : Denisa Krychtálková
Školitel: RNDr. František Novák, CSc

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Františka Nováka, CSc a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....*11. 6. 2008*.....

Krychtálková Denisa
.....
podpis

SEZNAM ZKRATEK

CM	chylomikrony
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou
IDL	lipoproteiny se střední hustotou
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou
Apo C	apoprotein C
Apo E	apoprotein E
LCAT	lecitincholesterolacyltransferáza
rHDL	rekonstituované částice HDL
LPS	lipopolysacharid
LBP	protein vázající lipidy
sCD14	rozpuštěný membránový protein CD14
PTLP	protein transportující fosfolipidy
NOS	syntáza oxidu dusnatého
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
SR-BI	čistící receptor I. typu
CAM	cytoadhezní molekuly
PON	paraoxonáza
PAF-AH	acetylhadroláza faktoru aktivujícího krevní destičky
PAF	faktor aktivující krevní destičky

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli, RNDr.Františku Novákovi,CSc. za vedení mé bakalářské práce a cenné připomínky a rady při jejím zpracování.

Obsah

1. Úvod	4
2. Cíl	5
3. LIPOPROTEINY, JEJICH STRUKTURA, DĚLENÍ A FUNKCE	6
3.1. Lipoproteiny- struktura	6
3.3.1. Chylomikrony	7
3.3.2. Lipoproteiny o velmi malé hustotě	8
3.1.3. Lipoproteiny o střední hustotě	8
3.3.4. Lipoproteiny o nízké hustotě	8
3.3.5. Lipoproteiny o vysoké hustotě	9
4. HDL LIPOPROTEINY A JEJICH ÚLOHA V ZÁNĚTU	10
4.1. Struktura HDL lipoproteinů	10
4.2. Úloha HDL lipoproteinů	10
4.3. HDL lipoproteiny a sepse	12
4.3.1. Sepse, septický šok	12
4.3.2. Terapie septických stavů pomocí rHDL lipoproteinů	12
4.3.3. Bakteriální endotoxiny	14
4.3.4. Modifikace lipoproteinů v sepsi	15
4.3.5. Cytokiny	16
4.4. Úloha HDL během sepse	16
4.4.1. Vázání lipopolisacharidu a jeho neutralizace	16
4.4.2. Regulace exprese enzymu eNOS	19
4.4.3. Inhibice exprese adhezních molekul	21
4.4.4. Úloha HDL v ochraně LDL před oxidačním poškozením	24
5. Závěr	28
6. Seznam použité literatury	29

1. Úvod

Sepse se v současné době řadí mezi hlavní příčiny mortality. Je to hlavně z důvodu, že se do této skupiny zahrnuje i úmrtnost na základě aterosklerózy, která se stala velmi závažnou civilizační chorobou, především v západním světě. Ateroskleróza je způsobená nezdravou životosprávou v kombinaci s nedostatkem pohybu. Důležitou roli hrají i genetické faktory. Vzhledem k obrovskému množství léčených pacientů je třeba brát v úvahu i výrazný finanční dopad na zdravotnictví. Toto jsou hlavní důvody, proč úsilí ze strany vědeckého výzkumu směřuje k nalezení příslušných léků, pomocí kterých by se mohly septické stavy úspěšně léčit.

Vědci na základě četných výzkumů dokázali, že se v boji proti sepsi a jejímu rozvoji v organismu uplatňují lipoproteinové částice o vysoké hustotě, HDL (**high density lipoproteins**). Skutečnost, že jsou v organismu nepostradatelné byla známa již dříve. HDL mají důležitou úlohu v transportu lipidů - zajišťují odvádění cholesterolu z organismu, čímž brání jeho ukládání v intimně cévních stěn, a tak snížení průtoku krve, což často vede až k ucpání cév (ateroskleróze). HDL se však výrazně uplatňují i v ochraně před zánětem a sepsí. Do dnešní doby byly objeveny čtyři mechanismy ochrany organismu proti sepsi, kterou zajišťují HDL částice. Je to schopnost HDL: neutralizovat bakteriální lipopolysacharidy, regulovat expresi enzymu syntázy oxidu dusnatého, inhibovat expresi adhezních molekul a chránit lipoproteiny o nízké hustotě před jejich oxidativní destrukcí.

Z množství literárních zdrojů je zřejmé, že problematika zabývající se úlohou HDL při ochraně organismu v zánětu a sepsi je nadále intenzivně studovaná a získané výsledky by mohly přispět k novým přístupům v klinické praxi při terapii zánětu a septických stavů.

2. Cíl

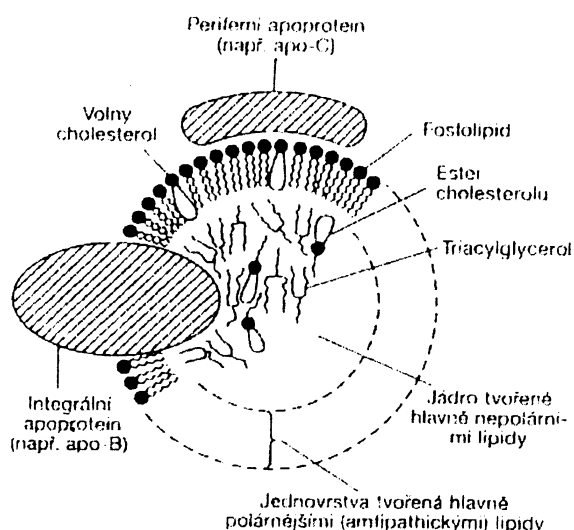
Cílem mé bakalářské práce je popsat funkci a strukturu lipoproteinů s důrazem na význam HDL částic a jejich uplatnění při ochraně proti zánětu a rozvoji septického šoku.

3. LIPOPROTEINY, JEJICH STRUKTURA, DĚLENÍ A FUNKCE

3.1. LIPOPROTEINY- STRUKTURA

Lipidy jsou ve vodném prostředí krevní plasmy nerozpustné, proto se musí vázat na speciální proteiny, tzv. apoproteiny. Komplexy tvořené lipidy a apoproteiny se nazývají lipoproteiny. Hlavní funkcí lipoproteinů je transport neutrálních lipidů. V krevním oběhu jsou ovlivňovány řadou enzymatických reakcí, které mohou měnit zastoupení jejich lipidové složky. Syntetizují se ve střevě a játrech, k jejich katabolizmu dochází v játrech, ledvinách a periferních tkáních. Mezi lipidy, které se uplatňují ve struktuře a metabolismu lipoproteinů se řadí fosfolipidy, cholesterol, cholesterolestery a triacylglyceroly.

Lipoproteinové částice (viz.obr.č.1) se skládají z neutrálního jádra tvořeného estery cholesterolu a triacylglyceroly. Povrch částic je tvořen monovrstvou amfipatických fosfolipidů, mezi kterými jsou zabudovány molekuly volného cholesterolu a integrální apoproteiny. Na povrchu se nacházejí periferní apoproteiny, které jsou vázány volně a může docházet i k jejich migraci na jiné lipoproteinové částice. Apoproteinů je několik druhů (viz. tab.č.1) a jsou označeny písmeny abecedy, popř. ještě specifikovány římskými číslicemi. Jednotlivé částice mají specifické zastoupení apoproteinů, které se hlavně liší svou funkcí



Obr. č.1: Schematické znázornění lipoproteinové částice (Převzato: Murray R.,Granner D.K., Mayes P., Rodwell V.W., **(1)**).

Lipoproteinové částice se dělí na podskupiny nejčastěji podle hustoty. Bylo rozlišeno 5 základních tříd: chylomikrony (CM), lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL), lipoproteiny se střední hustotou (IDL), lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL), lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL). Další významné dělení je z hlediska elektroforetické pohyblivosti na agarózovém gelu. Tak lze zísat lipoproteiny s pohyblivostí: pre- β , mezi pre- β a β , β a α . Elektroforetická pohyblivost koreluje s hustotou částic (viz.tab.č.1)

Tabulka č.1: Složení lipoproteinů (převzato: Novák F.(2)).

	Chylomikrony	VLDL	IDL	LDL	HDL
hustota	< 0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
průměr (nm)	75- 1,200	30-80	25-35	18-25	5-12
proteiny	1-2	10	18	25	33
triacylglyceroly	83	50	31	10	8
cholesterol	8	22	29	46	30
fosfolipidy	7	18	22	22	29
složení apoproteinů	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III	B-100, B-48 C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100,	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E
elektroforetická pohyblivost	na startu	pre - β	mezi pre- β a β	β	α

Pozn: Kvantitativní zastoupení jednotlivých složek je vyjádřeno v procentech suché hmotnosti.

