

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Pavel Vyroubal**

**2011**

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program  
**Vnitřní nemoci**

**Role cholesterolu, prekursorů jeho biosyntézy a oxidačních  
produktů u klinicky závažných stavů**

**MUDr.Pavel Vyroubal**

Školitel: Prof. MUDr. Zdeněk Zadák, CSc.

Hradec Králové, 2011

Obhajoba dne: .....  
(doplň studijní odd.)

## **Příloha č. 2**

### **Prohlášení autora**

---

#### **Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

**Hradec Králové, ..... 2011**

---

## Poděkování:

Největší poděkování patří mému školiteli Prof.MUDr.Zdeňku Zadákovi, který mne, coby zkušeného klinika, přivedl na cestu vědy a experimentu. Snad nepadla jeho snaha vnívat a snad alespoň zrnko té snahy vyklíčí v úrodné půdě a vzejde z něho dospělá rostlina. Naučil mne se dívat na věci nejasné kritickým pohledem a snažil se mi předat své mnohaleté zkušenosti na poli vědy a výzkumu.

Děkuji MUDr.Radkovi Hyšplerovi PhD a RNDr.Aleně Tiché PhD za jejich neskonalou ochotu a spolupráci při zpracovávání vzorků, jejich utřídění a statistickém zpracování. Děkuji jim za jejich odborné rady týkající se problematiky metabolismu sterolů, se kterou mají tak bohaté zkušenosti.

V neposlední řadě musím poděkovat svým klinickým spolupracovníkům a kamarádům MUDr.Jaroslavu Cermanovi PhD, MUDr.Eduardu Hlavlovi PhD z chirurgické kliniky, bez jejichž spolupráce bych nebyl schopen sestavit celou kohortu nemocných s polytraumaty. Stejně tak patří moje poděkování MUDr.Jindřichovi Samkovi, který se podílel na výběru a ošetřování kardiochirurgických nemocných zařazených do této práce.

Za přínosnou spolupráci děkuji také všem pracovníkům výzkumné laboratoře Gerontologické a metabolické kliniky FN Hradec Králové, zejména paní laborantce Ivě Svobodové.

Poděkování patří i přednostovi Gerontologické a metabolické kliniky FN Hradec Králové panu Prof.MUDr.Luboši Sobotkovi CSc. za to, že mi umožnil podílet se na výzkumném projektu a jeho publikaci a že mi byl jedním z prvních oponentů.

Veliký dík patří i mojí rodině, zvláště pak mé ženě MUDr.Ireně Vyroubalové, která trpělivě snášela mé poklesy nálady v době, kdy se nedařilo, která vždycky trpělivě vyslechla mé nářky coby výzkumníka-vědce-začátečníka a která mi dávala jistotu zázemí, lásky a péče.

## Seznam zkratek

|                   |   |
|-------------------|---|
| ABC               | ATP-binding cassette                              |
| ACAT              | acetyl koenzym A acetyltransferáza                |
| ACC               | acetyl koenzym A karboxyláza                      |
| ACP               | acyl carrier protein                              |
| ACTH              | adrenokortikotropní hormon                        |
| cAMP              | cyklický adenosinmonofostát                       |
| AMPK              | adenosin monofosfát aktivovaná proteinová kináza  |
| APACHE II         | acute physiology and chronic health evaluation II |
| AP1               | aktivační protein 1                               |
| ATP               | adenosintrifosfát                                 |
| apo A-I           | apolipoprotein A-I                                |
| apo A-II          | apolipoprotein A-II                               |
| apo A-IV          | apolipoprotein A-IV                               |
| apo B-100         | apolipoprotein B-100                              |
| apo B-48          | apolipoprotein B-48                               |
| apo C-I           | apolipoprotein C-I                                |
| apo C-II          | apolipoprotein C-II                               |
| apo C-III         | apolipoprotein C-III                              |
| apo E             | apolipoprotein E                                  |
| apo F             | apolipoprotein F                                  |
| apo G             | apolipoprotein G                                  |
| BMI               | body mass index                                   |
| CD-36             | cluster of differentiation 36                     |
| CETP              | cholesterolester transfer protein                 |
| CRP               | C reaktivní protein                               |
| CYP 7a-1          | cholesterol 7a-hydroxyláza                        |
| CYP-27            | cholesterol 27 hydroxyláza                        |
| DHAP              | dihydroxyaceton fosfát                            |
| DM II. typu       | diabetes mellitus II. typu                        |
| ELISA             | enzyme linked immunosorbent assay                 |
| FABP              | fatty acid binding protein                        |
| FAS               | fatty acid syntháza                               |
| FAT/CD36          | fatty acid translocase CD36                       |
| FATP              | fatty acid transport protein                      |
| GRE               | glucocorticoid response element                   |
| HDL               | lipoproteiny o vysoké hustotě                     |
| HKT               | hematokrit  |
| HLP               | hyperlipoproteinemie                              |
| HMG CoA-reduktáza | 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktáza    |
| HSL               | hormon senzitivní lipáza                          |
| ID                | inkorporace deuteria                              |
| IDL               | lipoproteiny o intermediární hustotě              |