3.1.1. Chylomikrony (CM)

Z uvedených tříd jsou chylomikrony (chylomicrons) lipoproteiny s největším průměrem a nejmenší hustotou, která je způsobena nízkým obsahem proteinů a naopak velmi vysokým obsahem triacylglycerolů. Cholesterol a triacylglyceroly z potravy se gastrointestinálním traktem dostávají do tenkého střeva, kde se váží na chylomikrony, syntetizovanými buňkami střevního epitelu, dostávají se do lymfatického oběhu a dále postupují ke tkáním. Chylomikrony obsahují Apo C a Apo E. Tyto dva apoproteiny jsou u nově syntetizovaných

CM jen v malé míře, později jsou však získávány metabolicky předáním z HDL částic. Apo C hraje u CM důležitou roli, protože aktivuje lipoproteinovou lipázu a umožňuje CM interakci s periferními tkáněmi, které tak zásobuje produkty ze štěpení triacylglycerolů, tj. mastnými kyselinami, glycerolem a zbytkovými CM. Během metabolického zpracování jsou CM velmi rychle katabolizovány, ztrácí většinu svých triacylglycerolů a mění se na zbytkové chylomikrony. Zbytkové CM jsou endocytózou vychytávány a odbourávány v játrech, kde se tak přemění na částice VLDL.

3.1.2. Lipoproteiny o velmi malé hustotě (VLDL)

Částice VLDL (**very low density lipoproteins**) se syntetizují v jaterních buňkách ze zbytkových částic CM. Transportují cholesterol z jater do plazmy, přičemž většina z tohoto cholesterolu se metabolicky dostává až k LDL. Každá molekula VLDL obsahuje 1 molekulu apoproteinu Apo B-100. VLDL obsahuje i další apoproteiny, konkrétně Apo E a Apo C, těch má ovšem po vzniku nedostatečné množství, proto je stejně jako CM přebírá od HDL. Apo C obsažený v částicích VLDL slouží jako kofaktor lipázy pro hydrolytické štěpení triacylglycerolů, které jsou tak přenášeny do tkání. VLDL se katabolicky odbourávají za působení enzymu lipoproteinové lipázy a vzniku částic IDL, což je v podstatě zbytkový VLDL, čili molekula VLDL, která už předala Apo C molekule HDL, které jsou přítomny v oběhu. VLDL receptory hrají důležitou roli při transportu mastných kyselin triacylglycerolů k adipocytům.

3.1.3. Lipoproteiny o střední hustotě (IDL)

Částice IDL (**intermediate density lipoproteins**) vznikají metabolicky z VLDL. Během transportu je zachován Apo B-100, proto tedy každá částice IDL je derivována z jedné částice VLDL. V průběhu katabolismu se pak dále IDL přeměňují na LDL.

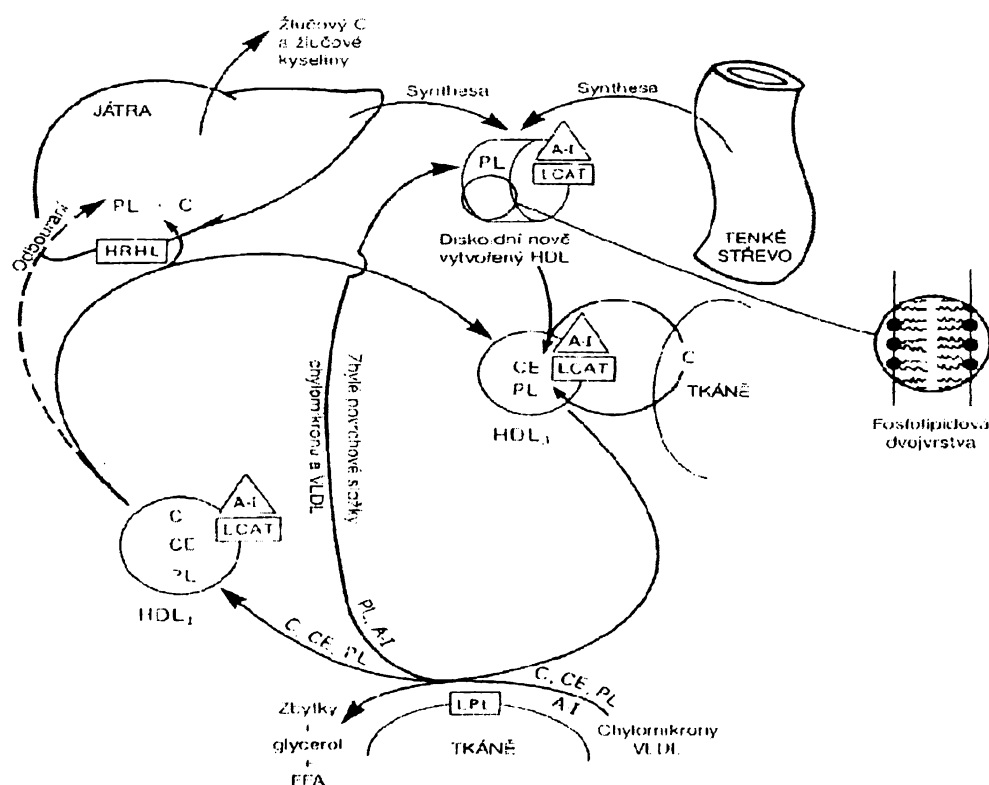
3.1.4. Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)

Většina LDL lipoproteinů (**low density lipoproteins**) se vytváří metabolicky z IDL, přibližně 70% se odbourává v játrech a zbylých 30% v mimojaterních tkáních. Transportují většinu cholesterolu v organismu. LDL nesou plazmatický cholesterol a jsou vychytávány receptory pro LDL, které jsou soustředěny na určitém úseku buněčných membrán. Tyto úseky se nazývají „coated pits“. „Coated pits“ se vyznačují vysokou afinitou k LDL částicím z toho důvodu, že obsahují Apo B-100, ke kterému se snadno váží. „Coated pits“ se podílí na pinocytóze a následném odbourání lipoproteinů. Při ateroskleróze dochází k ukládání

cholesterolu transportovaného LDL částicemi v cytoplasmě buněk různých tkání. Pokud se zvýší koncentrace cholesterolu, dojde zpětnovazebně k inhibici syntézy cholesterolu v buňce.

3.1.5. Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL)

K syntéze HDL (**high density lipoproteins**) a odbourávání dochází v játrech a střevech.(viz.obr.č.2) HDL částice zodpovídají za transport cholesterolu ze tkání do jater (reverzní cholesterolový transport). Nově vzniklý, tj.nascentní lipoprotein se liší tvarem a obsahem apoproteinů od plazmatického HDL. Neobsahuje Apo C a Apo E, obsahuje pouze Apo A. Zbylé dva apoproteiny (Apo C, Apo E) získává až metabolicky. Nascentní částice HDL mají také odlišný tvar - tvoří fosfolipidovou dvojvrstvu, až později se přeměňují na sférické molekuly HDL s nepolárním jádrem a vrstvou polárních lipidů a apoproteinů.



Obr.č.2: Metabolický osud částic HDL v organismu s důrazem na jednotlivé apoproteiny a enzymy zapojené do jejich transportu. PL..fosfolipid, C..cholesterol, CE..estery cholesterolu, LCAT..lecitincholesterolacyltransferáza, FF..volné mastné kyseliny, LPL..lipoproteinová lipáza, HRHL..jaterní lipáza (Přejato: Murray R.,Granner D.K., Mayes P., Rodwell V.W. (1)).

4. HDL LIPOPROTEINY A JEJICH ÚLOHA V ZÁNĚTU

4.1. STRUKTURA HDL LIPOPROTEINŮ

HDL lipoproteiny jsou sférické molekuly s jádrem neutrálního charakteru. Ze všech lipoproteinových částic obsahují největší procento proteinů a nejméně triacylglycerolů. Jsou syntetizovány jaterními buňkami a ve střevní sliznici. Částice HDL je možno dělit z různých hledisek. Nejdůležitější je dělení na základě ultracentrifugace, obsahu apoproteinů a elektroforetické pohyblivosti.

Tabulka č.4: Dělení lipoproteinů HDL na základě ultracentrifugace

HDL₁	HDL₂	HDL₃
Největší molekula	Velikostně mezi HDL ₁ a HDL ₃	Nejmenší částice
Má nejnižší hustotu	Hustotně mezi HDL ₁ a HDL ₃	Největší hustota
Je obohacen větší frakcí Apo E	Elektroforetický se dělí na další podtřídy: HDL 2a, HDL 2b	Také se dělí na podtřídy: HDL 3a, HDL 3b, HDL 3c
Nemá specifický význam a Nevyskytuje se ve větší míře.		

Z hlediska dělení podle obsahu apoproteinů získáváme: 1) částice HDL obsahující Apo A1 a bez obsahu Apo A2 (LpA-I) a 2) částice HDL obsahující Apo A1 i Apo A2 (LpA-I / A-II)

Na základě elektroforetické pohyblivosti se HDL částice dělí: HDL s pohyblivostí α ,

HDL s pohyblivostí pre β a HDL s pohyblivostí γ .

HDL lipoproteiny se v organismu uplatňují jednak svou původní a hlavní funkcí - transportu lipidů, ale byla prokázána i jejich velmi důležitá úloha během septických stavů.