|         |  |
|---------|--|
| ICHS    | ischemická choroba srdeční                   |
| IL-1, 6 | interleukin 1, 6                             |
| Insig   | insulin regulated protein                    |
| KAKT    | karnitin acylkarnitin translokáza            |
| KAT     | karnitin acyltransferáza                     |
| LCAT    | lecithin cholesterol acyltrasferáza          |
| LBP     | lipopolysacharid binding protein             |
| LDL     | lipoproteiny o nízké hustotě                 |
| LPIN1   | lipin 1 gen                                  |
| LPL     | lipoproteinová lipáza                        |
| LPS     | Lipopolysacharid                             |
| LXR     | liver X receptor                             |
| MIDA    | mass isotopomer distribution analysis        |
| MK      | mastné kyseliny                              |
| NADPH   | nikotinamid adenin dinukleotid fosfát        |
| NF- κB  | nukleárního faktoru κB                       |
| NISS    | new injury severity score                    |
| NPC1L1  | Niemann-Pick C1 like 1 protein               |
| PAP1    | fosfatidát fosfohydroláza 1                  |
| PPARα   | peroxisome proliferator activated receptor α |
| PPARγ   | peroxisome proliferator activated receptor γ |
| PPI-1   | fosfoprotein fosfatáza inhibitor 1           |
| ROS     | reactive oxygen species                      |
| SCAP    | SREBP cleavage activating protein            |
| SHH gen | Sonitz-Hedge-Hog gen                         |
| SIRS    | systemic inflammatory response syndrom       |
| SR-BI   | scavenger receptor class B type I            |
| SREBP   | sterol regulatory element binding protein    |
| SSD     | sterol-sensing domain                        |
| TAG     | triacylglyceroly                             |
| TC      | total cholesterol                            |
| TP      | total protein                                |
| TNF-α   | tumor necrosis factor α                      |
| VLDL    | lipoproteiny o velmi nízké hustotě           |

## Obsah

|  |          |
|--|----------|
| 1. Úvod  | str. 2   |
| 2. Teoretická část                                     | str. 4   |
| 2.1 Plasmatické lipidy rozdělení                       | str. 4   |
| 2.2 Cholesterol  | str. 7   |
| 2.3 Metody stanovení cholesterolové syntézy a absorpce | str. 14  |
| 2.4 Necholesterolové steroly                           | str. 16  |
| 2.5 Mastné kyseliny a triacylglyceroly                 | str. 18  |
| 2.6 Mechanismy vzniku porucha metabolismu lipidů       | str. 24  |
| 2.7 Možné klinické důsledky poruch metabolismu lipidů  | str. 28  |
| 3. Cíl disertační práce                                | str. 31  |
| 4. Materiál a metody                                   | str. 32  |
| 4.1 Charakteristika souboru                            | str. 32  |
| 4.2 Vylučující kritéria                                | str. 34  |
| 4.3 Odběrový protokol                                  | str. 34  |
| 4.4 Použité analytické metody                          | str. 36  |
| 4.5 Statistika   | str. 38  |
| 5. Výsledky  | str. 39  |
| 6. Diskuse   | str. 84  |
| 7. Závěr   | str. 95  |
| 8. Seznam literatury                                   | str. 96  |
| 9. Seznam publikační a přednáškové aktivity            | str. 111 |

# 1. Úvod

Cholesterol je ústředním tématem zájmu vědeckého a farmaceutického výzkumu. V posledních desetiletích je cholesterol skloňován ve všech pádech především ve vztahu hypercholesterolemie a akcelerované aterosklerozy.

Řada epidemiologických studií potvrzuje nastolený trend snahy snižovat koncentrace plasmatického cholesterolu v rámci snížení rizika rozvoje kardiovaskulárních chorob. Zatím co v minulé dekádě se považovala za optimální plasmatickou koncentraci celkového cholesterolu hodnota kolem 6,0 mmol/l, nyní se za optimální koncentraci považuje hodnota 5,2 mmol/l a pro nemocné se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem 4,5 mmol/l [1]. Všechna tato doporučení vyplývají z velkých intervenčních studií. Nicméně stále není zcela jasné, jaká je normální koncentrace cholesterolu u zdravého člověka. Zdá se, že tato hodnota bude závislá na více činitelích, jako na etnické skupině, věku, geografické oblasti apod. U primitivních lidských populací, izolovaných od civilizovaného světa, se pohybuje koncentrace celkového cholesterolu v plasmě kolem 3,0 – 4,0 mmol/L [2]. V tomto světle se jeví hypocholesterolemie spíše jako prospěšný fenomen.

Zcela odlišná situace však nastává v okamžiku, je-li organismus vystaven stresové zátěži. První zprávy o hypocholesterolemii u těžce nemocných pocházejí z počátku minulého století, nicméně teprve v posledních desetiletích se pozornost systematicky obrací k tomuto tématu a jeho vztahu k abnormálním typům cirkulujících lipoproteinů. Ukazuje se, že hypocholesterolemie je důležitým prognostickým ukazatelem zvýšené morbidity a mortality souvisejícím s celým spektrem patologických stavů. V situaci stresové zátěže organismu (trauma, operace, záněť apod) lze předpokládat zvýšené nároky na přísun lipidů obecně (cholesterolu, triacylglycerolů, fosfolipidů) a to jak z pohledu reparativních buněčných procesů (zde je cholesterol základním stavebním kamenem buněčné stěny), tak z pohledu produkce hormonů, cytokinů a jiných působků produkovaných v rámci univerzální zánětlivé odpovědi organismu a v neposlední řadě i z pohledu potřeby nutričního substrátu. Současně v řadě medicínských situací chybí možnost zvýšeného přísunu lipidů cestou jejich absorpce z potravy, neboť tato cesta je u kriticky nemocných velmi často vyloučena.

Tomuto tématu je věnováno nepoměrně méně pozornosti, přestože klinické důsledky závažné hypocholesterolemie mohou být významné. V minulosti bylo doloženo u řady závažných onemocnění jako jsou infekce, popáleniny či úrazy, že v průběhu zvýšené zátěže

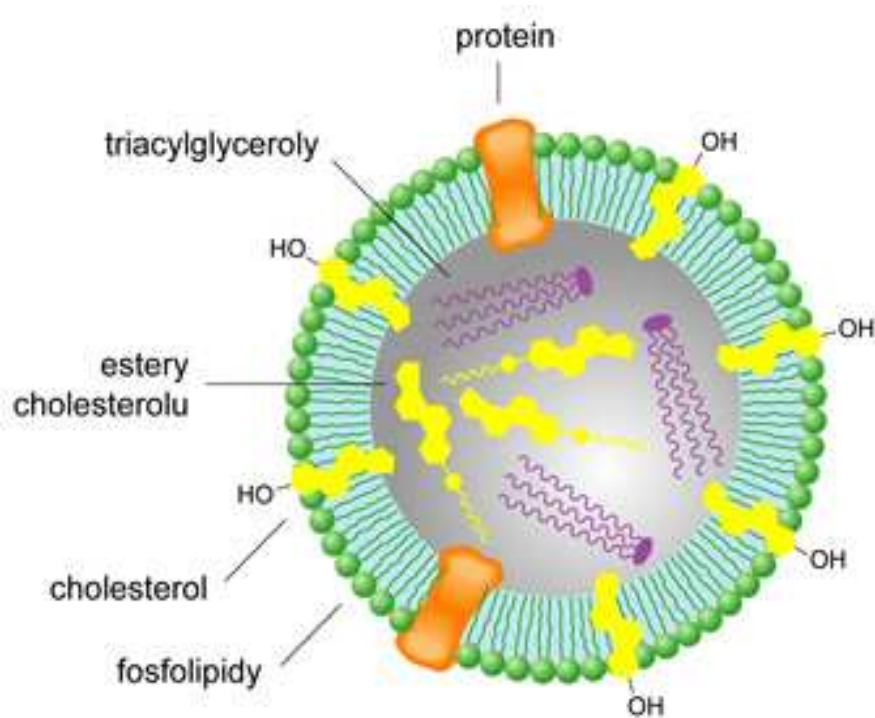


organismu dochází k poklesu plasmatické koncentrace cholesterolu [3-8]. Závažná hypocholesterolemie se stává zajímavým prognostickým ukazatelem morbidity a mortality především kriticky nemocných [9-12]. Není však dosud detailně známo, jakými mechanismy dochází k poklesu plasmatické koncentrace cholesterolu. Také otázka zda nízká koncentrace cholesterolu je pouze epifenomenem závažných stavů nebo sehrává aktivní roli ve vývoji onemocnění nebyla doposud přesvědčivě zodpovězena. K pochopení mechanismu změny hladin plasmatických lipidů je zapotřebí porozumět jejich metabolické cestě v organismu a také porozumět jejich funkci v organismu.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Plasmatické lipoproteiny – rozdělení

Lipidy představují heterogenní skupinu lipofilních látek jejichž základní charakteristikou je nerozpustnost ve vodě. K tomu, aby bylo možné transportovat plasmatické lipidy z místa jejich vstřebání či syntézy do míst jejich katabolismu ve vodném prostředí plasmy, jsou tyto částice navázány na bílkovinný nosič. U některých polárních lipidů, jako jsou neesterifikované mastné kyseliny nebo lysolecithin, je transportní bílkovinou albumin, u jiných (např. u retinolu) specifický transportní protein  $\alpha$  globulin vázající retinol. U nepolárních lipidů se transport uskutečňuje pomocí velkých makromolekulových komplexů – lipoproteinů, jejichž kostru (která není pouhou pasivní složkou) tvoří apolipoproteiny. Základní stavební uspořádání lipoproteinových partikulí je univerzální. Nepolární jádro (tvořené triacylglyceroly, estery cholesterolu) je obklopeno monovrstvou polárních lipidů a apolipoproteinů. Některé abnormální lipoproteiny jsou uspořádány jako dvojvrstva, tzv. lamelární částice, které zaujímají diskoidní nebo vezikulární tvar.



Obr. č. 1 Schematické uspořádání lipoproteinu (převzato z [www.vydavatelstvi.vscht.cz](http://www.vydavatelstvi.vscht.cz))

Heterogenní systém lipoproteinů krevní plasmy lze třídit z různých hledisek a různými analytickými metodami.

**a) na základě hydratované hustoty v preparativní analytické ultracentrifuze**

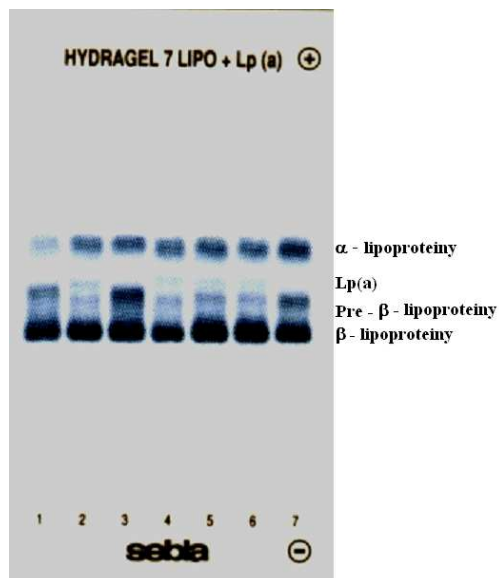
- 1) chylomikrony (0,94 g/ml)
- 2) lipoproteiny o velmi nízké hustotě = VLDL (0,95 – 1,006 g/ml)
- 3) lipoproteiny o intermediární hustotě = IDL (1,006 – 1,019 g/ml)
- 4) lipoproteiny o nízké hustotě = LDL (1,019 – 1,063 g/ml)
- 5) lipoproteiny o vysoké hustotě – HDL
  - podtřída HDL2 (1,063 – 1,125 g/ml)
  - podtřída HDL3 (1,125 – 1,210 g/ml)