4.2. ÚLOHA HDL LIPOPROTEINŮ

1. reverzní cholesterolový transport

2. protekce za septických stavů

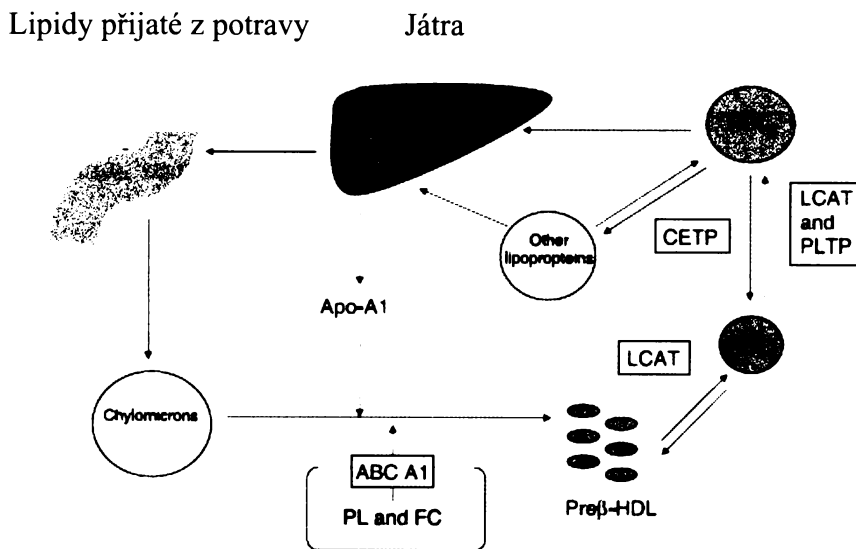
Reverzní cholesterolový transport (RCHT)

Jedná se o transport cholesterolu uvolněného z periferních tkání do jater, kde je metabolizován a/nebo vyloučen žlučí. Periferní tkáně produkují veškerý cholesterol potřebný pro udržení stálého vnitřního prostředí - homeostázy. Játra jsou jediným orgánem, který je schopen cholesterol degradovat, proto se cholesterol musí do jater krví transportovat a to se děje v komplexu s lipoproteiny. Tento transport v největší míře zajišťují HDL lipoproteiny, přenášejí většinu cholesterolu, který se do organismu dostane potravně. Tímto mechanismem jsou HDL lipoproteiny schopny poskytnout ochranu proti ateroskleróze, protože tak dojde k metabolickému využití cholesterolu a jeho následnému vyloučení z těla ven, tudíž nedochází k jeho ukládání do cévních stěn a snižování průřezu cév. Existuje nepřímá úměra mezi koncentrací HDL v krvi a pravděpodobností výskytu aterosklerózy.

Osud lipidů přijatých z potravy v těle

Lipidy přijaté z potravy se pomocí trávicího traktu dostávají do střeva. Ve střevě dochází ke vzniku nascentních částic HDL diskovitěho tvaru. Následně dochází vlivem enzymu LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase) k esterifikaci volného cholesterolu v HDL a jeho přeměně na částici HDL₃. Po těchto dějích už částice HDL nabudou klasického, tj. sférického tvaru. Jelikož HDL₃ ještě pokračují v pohlcování dalších lipidů, snižuje se jejich hustota a zvětšuje se průměr, až vzniknou částice HDL₂. HDL₂ nesoucí lipidy a cholesterol jsou z cirkulace vychytávány játry, kde jsou následně degradovány. Zbylé částice jsou odstraněny žlučí, nebo se zpět vrací do oběhu (viz.obr.č.3).

Koncentrace HDL je jedním z ukazatelů pro určování pravděpodobnosti vzniku aterosklerózy, i když přesnější hodnocení je na základě aterogenních indexů což je poměr HDL ku LDL. Dalšími markery jsou aktivity enzymů nebo množství proteinů, které se uplatňují v RTCH. Jedná se o aktivitu např. LCAT, CETP (cholesteryl ester transfer protein), hepatické lipázy.



Obr.č.3: Reverzní cholesterolový transport. Apo A-1..Apoprotein A-1, SR-BI ..čistící receptor typu B, LCAT..lecitincholesterolacyltransferáza, PLTP..protein transportující fosfolipidy, CETP.. protein transportující estery cholesterolu, PL..fosfolipid, FC..volný cholesterol. (Převzato: Murch O., Collin M., Hinds Ch. J.,Thiermann T. (3)).

4.3. HDL LIPOPROTEINY A SEPSE

Skutečnost, že se HDL lipoproteiny uplatňují v septických stavech (tj.ve stavech, kdy v organismu probíhá generalizovaný zánět) je v medicíně známa mnohem kratší dobu, než jejich transportní úloha. Po jejím objevení došlo v této oblasti k velmi intenzivnímu výzkumu, který přinesl mnoho nových, velmi důležitých poznatků, díky nimž jsou septické stavy stále lépe léčitelné.

4.3.1. Sepse, septický šok

Sepse je klinický stav (syndrom) těžké infekce spojený s výskytem bakterií a bakteriálních toxinů v krvi. Ty ji také ve značné míře způsobují, i když nejsou jejím jediným původcem. Mohou to být také houby, viry, paraziti. Zásadním okamžikem patogenního procesu je vazba LPS na odpovídající receptory makrofágů. V dnešní době je cílem vědeckého výzkumu vyléčení sepse zabráněním aktivace makrofágů, nebo eliminací uvolňovaných cytokinů. Dosud však nebyla tato snaha dostatečně úspěšná. Při sepsi dochází v organismu k nadměrnému rozmnožení mikroorganismů v důsledku selhání ochranných (imunitních) bariér. Největší nebezpečí a zákeřnost sepse spočívá v tom, že může vést až

k selhání orgánů a hypertenzi, což až v 50% případů vede k úmrtí pacienta, v závislosti na stádiu sepse. Během sepse často dochází k abnormálním jevům v imunitním systému, zánětu, tvorbě sraženin a k podobným nepřirozeným reakcím. Přesný mechanismus sepse nebyl dosud dokonale popsán a nadále zůstává otázkou, jestli postihuje ve větší míře nějakou specifickou skupinu pacientů. Zvýšený výskyt je prokázán jen u pacientů se sníženou imunitou, starších pacientů a lidí, kteří užívají imunosupresivní terapii.

Sepse se dělí do 4 stádií

I. časná sepse-metabolismus na buněčné úrovni ještě neporušen. Proto je někdy označováno jako „kompenzované stádium sepse“.

II. hyperkinetická sepse-už se projevuje porucha metabolismu na buněčné úrovni.

III. orgánové selhání-nemocný jeví všechny známky orgánového selhávání.

IV. septický šok-někdy též nazývaný kardiogenní, či hypodynamické stádium, terminální stádium (stádium studeného šoku) **(4)**.

Ve všech stádiích je možno pozorovat určitou míru poškození jater.

Septický šok je nejzávažnější stádium sepse. Je charakteristický těžkou sepsí spojenou s hypotenzí (systolický tlak bývá nižší než 90 torr) a dysfunkcí orgánů spojených s krevním oběhem, která je způsobena zhoršením výměny látek a plynů mezi krví a tkáněmi.

Septický šok je zpravidla je vyvoláván rozpadem bakterií (grampozitivních i gramnegativních) a následným proniknutím uvolněných endotoxinů z nich do oběhu. Endotoxiny jsou tak prvotní příčinou sepse. Septický šok může vyvolat nejen živý mikroorganismus, ale i mrtvé bakterie nebo pouze jejich části. U sepsí, které jsou způsobené enterobakteriemi, meningokoky a pseudomonádami je poměrně velká pravděpodobnost rozvinutí septického šoku a je možná už na počátku onemocnění. Jinak to obecně bývá až po několika dnech trvání těžké infekční nemoci. Sepse se častěji vyskytuje u osob se sníženou imunitou. Tento stav se vyznačuje velkým procentem mortality (až 90%), jejíž hlavní příčinou je selhání orgánů. Čím dříve se léčba zahájí, tím více se zvyšuje naděje na přežití pacienta. Nadále, přes veškeré současné poznatky, však platí přímá úměra mezi intervalem od vzniku (či od diagnostiky sepse) do zahájení adekvátní léčby příčiny zánětu u nemocného a mezi mírou mortality. Rozpoznání sepse v jejích počátečních stádiích je však pro lékaře poměrně obtížné z důvodu nespecifičnosti jejich příznaků. Ani aplikace důležitých poznatků z výzkumu do praxe prozatím nevedla ke snížení úmrtnosti u pacientů s rozvinutým

septickým šokem. Smrt může nastat během několika málo hodin. Sepsí je proto velmi důležité léčit v jejím nejrannějším stádiu, aby se tak zabránilo rozvinutí septického šoku.

U pacientů v septickém šoku se vyskytuje řada různých příznaků, např. horečka s třesavkou, zchvácenost, neklid, zvracení, porucha vědomí, bledost, oligurie, hyperglykémie.

Cílem terapie je hlavně co nejrychlejší omezení infekce a zejména jejího zdroje, zajištění dostatečné funkce oběhu, stálosti vnitřního prostředí, vydatná hydratace. Terapie septických stavů je v současnosti založena na 3 přístupech: potlačení infekce pomocí antibiotik, odstranění jejího ohniska a psychologická podpora, která zahrnuje sledování psychického stavu pacienta za cílem udržení homeostázy. Selhání homeostázy je také jeden z dalších typických příznaků septického šoku. Některým pacientům se kromě antibiotik podávají i steroidy (5). Vědci ovšem jdou za cílem léčit septické stavy pomocí HDL lipoproteinů.