**b) na základě elektroforezy v agarozovém gelu v barbiturátovém pufru o pH 8,6**

- $\alpha$ 1-lipoprotein
- pre- $\beta$ -lipoprotein
- $\beta$  lipoprotein
- chylomikrony

**c) pomocí imunochemických metod s použitím specifických protilátek proti**

**bílkovinným složkám** lze imunologicky rozlišit apolipoproteiny (apoA, apoB, apoC, apoD, apoE, apoF, apoG)



Obr. č. 2 – Elektroforeza lipoproteinů (převzato z [www.vydavatelstvi.vscht.cz](http://www.vydavatelstvi.vscht.cz))

Lipoproteinové částice podléhají během své cesty plasmou čilému metabolickému obratu s výměnou různých substancí mezi jednotlivými partikulami. Zde je potřeba připomenout, jak důležitou úlohu sehrává bílkovinná složka apolipoprotein. Základní funkcí apoproteinu je schopnost vázat lipidy a tím vytvářet polydisperzní částice rozpustné ve vodném prostředí plasmy. Apolipoproteiny mají však další neméně důležité vlastnosti, bez nichž by nebyl uskutečnitelný metabolismus lipidů. Jednak se apolipoproteiny účastní regulace metabolismu plasmatických lipidů jako kofaktory enzymů účinných v lipoproteinovém metabolismu, jednak zprostředkovávají vazbu lipoproteinových částí na specifické receptory a v neposlední řadě se účastní přenosu nebo výměny lipidových částic mezi jednotlivými lipoproteiny. Přehled vlastností a funkcí některých apolipoproteinů přináší tabulka č. 1.

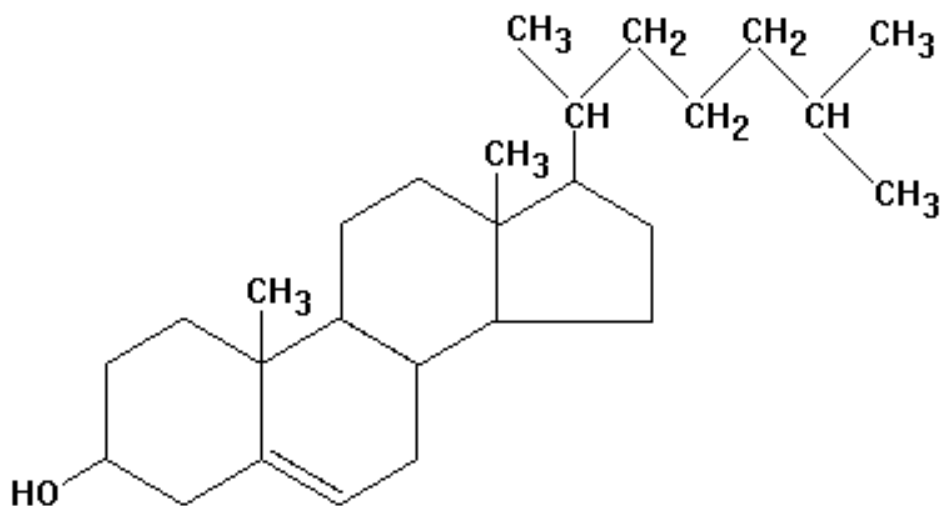
| apolipoprotein | místo tvorby             | součást třídy lipoproteinů                 | molekulová hmotnost | funkce  |
|----------------|--------------------------|--|---------------------|---|
| apo A-I        | střevo, játra            | chylomikrony (7%)<br>HDL (64%)             | 28300               | aktivátor LCAT, strukturální protein HDL<br>reverzní transport cholesterolu |
| apo A-II       | střevo, játra            | chylomikrony<br>HDL (20%)                  | 17400               | inhibitor LCAT, aktivátor jaterní lipázy<br>strukturální protein HDL        |
| apo A-IV       | střevo                   | chylomikrony<br>HDL                        | 46000               | transport chylomikronů, triglyceridů  |
| apo B-100      | játra                    | VLDL (36%)<br>LDL (95%)                    | 550000              | strukturální protein<br>vazba na specifický membránový<br>receptor          |
| apo B-48       | střevo                   | chylomikrony                               | 264000              | strukturální protein, vazba na receptor ?                                   |
| apo C-I        | játra                    | chylomikrony (11%)<br>VLDL (3%), HDL (6%)  | 6300                | aktivátor LCAT  |
| apo C-II       | játra                    | chylomikrony (15%)<br>VLDL (7%), HDL (1%)  | 8800                | aktivátor lipoproteinové lipázy   |
| apo C-III      | játra                    | chylomikrony (41%)<br>VLDL (40%), HDL (4%) | 8750                | inhibitor lipoproteinové lipázy<br>vychytávání chylomikronových zbytků      |
| apo E          | játra,<br>periferní tkáň | chylomikrony<br>VLDL (13%), HDL (2%)       | 35000               | strukturální protein, vazba na receptory<br>clearens IDL                    |

Tab. č. 1 – charakteristika a funkce apolipoproteinů

Jak bude dále uvedeno, při změnách metabolismu u nemocných v kritickém stavu může být narušen metabolismus apolipoproteinů, a tím může docházet ke změnám v metabolismu vlastních lipoproteinů.

## 2.2 Cholesterol

Cholesterol je esenciální komponentou prakticky všech fosfolipidových membrán lidského organismu, kde plní nejen úlohu membránové kostry, ale ovlivňuje také její propustnost a metabolickou aktivitu. Jeho snížená dostupnost může vést k narušení reparačních procesů poškozených buněčných membrán, funkčním poruchám receptorů a buněčných kanálů. Cholesterol je zcela nezbytný pro zachování fluidity membrán, její sterické a chemické struktury a v neposlední řadě zachování její permeability. Kromě toho je cholesterol strukturální komponentou lipoproteinů a prekurzorem steroidních hormonů (glukokortikoidy, mineralokortikoidy, pohlavní hormony) a žlučových kyselin.



Obr. č 3 Molekula cholesterolu

Cholesterol se vyskytuje jednak volný a jednak ve formě esterů cholesterolu a mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Volný cholesterol je součástí buněčných membrán. V plasmě je přítomen z jedné třetiny volný cholesterol a ze dvou třetin ve formě esterů kyseliny linoleové a kyseliny olejové [13]. V některých buňkách jsou intracelulární zásoby cholesterolu tvořeny z jeho esterů s kyselinou olejovou, kyselinou palmitovou a kyselinou linolenovou. Obecně se cholesterol dostává do organismu jednak z vnějšího prostředí vstřebáním ze zažívacího traktu a jednak je syntetizován de novo z acetyl CoA.

Za normálních okolností je získávána část potřebného množství cholesterolu z potravy. Z ní se uvolňuje ve formě volného cholesterolu a jeho esterů, které se hydrolyzují na volný cholesterol a záhy po vstřebání se stávají součástí chylomikronů.. Absorbce cholesterolu je komplexní proces probíhající v tenkém střevě, který je zprostředkovaný specifickými přenašeči kartáčového lemu enterocytů v jejunu. Množství vstřebaného cholesterolu je do jisté míry závislé na obsahu cholesterolu v potravě a jeho efektivita se pohybuje v rozmezí 50-60%. Touto cestou se může vstřebat kolem 250 – 500 mg cholesterolu za den. Rozhodujícím transporterem pro cholesterol je Niemann-Pick C1 like 1 protein – NPC1L1 [14], který je přítomen v kartáčovém lemu enterocytů. Předpokládá se, že v populaci je přítomen značný polymorfismus těchto proteinů, které tak mohou modifikovat množství absorbovaného cholesterolu z potravy [15]. V experimentálním zvířecím modelu myši s knock-outovaným genem pro tento protein (bez NPC1L1) došlo k významné redukci (> 90%) absorbce cholesterolu [16] ze střeva. Tento protein je cílovým místem pro široce používaný inhibitor absorbce cholesterolu ezetimib a pravděpodobně nedokáže rozlišovat mezi cholesterolem a strukturou se podobajícími fytosteroly. Princip exprese NPC1L1 zatím není zcela jasný, nicméně se zdá, že vlastní množství cholesterolu v potravě může ovlivňovat míru jeho exprese, tak jak bylo prokázáno v experimentu na zvířecím modelu myši živených dietou obohacenou o cholesterol [17]. Kromě výše zmíněného přímého inhibitoru absorbce ezetimibu existuje řada dalších látek ovlivňujících absorpci cholesterolu prostřednictvím inhibice exprese NPC1L1. Mezi ně patří hypolipidemika typu fenofibrátů, které prostřednictvím aktivace peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) vedou k inhibici exprese NPC1L1 a tím zprostředkovaně ke snížení absorbce cholesterolu [18]. Na kartáčovém lemu enterocytů jsou exprimovány další intestinální lipidové transportery patřící do skupiny ATP-binding cassette (ABC) označované jako G5 a G8 [19] nebo membránové molekuly SR-BI [16], CD-36 [20] a aminopeptidasa N [21]. U části z nich není jejich role v procesu vstřebávání cholesterolu dostatečně objasněna. Molekuly ABC G 5,8 jsou také exprimovány na biliárním polu hepatocytů, kde umožňují transport cholesterolu (ale také fytosterolů) z hepatocytů do žluči. Mutace v ABC G5,8 vede k sitosterolemii, vzácné chorobě, která je provázena vysokými hladinami fytosterolů v organismu a která je spojena s časným rozvojem aterosklerozy.

Absorbovaný cholesterol z diety se stává po vstřebání součástí chylomikronů, které se tvoří v Golgiho aparátu enterocytů tenkého střeva. Podmínkou k sekreci chylomikronů z cisteren Golgiho aparátu je přítomnost apoproteinu B48 (apoB48). Chylomikrony jsou po vstupu do krevního kapilárního řečiště ihned hydrolyzovány působením endotelové

lipoproteinové lipázy (LPL) za vzniku chylomikronových zbytků (chylomicron remnants), které jsou směřovány do jater. Receptorem pro chylomikronové zbytky je tzv. protein příbuzný LDL-receptoru (LDL receptor related protein). Specifickým ligandem je apoE. Během hydrolyzy chylomikronů dochází k uvolňování mastných kyselin (MK). Některé složky chylomikronů (apoA-I, apoA-II, apoC a fosfolipidy) jsou přenášeny na částice HDL, zatímco jiné složky (apoE a cholesterol) jsou přenášeny z HDL na chylomikrony. Chylomikronové zbytky, obsahující apoB48 a apoE, jsou vychytávány svými receptory v játrech. Aktivita chylomikronových receptorů klesá s věkem. Chylomikronové zbytky jsou menší velikosti a po ztrátě triacylglycerolu jsou procentualně bohatší na cholesterol a jeho estery. Cholesterol je v plasmě transportován hlavně v esterifikované formě v lipoproteinech.