4.3.2. Terapie septických stavů pomocí rHDL lipoproteinů

Na základě snahy využít ochranné vlastnosti HDL proti rozvoji sepse se v současné době nabízí využití HDL při terapii zánětu. Vzhledem k faktu, že při septických stavech dochází ke snížení koncentrace nativních HDL lipoproteinů, byly z důvodu snahy zabránit jejich poklesu v organismu i během sepse vyvinuty rekonstituované HDL částice (rHDL), což jsou HDL částice synteticky připravené z apoproteinu a fosfatidylcholinu. rHDL tvoří sférický komplex podobný nativním HDL. V organismu jsou metabolicky odbouratelné, nejsou rozpoznávány retikuloendoteliálním systémem jako cizorodé molekuly a organismus proti nim nesyntetizuje žádné protilátky, které by je degradovaly. Částice rHDL se tak stávají možným terapeutickým prostředkem při léčbě zánětu a sepse (19).

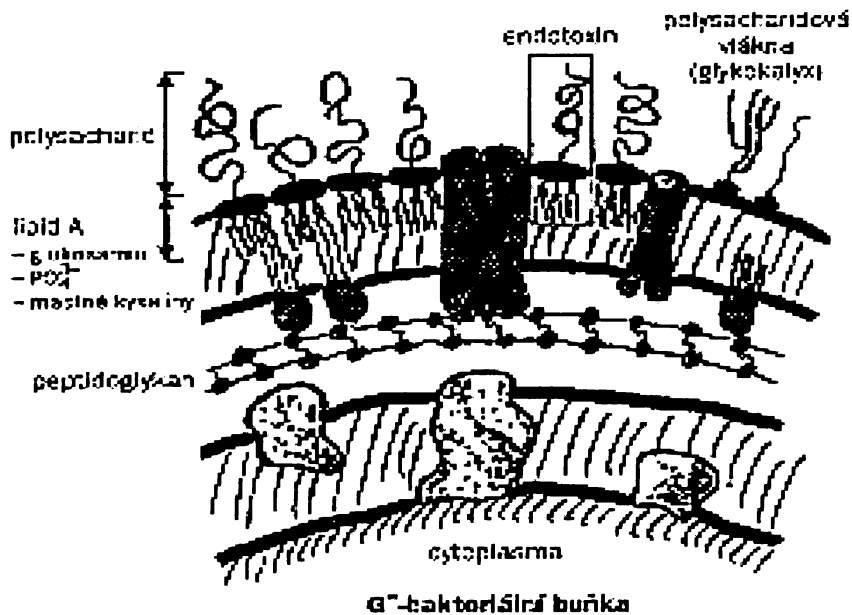
4.3.3. Bakteriální endotoxiny

Bakteriální endotoxiny a jejich následné působení v organismu je hlavním zdrojem sepse. Jedná se o látky lipopolysacharidového charakteru - z toho důvodu se někdy endotoxiny označují jednoduše jako „*lipopolysacharid*“ (LPS). Přestože jsou LPS všudepřítomné, jedná o jedny z nejsilnějších toxinů vůbec (6). Nacházejí se ve vnější cytoplazmatické membráně gramnegativních buněk bakterií (viz. obr. č. 4), odkud jsou také dále uvolňovány (7). Jsou dobře známými „spouštěči“ sepse (8). Pro vznik imunitní odpovědi je z hlediska chemické stavby molekuly endotoxinu nejdůležitější vnější řetězec polysacharidů, který je značně variabilní a je pro daný druh gramnegativní bakterie vždy

stejný a charakteristický . Skládá se jednak z vnitřní a vnější kůry, ze specifického „O“ řetězce, dvou iontů fosfátu a uridinu.

Působení endotoxinů :

Působení LPS probíhá nepřímo, spočívá ve stimulaci buněk imunitního systému. Kde nejdříve dochází k produkci cytokinů, což jsou látky bílkovinného charakteru, které vedou k destrukcím tkání a vzniku septického šoku.



Obr.č.4: Schematické znázornění struktury a umístění endotoxinu v buněčné stěně gramnegativních bakterií (Přejato: Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, web (9)).

4.3.4. Modifikace lipoproteinů v sepsi

Lipoproteinové částice hrají důležitou roli v přirozené imunitě organismu (2). Během septických stavů dochází ke změnám ve struktuře lipoproteinů a ke změně v jejich kompozici. Tyto jevy jsou způsobeny bakteriálními endotoxiny. Výzkumy dokázaly, že v případě zánětu dochází k změnám v metabolismu lipidů (10). Jejich hodnoty pak závisí na zdravotním stavu jedince. Sepse tak vede k přímému narušení lipidové homeostázy v těle. Konkrétně se jedná o snížení množství cirkulujících HDL a fosfolipidů a naopak zvýšení množství cholesterolu a triacylglycerolů. Tento jev bývá označován jako tzv. alimentární lipémie sepse. Mechanismus lipémie dosud nebyl úplně popsán. Pacienti s vážným zánětem mohou vykazovat hodnoty HDL nižší až o 50% oproti zdravým jedincům.

Ukázalo se ovšem, že v HDL, které v metabolismu lipidů v sepsi hrají zásadní roli dochází i k strukturálním změnám. Sníží se množství Apo A-I (hlavní apoprotein v HDL) a cholesterolu. Zároveň logicky dojde i ke snížení množství enzymů, které jsou s metabolismem HDL spjaty (např. LCAT-lecitincholesterolacyltransferázy). Tyto molekuly jsou nahrazeny fosfolipázou A2 a sérum amyloidem A.

4.3.5. Cytokiny

Cytokiny jsou hormony, které zodpovídají za odpověď daného organismu na infekci. Patří mezi ně např. TNF α (tumor necrosis factor), interleukiny, interferony. Za septický šok je v největší míře odpovědný TNF α . Ten bývá uvolňován z monocytů a makrofágů poté, co přišly do styku s LPS. V tomto případě je produkováno výrazně větší množství než obvykle. Jakmile dojde k potlačení zánětu pomocí některého z mechanismů v návaznosti na to se zmenší množství vylučovaných cytokinů, což vede ke snížení toxicity a ústupu zánětu.

4.4. ÚLOHA HDL LIPOPROTEINŮ BĚHEM SEPSE

Jak už bylo zmíněno, HDL lipoproteiny se významně zánětu účastní. Ze všech lipoproteinových částic jsou při reakci a obraně organismu na již vzniklý zánět nejúčinnější. Ostatní typy lipoproteinů se mohou sice také na stejných reakcích podílet, ale v praxi to není významné **(11)**. Tato skutečnost má souvislost se strukturou HDL, konkrétně množstvím obsaženého Apo A-I, který zde hraje důležitou roli.

HDL lipoproteiny se uplatňují v sepsi hned několika mechanismy

- a) vázání LPS a jeho neutralizace
- b) regulace exprese eNOS (stimulace syntézy)
- c) potlačení exprese adhezních molekul
- d) ochrana LDL proti oxidativní destrukci

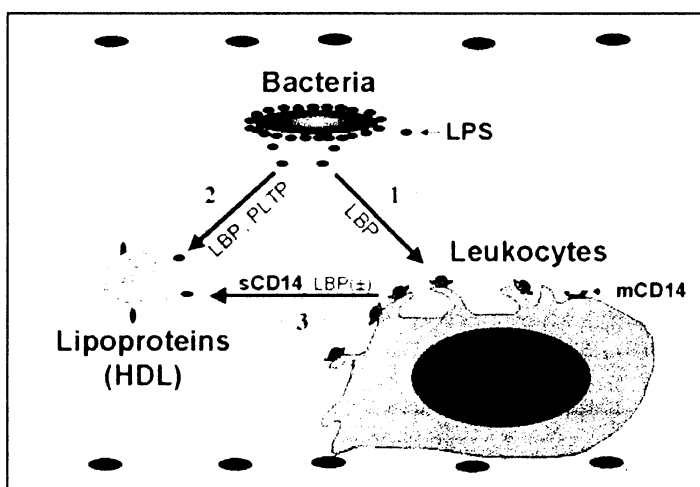
4.4.1. Vázání lipopolysacharidu a jeho neutralizace

HDL lipoproteiny izolované z lidské plazmy jsou schopny vázat a neutralizovat bakteriální lipopolysacharidy, což jsou jedny z nejsilnějších bakteriálních agonistů. Lipopolysacharidy pocházejí z vnější membrány gramnegativních bakterií **(8)**. Tento obranný mechanismus organismu je nejjednodušší a nejlepší způsob, jak snížit množství endotoxinů v krevním oběhu. Probíhá dvěma způsoby: buď jako přímá neutralizace, nebo jako neutralizace nepřímá **(12)** (viz. obr. č. 6). Přičemž míra neutralizace není u všech endotoxinů

stejná, závisí také na jeho druhu a efektivita neutralizace je závislá i na koncentraci endotoxinu a délce jeho působení.

Přímá neutralizace: Lipolysacharidy jsou pomocí LBP (lipid binding protein) jako kofaktoru přeneseny do HDL, kde dochází k jejich neutralizaci. HDL nepůsobí proti destrukci celé buňky bakterie, ale působí přímo na buněčnou stěnu tím, že váže její hlavní složky (což v případě gramnegativní sepse je peptidoglykan a kyselina lipoteichová). Narušením buněčné stěny dojde k degradaci příslušného lipopolysacharidu, celá buňka se deaktivuje, tím se ztrácí schopnost vyvolávat zánět.