Jaterní cholesterolový pool vznikající z chylomikronových remnant (dietní cholesterol) a „de novo“ syntetizovaný cholesterol je sloučený s bílkovinnou kostrou apoproteinů a je vylučovaný v podobě VLDL lipoproteinů. Syntéza VLDL lipoproteinů v játrech je regulována parciálně dietou a hormony a je bržděna vychytáváním chylomikronových zbytků v játrech. Intravaskulárně se VLDL lipoproteiny působením endotelové lipoproteinové lipázy (za účasti apoC-II jako kofaktoru) přemění na LDL lipoprotein (hydrolyzou triacylglycerolů) a tyto partikule jsou následně důležitým zdrojem cholesterolu pro mnoho tkání, speciálně těch, které podstupují rychlé dělení [20]. Hlavní bílkovinnou komponentou LDL lipoproteinů je apoB100, který je zásadní z hlediska rozpoznání partikulí LDL receptorem. LDL lipoproteiny jsou katabolizovány buď cestou LDL membránových receptorů (takto jsou vychytány 2/3 cholesterolu obsaženého v LDL), nebo cestou tzv. scavenger receptorů, které jsou exprimovány na polymorfonukleárních leukocytech a jejich exprese není řízena intracelulárním množstvím sterolů. Po vazbě na membránový receptor (její trvání je 5-7 min) je LDL partikule internalizována do buňky a dále metabolizována. Některé typy buněk (většinou steroidogenní a jaterní) jsou také schopné získat estery cholesterolu z HDL partikulí použitím specifických povrchových receptorů – scavenger receptory třídy B typu I (SR-BI) [22].

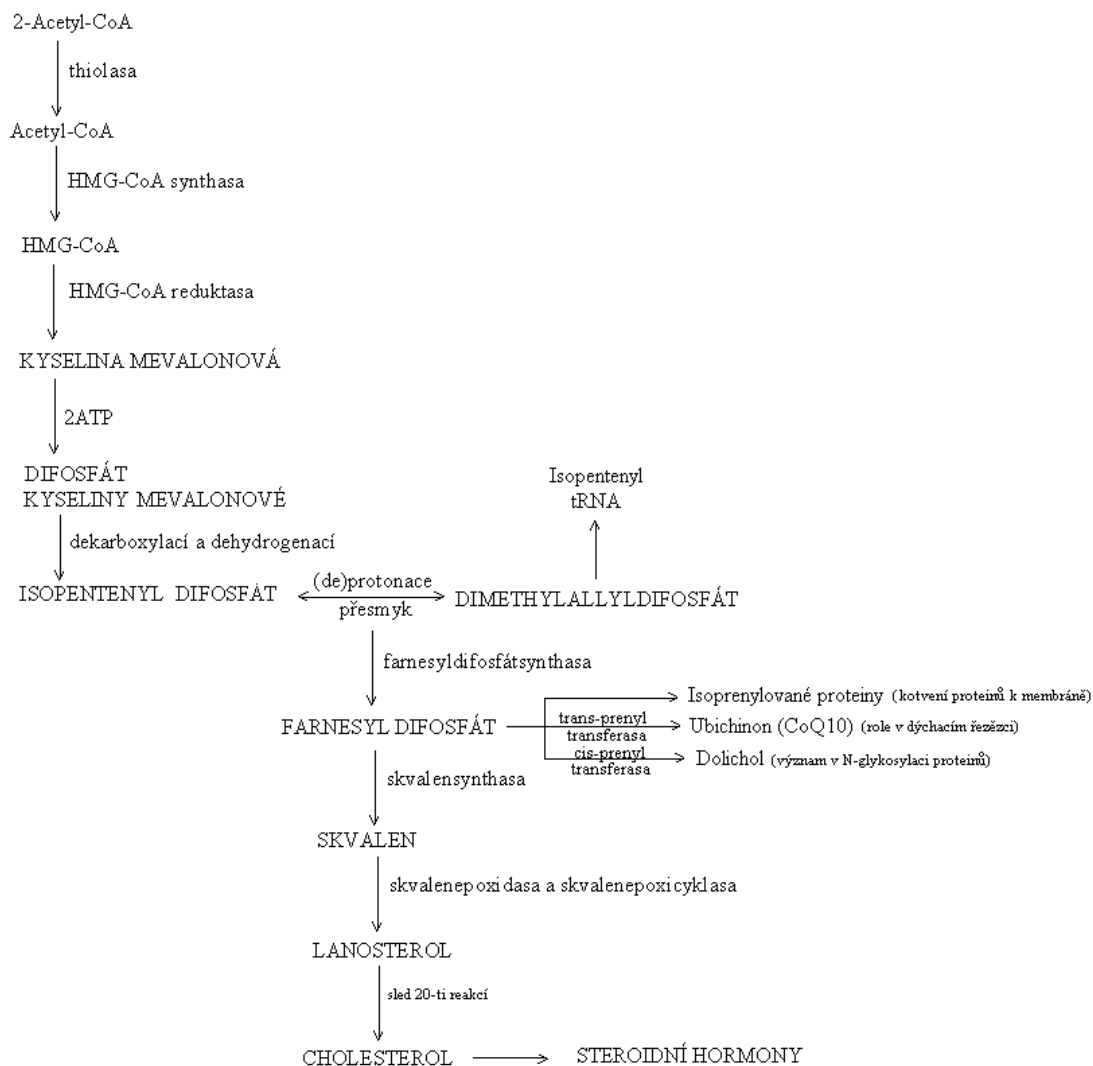
Jako reverzní cholesterolový transport se označuje transport cholesterolu z extrahepatických tkání do jater. Volný (neesterifikovaný) cholesterol vytéká k extracelulárnímu příjemci, z nichž jsou nejvýznamnější fosfolipid/APO A-I disky (pre- $\beta$ -HDL). Tento proces je přímo (či nepřímo přes fosfolipidový odtok) závislý na funkčnosti ABC A1 receptoru, který umožňuje přestup cholesterolu z buňky do lipoproteinové částice [23]. Cholesterol, který je spojený s APO-AI/fosfolipidovými disky, je substrátem pro lecithin-cholesterol acyl transferázu (LCAT). LCAT přenáší mastné acylové řetězce z

fosfatidylcholinu na cholesterol, čímž se vytváří estery cholesterolu. Estery cholesterolu se zabudovávají do hydrofobního jádra lipoproteinů, čímž tvoří sférické HDL partikule. Tyto partikule pak mohou doručit estery cholesterolu do jater a steroidogenních tkání [23]. Navíc během transportu může být cholesterol přenesen také do LDL a VLDL prostřednictvím cholesterolester transfer proteinu (CETP). Kromě toho je známo, že HDL lipoproteiny mají ještě další komplexnější účinky jako je inhibice peroxidace lipidů, snížení viskozity plasmy, aktivace fibrinolýzy, regulace syntézy prostaglandinů a tromboxanů, stimulace NO syntázy a inhibice apoptózy. Navíc, jak bude rozvedeno dále, se HDL lipoproteiny účastní na vazbě a neutralizaci lipopolysacharidů (LPS) při bakteriálních infektech.

Za fyziologických okolností syntéza cholesterolu de novo několikanásobně převyšuje absorpci cholesterolu z potravy. Syntetizovat cholesterol de novo dokáže, kromě bezjaderných erytrocytů, každá buňka lidského těla, nejaktivnější syntéza cholesterolu je však v hepatocytech, kůře nadledvin, kůži a enterocytech. Produkt je obvykle vyhrazený k intracelulárnímu využití. Cholesterol vytvářený pro plasmatické lipoproteiny (dodatečný zdroj pro více typů buněk) je syntetizován de novo v játrech a v distální části tenkého střeva [24].

Cholesterolová syntéza se uskutečňuje mimo mitochondrie v cytoplasmě (až do skvalenu - uhlovodíkový prekurzor) a endoplasmatickém retikulu (cyklisace skvalenu a následující kroky). Klíčovým regulačním enzymem je 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktáza (HMG CoA-reduktáza). Tento enzym je nejenom všeobecně známým cílovým objektem pro farmakologické inhibitory – statiny, ale zároveň je komplexně hormonálně regulován prostřednictvím fosforylace/defosforylace (zprostředkováno hormon senzitivní cAMP). Inzulin a hormony štítné žlázy jeho aktivitu zvyšují, glukagon a glukokortikoidy naopak jeho aktivitu snižují. Kompletní biosyntéza cholesterolu je velice komplikovaný děj čítající kolem 200 enzymatických procesů (viz obr. č.4), a tak není překvapující, že vyšší organismy na vrcholu potravního řetězce využívají cholesterol syntetizovaný nižšími organismy. Tímto způsobem šetří náklady vynaložené na velice komplikovaný a energeticky náročný proces syntézy cholesterolu. A také proto mnohé tkáně preferují cholesterol z plasmatických lipoproteinů před jejich intracelulární syntézou. Z tohoto pohledu se zdá být logické, že syntéza cholesterolu probíhá, pro jeho energetickou náročnost, především mezi 2 a 4 hodinou ranní čili v době fyzické inaktivity organismu. Maximální syntéza cholesterolu u zdravých lidí bývá v rozmezí 500 – 1000 mg/den.





Obrázek č.4 Syntéza cholesterolu (převzato z Chugh A et al, 2003)

Prekurzorem cholesterolové syntézy je hydroxymethylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA), který se vytváří kondenzací acetyl-CoA a acetacetyl-CoA. Reakce je katalyzována HMG-CoA syntásou. Následně působením HMG-CoA reduktázy vzniká mevalonát. Akcelerátorem této reakce je nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH). A právě přeměna HMG-CoA na mevalonát za účasti HMG-CoA reduktázy se jeví jako jedno z klíčkových míst v syntéze nejenom cholesterolu. Další důležitou fází v syntéze cholesterolu je přeměna mevalonátu za pomoci fosforylace, při které vzniká několik fosforylovaných meziproduktů a po dekarboxylaci vzniká aktivní jednotka isoprenu isopentenylpyrofosfát. Ten představuje první látku z celé řady dalších meziproduktů, které nazýváme isopreny. Kondenzací isoprenů vzniká postupně přes geranyl pyrofosfát a farnesylpyrofosfát skvalen.

Skvalen se mění na lanosterol, který je již vybaven steroidním jádrem. Nakonec se lanosterol úpravou steroidního jádra i postranního řetězce mění na finální produkt cholesterol.

Stabilní hladiny cholesterolu v lidském těle a plasmě jsou udržovány díky důmyslnému systému regulace jeho syntézy v buňce a jeho vstupu do buňky z plasmy. Jak již bylo zmíněno, klíčovým enzymem v složité cestě biosyntézy cholesterolu je HMG-CoA reductáza. Zpětnovazebná inhibice HMG-CoA reductázy, genová exprese a rychlost její enzymatické degradace souvisí s intracelulárním obsahem sterolů. Proteolytická regulace HMG-CoA reductázy je zprostředkována existencí sterol-sensing domain (SSD) uložené v endoplasmatickém retikulu. V případě intracelulárního nárůstu koncentrace sterolů dochází k zvýšení degradace HMG-CoA reductázy mechanismem její fosforylace. Fosforylace je zprostředkována enzymem AMP-aktivovanou proteinovou kinázou (AMPK), která ho fosforyluje a tím inaktivuje. Vlastním regulačním nástrojem je samotný cholesterol. Naopak v případě nedostatku intracelulárního cholesterolu je cestou signálního systému cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) aktivována cAMP-dependentní proteinová kináza (PKA), která ovlivňuje fosfoprotein fosfatáza inhibitor 1 (PPI-1) ve smyslu jeho aktivace. Ten pak inhibuje aktivitu HMG-CoA reductáza fosfatázy. Ta je klíčovým enzymem pro defosforylaci HMG-CoA reductázy a tím i její zvýšené aktivity. Jak již bylo zmíněno výše, proces fosforylace a defosforylace je ovlivňován hormonálně cestou cAMP, což může mít v situaci kriticky nemocného velký význam. Inzulin a hormony štítné žlázy aktivitu cAMP zvyšují, glukagon a glukokortikoidy naopak aktivitu cAMP snižují. Intracelulární obsah sterolů je dále regulován prostřednictvím aktivity LDL receptorů na povrchu buněk. Zjednodušeně lze říci, že intracelulární hladina sterolů ovlivňuje uroveň aktivity enzymatického systému a transkripce LDL receptorů.