Nepřímá neutralizace: Tento typ neutralizace se uplatňuje mnohem častěji než přímá neutralizace, je výrazně rychlejší, pravděpodobnější a účinnější. Nepřímá neutralizace probíhá ve dvou krocích. Nejdříve je LPS transportován k proteinům sCD14 (soluble CD 14), s nímž vytvoří komplex a ten je pak přenesen pomocí LBP do HDL, kde dojde k vlastní neutralizaci. LBP, který hraje opět roli kofaktoru a umožňuje jednak vazbu LPS k sCD 14 tak i přenos (vazbu) komplexu LPS-sCD 14 do HDL. Míra interakce LPS vázaných k LBP s apoproteinem Apo A-I v HDL závisí na koncentraci LBP a také na poměru LPS/LBP **(13)**.



Obr. č.5.: Různý osud LPS v organismu. LPS, které jsou uvolněny z bakteriální membrány se váží buď na leukocyty, čímž je aktivují a vyvolávají příslušnou imunitní reakci, nebo se váží za pomoci LBP a sCD 14 do HDL, které LPS pomocí neutralizačních reakcí degraduje.

(Převzato a upraveno: Kitchens R., Wolfbauer G., Albers J.J., Munford R.S. **(14)**).

Molekuly účastníci se neutralizace a vázání LPS:

sCD 14 (soluble CD14)

Jsou to rozpustné membránové proteiny. Byly nalezeny na povrchu makrofágů, což jsou buňky specializované na fagocytické pohlcování cizorodých částic, např. odumřelých buněk. Jejich funkce v nepřímé neutralizaci spočívá v tom, že zrychlují a ulehčují proces transportu LPS k HDL tím, že nerozpustnou molekulu LPS obalí a poté ji přenáší. Proto se někdy označují jako tzv. „přepravníci“ („shuttle“). Lipoproteiny i sCD 14 jsou také schopny zeslabit účinek cytokinů v monocytech, které se už s LPS vázaly, a tak zeslabit jejich účinek **(14)**. Ihned po přidání LPS se automaticky zvyšuje účinek sCD 14 proteinů .

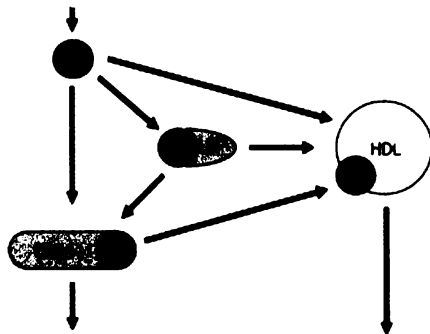
Protein vázající lipidy-LBP (lipid binding protein)

LBP je hlavní sérový protein **(8)**. Transportuje LPS do lipoproteinů, podporuje okamžité navázání LPS na sCD 14 v krevní plazmě, nebo v některých případech na membránové-mCD 14 (**m**embrane-bound CD14), které se vyskytují na buněčné membráně buněk a zajišťuje transport LPS do HDL. Uplatňuje se v přímé i nepřímé neutralizaci. Jeho účinky jsou ovlivňovány i mírou modifikace lipoproteinů během sepse.

Protein transportující fosfolipidy-PLTP (**p**hosfolipid transfer protein)

V krevní plazmě se kromě LBP nachází i další transportní protein, uplatňující se při neutralizaci: PLTP. LBP i PLTP mají sice podobnou strukturu, ale jejich funkce jsou jiné. PLTP má úlohu při reakci buňky na přítomnost LPS a při transportu fosfolipidů mezi lipoproteinovými částicemi, ale není schopen transportovat bakteriální LPS ani k proteinu sCD 14, ani přímo k HDL. Z tohoto důvodu není schopen přímo tlumit zánět. PLTP se kromě transportní funkce uplatňuje ještě při regulaci HDL během zánětu a to tím, že aktivuje přeměnu molekul HDL na menší, čili početnější skupinu molekul. Tím se zvýší účinnost HDL **(15)** .

Průnik LPS do
organismu, sepse



Potlačení zánětlivé odpovědi

NEUTRALIZACE LPS

Obr.č.6: Mechanismus přímé a nepřímé neutralizace LPS pomocí HDL. LPS jsou transportovány do HDL buď přímo (přímá neutralizace) za přítomnosti kofaktoru LBP, nebo nejdříve dochází k navázání na proteiny s CD 14 a až poté dochází k jejich transportu do HDL (nepřímá neutralizace). (Převzato: Murch O., Collin M., Hinds Ch. J. , Thiermann T (3)).

4.4.2. Regulace exprese enzymu eNOS (endoteliální syntázy oxidu dusnatého)

Během sepse je do oběhu uvolněno velké množství různých biologicky aktivních látek. Jedna z velmi důležitých je oxid dusnatý, NO.

Oxid dusnatý , NO

NO je plyn, dobře rozpustný ve vodě. Je známým polutantem, který se nachází např. v cigaretovém kouři, výfukových plynech, atd. NO je produkt a mediátor významný pro funkci cévního endotelu, hlavně v souvislosti s regulací krevního tlaku. Je to endogenní vazodilátor, tzn. že zvyšuje průtok krve v cévách. Za septických stavů je produkovaným několika druhy buněk. NO se může uplatňovat při snížení počtu, nebo zneškodnění bakterií, a tak bránit rozvoji sepse. NO je také schopen z těla vylučovat toxické volné radikály. Ve vyšších koncentracích NO ale už své ochranné vlastnosti proti rozvoji zánětu ztrácí a pro organismus se stává škodlivým. Výrazně zvýšená koncentrace NO je pro organismus dokonce

toxická, neboť vede k zúžení cév a následné hypotenzi, poruchám orgánů, až jejich dysfunkci. **(16,17)**

K syntéze NO v organismu dochází z guanidinové skupiny aminokyseliny L-argininu pomocí enzymu, syntázy oxidu dusnatého-NOS (**nitric oxide synthase**) **(18)**.

NOS se vyskytuje ve třech různých izoformách. Jedná se o endoteliální, neuronovou a indukovanou NOS, lišících se zejména funkcí a místem syntézy.

1) **endoteliální-eNOS**, nachází se v endotelu, tj. buňkách vystylajících vnitřní povrch krevních a lymfatických cév. Funkce NO tvořeného endoteliálními buňkami jsou- schopnost zabraňovat adhezi monocytů k cévnímu endotelu, schopnost snižovat množství prozánětlivých mediátorů a podpora vazodilace **(19)**. Pravděpodobně také brání oxidaci lipoproteinů **(20)**. HDL přispívají k ochraně proti rozvinutí sepse tím, že zvyšují aktivitu eNOS v endoteliálních buňkách, což podporuje produkci NO. Děje se tak vázáním apoA-I, pocházejícího z HDL k čistícímu receptoru prvního typu, SR-BI (**scavenger receptor type I**).

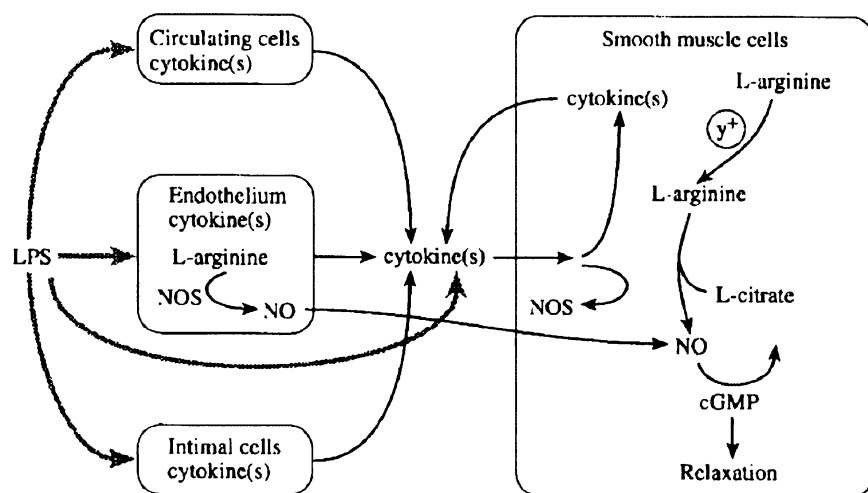
2) **neuronová-nNOS**, nachází se v mozku a jí vytvořený NO patří mezi neurotransmitery.

3) **indukovaná-iNOS**. Syntéza tohoto enzymu v organismu (na rozdíl od syntézy eNOS a nNOS) probíhá pouze ve výjimečných stavech, jako např. v případě sepse. Produkce iNOS je v organismu vyvolána přítomností TNF α , interleukinem IL-1, LPS, případně faktoru aktivujícího krevní destičky-PAF (**platelet-activating factor**) pocházejících z endotoxinů. Tyto látky působí jako katalyzátory pro indukci iNOS **(21)**. Za normálního (zdravého) stavu se iNOS v organismu nevyskytuje. Její syntéza v orgánech a tkáních, kde probíhá zánětlivý proces vede ke vzniku nadměrných koncentrací NO. Ty jsou pro organismus toxické a dochází tak k rozvoji a podpoře septického stavu. K syntéze iNOS nedochází ihned, ale až v pokročilejší fázi sepse. iNOS je tedy zároveň i indikátorem zhoršujícího se septického stavu pacienta. Zvýšené množství NO ve tkáních způsobí, že dojde ke snížení krevního tlaku (hypotenzi) a poškození orgánů končící až jejich disfunkcí. Nejvíce postižena bývají játra.

NO a oxidační stres

Oxidační stres je jeden z činitelů vyvolávajících patologické procesy v organismu. Je pravděpodobně zodpovědný za fatální poškození buněk a jejich následné odumírání (\rightarrow což vede až k destrukci tkáně). Narušuje také aktivitu NOS v buňkách jaterního endotelu. Oxidační stres je vyvolán nerovnováhou mezi tvorbou a odstraňováním produktů oxidačních dějů. V organismu tak dochází k patologickému zvýšení hladiny volných kyslíkových radikálů, což jsou toxické bioaktivní formy kyslíku, jako např. radikál superoxidový- O_2^- ,

hydroxilový- OH^\cdot , peroxidový- H_2O_2 . Jejich vlivem dochází většinou ke kaskádovitém oxidačním reakcím, které mají za důsledek poškození a destrukci celých buněk, buněčných organel a jejich enzymových systémů (22). Kromě uvedených funkcí je NO také schopen vychytávat z těla toxické kyslíkaté radikály. Okamžitě s nimi reaguje a deaktivuje je. To způsobí ztrátu negativních biologické aktivit těchto radikálů. Vlivem toxických látek dochází také k poškození epitelu. Se zvyšujícím se množstvím toxických látek v organismu dochází k nárůstu oxidačního stresu a to může způsobit např. různé vaskulární poruchy.



Obr.č.7: Proces tvorby NO v endoteliálních buňkách. NO produkuje enzym NOS. NO se vytváří v organismu z molekul argininu. Celý proces je ovlivněn cytokiny nacházejícími se v organismu. (Převzato a upraveno: Parrat J.R, (18)).

HDL a zvýšení produkce eNOS

HDL lipoproteiny jsou schopny vyvolat zvýšenou produkci eNOS. Interakce mezi HDL a čistícím receptorem třídy b, prvního typu: SR-BI indukuje expresi a zvyšuje fosforylaci eNOS. HDL tedy částečně přispívají ke zvýšení eNOS v organismu, což by mohlo za septického stavu být velmi výhodné, protože zvýšená produkce eNOS snižuje adhezi monocytů k endoteliálním buňkám a jejich následnému proniknutí do tkání a jejich degradaci. Zvýšená produkce eNOS také vede k ochraně endoteliálních buněk a ty tak neztrácí svou vazoreaktivitu, což udržuje plynulost krevního toku. eNOS je tak enzymem, který hraje zásadní roli v sepsi a je důležitý pro vyléčení a záchranu pacienta. .

Adheze monocytů k cévnímu endotelu je jeden z nejrannějších dějů při zánětu. Četné výzkumy dokázaly, že HDL lipoproteiny nachází uplatnění i v tomto ději a jsou schopny do něj významně zasáhnout. Konkrétně se jedná o jejich schopnost inhibovat expresi adhezních molekul v endoteliálních buňkách, která je vyvolána cytokiny. Výsledkem pak může být i úplná eliminace zánětlivého procesu.

Endoteliální buňky

Endoteliální buňky, které jsou zodpovědné za aktivaci a expresi adhezních molekul tvoří jednoduchou buněčnou vrstvu vystylající vnitřek cév. Jejich strukturní a funkční celistvost je velmi důležitá pro udržení homeostázy cévní stěny a krevní cirkulace. Endoteliální buňky slouží jako semipermeabilní membrána, která kontroluje přenos malých i velkých molekul do stěny cév a dále přes stěnu kapilár. Intercelulární spoje jsou obvykle v organismu nepropustné pro tyto molekuly, ale relativně nesoudržné spoje mezi endotelovými buňkami se mohou rozšířit vlivem např. krevního tlaku. Dále modulují cévní tonus a průtok krve, regulují imunitní a zánětlivé reakce působením na interakci mezi stěnou cévy a leukocyty a modifikují lipoproteiny ve stěně arterie. Endotel reguluje zánětlivé a imunitní procesy tím, že aktivuje a ovlivňuje množství vyloučených adhezních molekul, interleukinů. Dysfunkce endotelu vede k poruše relaxace cév, podporuje agregaci destiček, zvyšuje proliferaci cévní hladké svaloviny a adhezi leukocytů k povrchu endotelových buněk. Dochází k expresi povrchových adhezních molekul, usnadňujících zachycení cirkulujících leukocytů. Adheze leukocytů společně s proliferací hladké svaloviny jsou klíčovými momenty rozvinutí sepse, neboť leukocyty ztrácejí v organismu svou ochrannou imunitní funkci. Mediátory zánětu jsou cytokiny, oxidované LDL **(23)**.

Adhezní molekuly a zánět

Během sepse se na povrchu endoteliálních buněk tvořících cévní stěnu objevují (cyto)adhezní molekuly (**CAM**) produkované endotelem. CAM molekuly umožňují leukocytům zachytit se na cévní stěně, konkrétně na vnitřní monovrstvě endoteliálních buněk a popřípadně poté i proniknou cévní stěnou do intravenózního prostoru. Mezi adhezní molekuly se řadí: selektiny, ICAM-1 (**i**nter**c**ellular **a**dhesion **m**olecule), VCAM-1 (**v**ascular **c**ell **a**dhesion **m**olecule). Produkce CAM je stimulována bakteriálními mikroby. CAM se nacházejí pouze v místech arteriálního řečiště, kde došlo k nějakému poškození cévní stěny. Poškození může mít různou příčinu a endotel na něj v jeho místě reaguje tvorbou těchto

specifických molekul. CAM jsou odpovědné za adhezi, migraci a akumulaci monocytů a T- lymfocytů (= druh leukocytů). Leukocyty mají schopnost přilnout k různým povrchům. Tato vlastnost se označuje jako adhezivita a v sepsi má velký, i když negativní význam. Adheze je zprostředkována interakcí mezi cytoadhezními molekulami a endoteliálními buňkami. Adhezní molekuly jsou rapidně syntetizovány endotelem jako odpověď na přítomné cytokiny a regulují celou adhezi. Tento proces probíhá tak, že nejdříve dojde k uvolnění chemotaktické molekuly, kterou zachytí (pomocí specifického receptoru) volně putující leukocyt v krevním oběhu. Adhezní molekuly prvně zpomalí průchodu neutrofilů (tj. neutrofilních leukocytů) cévami, a tím zvýší možnost zachycení na povrchu cévy v blízkosti ložiska zánětu navozeného infekcí. Endotelové buňky v tomto místě exprimují adhezní molekuly- selektiny. Jak neutrofil postupuje po podlaží selektinů, část selektinů vazbu uvolňuje, zatímco následující řada je opět zachycuje. Takto neutrofil po endotelu „roluje“. Dochází k nahromadění migrujících neutrofilů v ložisku zánětu. Neutrofil pak po povrchu cévní stěny „krauluje“, až se dostanou ke štěrbině mezi dvěma sousedními endotelovými buňkami. Tam se mohou na základě diapedeze protáhnout do pojivové tkáně, a tak se dostanou do interceluárního prostoru. Po adhezi k endotelu, popř. po diapedezi leukocyty ztrácí svou biologickou funkci, což je v organismu velice nežádoucí proces, který negativně ovlivňuje celý imunitní systém, protože ten je tvořený právě leukocyty. Skutečnost, že CAM umožňují leukocytům zachytit se a proniknout cévní stěnou do zánětlivého ložiska je klíčový mechanismus celého zánětlivého procesu a snahou organismu je tento děj potlačit, aby k němu vůbec nedocházelo. Tohoto úkolu se zhošťují právě HDL lipoproteiny. Výzkumy ukázaly, že HDL částice jsou schopny zabránit expresi adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1) vyvolanou cytokiny. Z toho důvodu potom k adhezi leukocytů vůbec nemůže docházet, leukocyty tak neztrácejí svou funkci a zůstávají aktivní, a jsou tedy organismem ihned využity k eliminaci, potlačení a zneškodnění zánětu. HDL tak přímo brání zánětu, protože blokuje jeho nejrannější fázi a zánět se tak vůbec nerozvine. Výzkumy dokázaly, že při posouzení schopnosti HDL inhibovat expresi adhezních molekul jsou lipoproteiny HDL₃ účinnější než HDL₂. Podmínkou pro uplatnění této funkce HDL částic je, aby jejich koncentrace v plazmě nebyla nějakým způsobem snížena. V procesu se uplatňují jak molekuly nativních HDL částic, tak i molekuly rHDL.

HDL také mohou zabránit přilnutí neutrofilů a jejich migraci, přesídlení. Tak je možno předcházet zánětu s možnou následnou orgánovou dysfunkcí **(24)**. Tento mechanismus se uplatňuje při likvidaci bakterií způsobené lokální infekcí. Na rozvoji zánětu se tedy podílí

endoteliální buňky , leukocyty a všechny protizánětlivé mediátory, jako např. TNF α , interleukiny.

4.4.4. Úloha HDL v ochraně LDL částic před oxidačním poškozením

Schopnost HDL lipoproteinů chránit LDL částice proti jejich oxidačnímu poškození je jedním z dalších a nedávno popsáným uplatněním HDL částic v mechanismu boje proti zánětu. Schopnost chránit LDL má velký význam zejména při prevenci, popř. obraně organismu proti aterosklerotickým změnám **(25)** vedoucím ke kardiovaskulárnímu onemocnění. Částice HDL jsou schopny zamezit přímo nebo nepřímo vzniku a rozvoji patologických aterosklerotických procesů tím, že chrání LDL lipoproteiny před oxidací **(26)**. Tuto schopnost dávají HDL dva enzymy, které jsou s nimi asociovány. Jedná se o paraoxonázu– PON a acetylhydrolázu faktoru aktivujícího krevní destičky-PAF- AH.

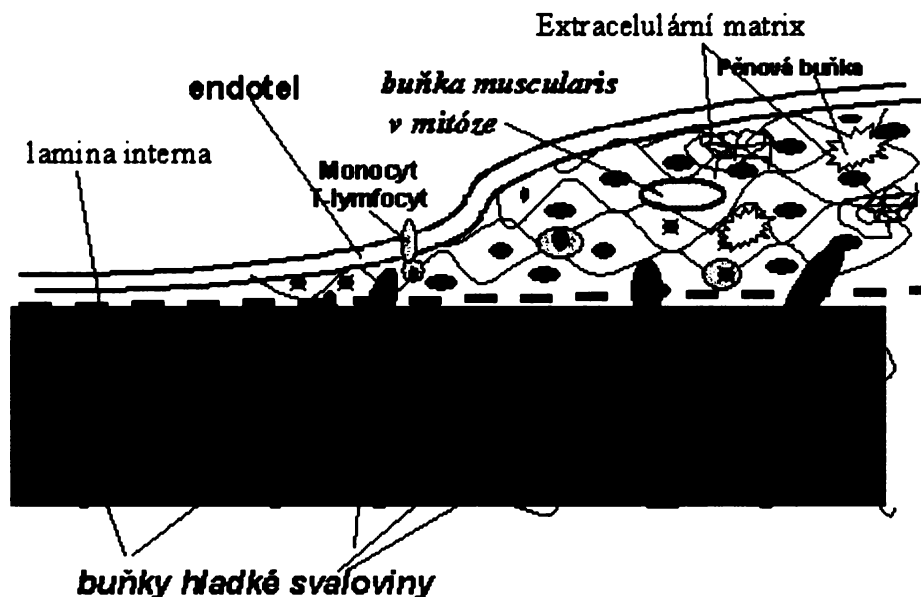
Ateroskleróza a její průběh

Ateroskleróza představuje v organismu dlouhodobý, chorobný proces postihující stěny cév. Způsobuje jejich postupné zužování (viz.obr.č.8), přičemž tato situace může vést až k úplnému ucpaní tepny. Nebezpečí spočívá v tom, že tkáně a orgány nejsou zásobeny živinami, a tak odumírají.

LDL jsou hlavní lipoproteiny, které v plazmě přenášejí cholesterol. Každá molekula LDL nese několik tisíc molekul cholesterolu. I když je cholesterol ve větší míře škodlivý, v určité koncentraci (0,6-1,5mmol/l) je však pro správnou funkci buněk nezbytný. Ty si ho v případě potřeby vychytávají z plazmy. Při aterogenezi a hlavně její iniciaci hrají jednu z klíčových rolí oxidované LDL částice . Ty jsou pro organismus toxické a silně aterogenní **(14)**, neboť nejsou z plazmy vychytávány LDL receptory jako „běžné“ LDL, což má za následek zvyšování hladiny cholesterolu a vzniku ateromových plátů (plaků), které se usazují v intimě cév a postupně způsobují zmenšení průřezu cév až jejich ucpaní. Vznik plaků je právě první krok rozvoje aterosklerotického onemocnění. Samotný oxidační proces způsobují volné (kyslíkové) radikály. Tyto radikály jsou charakterizovány nepárovými elektrony. V přítomnosti kyslíku se na místo nepárového elektronu okamžitě naváže molekula kyslíku a vzniká peroxylový radikál, který se snaží získat z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál **(27)**. Při tomto procesu dochází k poškození okolních molekul jako jsou buněčné nukleové kyseliny, bílkoviny a lipidy. Střetem volného radikálu s lipidem se spustí celá řada destruktivních reakcí, které ničí membrány a vedou k desintegraci buněk.

Tato řetězová reakce je přerušena buď vazbou dvou radikálů na sebe, nebo reakcí s antioxidantem. K oxidaci dochází ve stěně cév při interakci LDL s monocyty, makrofágy, endoteliálními buňkami, buňkami hladkého svalstva. Oxidace pravděpodobně neprobíhá v krevní plazmě proto, že se v ní nachází poměrně velké množství antioxidantů na rozdíl od arteriální stěny, kde snadněji vzniká i oxidační stres (28). Zásadní nebezpečnost oxidovaných LDL částic spočívá v tom, že dokáží proniknout přes vrstvu tepenné stěny, a tak mohou svůj cholesterol uložit na povrchovou vrstvu cévy, což vede k postupnému zmenšování jejího průřezu. Oxidované LDL částice jsou pohlceny makrofágy fagocytosou. Dochází zde k ukládání LDL, včetně jejich cholesterolu, a tak ke vzniku pěnových buněk. Ty migrují mezi endoteliální buňky, kde dochází k další akumulaci lipidů za vzniku tzv. lipidových proužků (29). Následkem popsaného sledu dějů je ateroskleróza, což je vážná civilizační choroba, zodpovědná až za 50% úmrtí (srdeční infarkt, mozková mrtvice).

Na rozdíl od LDL, HDL lipoproteiny nesou mnohem méně cholesterolu a jsou schopny přebytečný cholesterol odvádět do jater, kde je katabolizován. HDL tak brání hromadění cholesterolu. HDL tak lze označit za protipól k oxidovaným molekulám LDL (prozánětlivé vs. protizánětlivé) (30).



Obr.č.8: Schéma ztlušťování stěny artérie v průběhu aterogeneze (Převzato a upraveno: Masopust J., (29)).

Mechanismus, kterým HDL lipoproteiny brání oxidaci LDL

Jak už bylo zmíněno výše, za ochranu LDL před oxidací pomocí HDL jsou odpovědné enzymy k HDL přidružené: PON a PAF-AH.

Paraoxonáza - PON

Řadí se do skupiny esteráz. Tato skupina zahrnuje isoformy PON1, PON2, PON3, které mají podobnou strukturu i funkci **(31)**.

PON1- je to esterhydroláza s antiaterogenními účinky, jejíž přesná fyziologická funkce není dosud známa. Principem, jak paraoxonáza chrání LDL před oxidací, je hydrolýza prozánětlivých oxidovaných esterů cholesterolu a fosfolipidů, čili jejich destrukce **(32)**. Je možné, že toto je i její vlastní primární funkce. Aktivita PON1 v plazmě značně snižuje pravděpodobnost rozvoje kardiovaskulárních chorob.

Hydroperoxydy lipidů mimo jiné také snižují produkci NO, který se též podílí na obraně organismu před zánětlivými stavy. (viz kapitola NO). Hladina PON1 v těle závisí na celé řadě situací od enviromentálních po vliv cytokinů a statinů. PON1 je dále také schopna ovlivňovat oxidační stav makrofágů. Exogenní PON1 je schopna eliminovat oxidační stres v makrofázích. Pokud je deficit hladiny PON1, projeví se to zvýšením oxidačního stresu.

Oxidace lipidů je jednou z příčin cévního zánětu a je pravděpodobnější, že lipoperoxidaci dojde v případě, že v organismu probíhá zánětlivý proces. Zvýšená hladina peroxidovaných lipidů a oxidovaných LDL částic byla např. potvrzena u leukocytů pacientů s revmatoidní artritidou .

PON3 – je enzym s biologickou aktivitou velmi podobnou jako PON1 s tím rozdílem, že jeho aktivita není regulována oxidovanými lipidy **(33)**. PON3, podobně jako PON1, je primárně lokalizována ve frakcích HDL v plazmě. Primárním místem syntézy jsou játra, což poskytuje místo pro „vlození“ PON proteinů do molekul nascentních HDL částic. PON3 se vylučuje do plazmy a může se účastnit prevence proti oxidaci LDL. Účinek PON3, společně s PON1 přispívá k antiaterogenním vlastnostem HDL. HDL díky paraoxonáze tak hrají důležitou roli jako antioxidant potlačující oxidaci fosfolipidů a snižují aktivitu oxidačně už poznamenaných LDL částic. I některé další složky HDL k jejich antioxidační funkci přispívají. Kromě zmíněných enzymů je to např. hlavní složka HDL - apo A1. Apo A1 je schopen sám o sobě také snižovat vznik peroxidů v LDL. Význam PON2, PON3 izoenzymů paraoxonázy v ateroskleróze je potřeba ještě dále studovat, aby mohly být potvrzena jejich přesná funkce.

Faktor aktivující krevní destičky-PAF- AH

Je to protein sestávající z 441 aminokyselin, je syntetizován játry a následně sekretován do plazmy, kde ihned dochází k jeho navázání na lipoproteinové částice. Je to enzym, který je v těle přidružen k LDL i HDL. V případě výskytu u HDL má významně protizánětlivé a antioxidantní účinky. Asociace k LDL je sice větší (z důvodu, že je tento enzym více přidružený k ApoB, který je hlavní složkou LDL), ale jestliže v organismu začne probíhat zánětlivý proces, zvyšuje se aktivita PAF – AH přidruženého k HDL. Jeho funkce je v plazmě hydrolyzovat PAF, což je prozánětlivý fosfolipid, který je v těle během zánětu produkován aktivovanými krevními destičkami, leukocyty, endoteliálními buňkami. Kromě PAF je schopný degradovat i oxidované LDL. Přes všechny protiaterogenní vlastnosti se v poslední době objevila i domněnka, že za určitých podmínek může PAF-AH přispívat k zvýšení oxidačního stresu, a tím aterosklerózu podporovat. Zatím ovšem není dostatek vědeckých důkazů, aby se toto zjištění mohlo považovat za prokázané

PAF-AH se uplatňuje i v boji proti septickému šoku. Pacienti v sepsi mají v krvi nižší hladinu PAF-AH a prodlužuje se délka „života“ PAF **(34)**. I přes všechny tyto poznatky se zatím nepovedlo léčit septický šok u lidí pomocí omezení aktivity PAF, i když některé výsledky na zvířecích modelech jsou velmi nadějně. Další uplatnění PAF bylo dokázáno v případě anafalytického šoku. Pokud k němu v organismu dojde, objeví se zvýšená hladina PAF. Krom toho za těchto podmínek také dochází ke zvýšené oxidaci LDL, což je spojeno s patogenezi anafalytického šoku. Četnými pokusy bylo jasně dokázáno, že PAF- AH je protizánětlivý marker u septického šoku a astmatu. Dále je možné, že tento enzym hraje „dvojroli“ v patogenezi aterosklerózy (jednak ochrání funkce před rozvinutím aterosklerózy a současně možnost podporovat rozvoj oxidačního stresu). Tyto informace jsou však zatím spíše teoretické. K tomu, aby mohly být prokázány s konečnou platností, a tak určena přesná funkce PAF- AH, je nezbytná řada dalších experimentů a klinických studií.

5. Závěr

Na základě vědeckých výzkumů bylo dokázáno, že vedle transportní úlohy mají HDL lipoproteiny také důležitou funkci v ochraně organismu před rozvinutím sepse. Postupně byly objeveny čtyři mechanismy, kterými jsou HDL částice schopny se v sepsi uplatňovat: vázání lipolysacharidu a jeho neutralizace, regulace exprese syntézy enzymu syntázy oxidu dusnatého, potlačení exprese adhezních molekul a ochrana LDL částic proti jejich oxidativní destrukci. Všechny tyto mechanismy byly prokázány u HDL částic syntetizovaných v organismu. Při septickém šoku se však hladina HDL výrazně snižuje, a tím dochází ke snížení této přirozené ochrany organismu proti rozvoji sepse. Jedním z cílů farmaceutického výzkumu je tyto ztráty v těle nahradit. Nadějnou cestou se zdá využití uměle syntetizovaných, tzv. rekonstituovaných HDL částic (rHDL). Výzkumy dokázaly, že tyto částice se v organismu chovají stejně, jako nativní HDL, jsou metabolicky odbouratelné, nejsou rozpoznávány retikuloendoteliálním systémem jako cizorodé molekuly a organismus proti nim nesyntetizuje žádné protilátky. Přestože jejich využití v klinické praxi vyžaduje další výzkumy, jeví se jako dobrá a bezpečná alternativa přirozeně syntetizovaných HDL částic.

6. Seznam použité literatury

- 1) Murray R., Granner D.K., Mayes P., Rodwell V.W. Harperova biochemie, kap.transport lipidů a jejich ukládání, s.262-289, 2.české vydání, vydavatelství H&H,1998, ISBN:80-85787-38-5.
- 2) Novák F. Úvod do klinické biochemie, kap.transport lipidů, s.188-195, Karolinum, Praha 2002, ISBN:80-246-0366-7.
- 3) Murch O., Collin M., Hinds Ch. J.,Thiermann T. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic Science. Intensive Care Med, 33:13–24, 2007.
- 4) Hanke I., Vomela J. Nové poznatky v léčbě sepse a septického šoku. Bulletin HPB, 5: 4-7, 1997.
- 5) Annane D.,Bellissant E., Bollaert P.E., Briegel J., Keh D., Kupfer Y. Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. BMJ, 329:480-484, 2004.
- 6) Kitchens R., Wolfbauer G., Albers J.J., Munford R.S. Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. J Biol Chem, 274:34116-34122, 1999.
- 7) Levine D.M., Parker T.S., Donnetelly T.M., Walsh A., Rubin A.L. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A, 90:12040-12044, 1993.
- 8) Kitchens R.,Thompson P., Munford R., O'Keefe G. Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid level and enhance lipopolysaccharide binding to plazma lipoproteins. J Lipid Res, 44:2339-2348, 2003.
- 9) Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, web <http://www.zuova.cz/informace/nrlpab09.php>
- 10) Hudgins L.C., Parker T.S., Levine D.M.,Gordon B. R., Saal S.D., Jiang X.C., Seidman C.E, Tremaroli J.D., Lai J., Rubin A.L. A single intravenous dose of endotoxin rapidly alters serum lipoproteins and lipid transfer proteins in normal volunteers. J Lipid Res, 44:1489-1498, 2003.
- 11) Pajkrt D., Doran J.E., Koster F., Lerch P.G., Arnet B., Pool T., Cate J.W., Deventer S.J.H. Antiinflammatory effect of reconstituted high density lipoprotein during human endotoxemia. Isr J Exp Med, 184:1601-1608, 1996.
- 12) Wurfel M.M., Hailman E., Wright S.D. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide by lipopolysaccharide-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. Isr J Exp Med, 181:1743-1754, 1995.

- 13) Mossamiri T., Tobias P.S, Curtiss L. K. Structural determinants for the interaction of lipopolysaccharide binding protein with purified high density lipoproteins: role of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res*, 38:516-525, 1997.
- 14) Kitchens R., Wolfbauer G., Albers J.J., Munford R.S. Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *J Biol Chem*, 274:34116-34122, 1999.
- 15) Hailman E., Albers J.J., Wolfbauer G., Tu A., Wright S. D. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem*, 271:12172-12178, 1996.
- 16) Hickey M.J., Sharkey K.A., Sihota E.G., Reinhardt P.H., Macking J.D., Nathan C., Kubes P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J*, 11:955-964, 1997.
- 17) Cuzzocrea S., Chatterjee P.K., Mazzon E., Dugo L., De Sarro A., Van de Loo F., A., Caputi A.P., Thiemermann C. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. *Shock*, 18:169-176, 2002.
- 18) Parratt J.R. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother*, 41:31-39, 1998.
- 19) Wu A., Hinds Ch., J., Thiermann Ch. High density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions and therapeutic applications. *Shock*, 21:210-221, 2004.
- 20) Gong M., Wilson M., Kelly T., Su W., Dressman J., Kincer J., Matveev S.V., Guo L., Guerin T., Li X.A., Zhu W., Uittenbogaard A., Smart E.J. HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI dependent manner. *J Clin Invest*, 111:1579-1587, 2003.
- 21) Szabó C., Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz*, 3:2-32, 1995.
- 22) Ondruš J., Antioxidanty a oxidativní stres u kojenců a novorozenců, web <http://ultrajan.webpark.cz/pedia/antiox/antiox.htm>
- 23) Masopust J. *Klinická biochemie Karolinum*, Praha 1998, ISBN:80-7184-648-1 web https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/13710_1049.html.
- 24) Cockerill G.W., Rye K.A., Gamble J.R., Vadas M.A., Barter P.J., High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cells adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15:1987-1994, 1995.
- 25) Barter P.J., Nicholls S., Rye K.A., Anantharamaiah G.M., Navab M., Fogelman A.M. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*, 95:764-772, 2004.
- 26) Mackness M.I., Durrington P.N., Mackness B. How high density lipoproteins protects against the effect of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol*, 11:383-388, 2000.

- 27)** Holeček V. Volné radikály a antioxidanty, celostní medicína, web <http://www.celostnimedicina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm>
- 28)** Karaa A., Kamoun W. S. and Clemens M. G., Oxidative stress disrupts nitric oxide synthase activation in liver endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 39:1320-1331, 2005.
- 29)** Masopust J. Patobiochemie buňky, 2.lékařská fakulta UK Praha., 2003 ISBN:80-239-1011-0, web https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1387.html
- 30)** Hayek T., Oiknine J., Dankner G., Brook J., Aviram M. HDL apolipoprotein A-I attenuates oxidative modification of low density lipoprotein:studies in transgenic mice.*Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 33:721-725, 1995.
- 31)** Getz G.S., Reardon C.A. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme:continuing issues. *Curr Opin Lipidol*, 15:261-267, 2004.
- 32)** Rozenberg O., Rosenblat M., Coleman R., Shih D.M., Aviram M. Paraoxonase deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med*, 34:774-784, 2003.
- 33)** Reddy S.T., Wadleigh D.J., Grijalva V., Ng C., Hama S., Gangopadhyay A., Shih D. M., Lusic A. J., Navab M., Fogelman A.M. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21:542-547, 2001.
- 34)** Karasawa K. Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta*, 1761:1359-1372, 2006.