V celém zmíněném procesu regulace cholesterolu sehrávají klíčovou roli regulační proteiny endoplasmatického retikula SREBP (sterol regulatory element binding protein) a CSAP (SREBP cleavage activating protein) [25]. Systém je aktivován odštěpením C-terminální jednotky SREBP, která reaguje s proteinem SCAP. Komplex je přenesen do jádra buňky, kde reguluje expresi genů řídících tvorbu enzymů nezbytných pro syntézu cholesterolu, počet receptorů LDL na membránách, umožňujících transport cholesterolu do buňky, a snad také tvorbu specifického přenašeče ABC-A1 (ATP-Binding Cassette – A1), který je nutný pro přenos cholesterolu z buněk a jeho vazbu na částice HDL. Spojení C-terminální jednotky SREBP s proteinem SCAP je inhibováno insulin regulated proteinem (Insig). Je-li intracelulárně dostatek sterolů jsou SREBP i SCAP zadržovány v endoplasmatickém retikulu díky SCAP-Insig vazbě. Při nedostatku intracelulárních sterolů

SREBP-SCAP komplex migruje do Golgiho aparátu a tam se SREBP štěpí na aktivní formu [26] a zahajuje celou kaskádu pochodů mířících k syntéze cholesterolu.

Existuje několik forem SREBP, forma 1 a 2. SREBP-1 je exprimován v játrech a tukové tkáni a jeho aktivita je regulována inzulinem. Aktivace SREBP-2 je regulována hladinou cholesterolu v buňce. Aktivace SREBP-2 při poklesu cytosolové koncentrace cholesterolu vede ke zvýšení exprese genu LDL-receptoru (ligandem jsou apoproteiny B-100 a E) a tvorbě enzymů nezbytných pro syntézu cholesterolu.

Nejvýznamnější vylučovací cestou cholesterolu z těla je tvorba žluči. Za jeden den tak může být odstraněno asi 500 mg cholesterolu, zbytek cholesterolu (přibližně stejné množství) je odstraněn cestou neutrálních steroidů. Cholesterol je na jedné straně substrátem pro tvorbu žlučových kyselin a na druhé straně je sám vylučován žlučí. Existují dvě hlavní cesty tvorby žlučových kyselin – neutrální (klasická), při které se tvoří primární žlučové kyseliny cholová a chenodeoxycholová, a „kyselá“ (alternativní). V neutrální nebo také klasické cestě začíná syntéza hydroxylací molekuly cholesterolu v  $7\alpha$  pozici cestou mikrosomální cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylázy (CYP  $7\alpha$ -1). V kyselé nebo také alternativní cestě jsou žlučové kyseliny hydroxylovány v pozici 27 cestou cholesterol 27 hydroxylázy (CYP-27) [27]. Vrozená chyba v CYP  $7\alpha$ -1 cestě se projevuje hypercholesterolemickým fenotypem a rezistencí na cholesterol snižující léky. CYP 27 deficit je odpovědný za těžký klinický obraz charakterizovaný neurologickým postižením a akcelerovanou aterosklerózou. Samotný cholesterol je také vylučován do žluči v podobě micel, které se vytvářejí společně s lecitem a žlučovými kyselinami. Vlastní žlučové kyseliny jsou v játrech konjugovány s taurinem nebo glycinem. Žluč je skladována ve žlučníku a po příjmu potravy je exkretována do střevního lumen. Zde za působení střevních bakterií dochází ke změně žlučových kyselin na sekundární žlučové kyseliny – deoxycholovou a lithocholovou. Nekonjugované žlučové kyseliny jsou zpětně resorbovány hned ve žlučových cestách v rámci tzv. cholehepatálního oběhu. Konjugované žlučové kyseliny jsou v rámci enterohepatálního oběhu na konci terminálního ilea zpětně resorbovány a transportovány zpět do jater. Játra jsou proto hlavním místem tvorby a odstraňování cholesterolu.

## 2.3 Metody stanovení cholesterolové syntézy a absorpce

Vzhledem k tomu, že syntéza endogenního cholesterolu, jeho vstřebávání z potravy a jeho odstraňování je velice dynamický děj, je k pochopení změn v rámci chorobného stavu zapotřebí přesné stanovení míry jeho syntézy i podílu vstřebaného cholesterolu na celkové plasmatické hladině. K tomuto účelu lze využít sofistikované laboratorní metody.

V zásadě existují dvě metody měření syntézy cholesterolu. Jedna z nich je přímá a druhá nepřímá. Principem těchto technik je kvantitativní stanovení (in vivo nebo ex vivo) substrátu vstupujícího do biosyntézy cholesterolu nebo stanovení koncentrace intermediálních produktů biosyntetické cesty.

Jednou z možných cest je stanovení bilance sterolů pomocí výpočtu rozdílu mezi přijatým a vyloučeným cholesterolem (měřeno jako odpad cholesterolu a žlučových sterolů ve stolici) [28]. Základní podmínkou přesnosti této metody je dosažení dlouhodobého vyrovnaného metabolického stavu, zejména ve vnitřních sterolových poolech. Dosažení takového vyrovnaného stavu může trvat jeden týden, ale také jeden měsíc. Proto tato metoda není vhodná k měření syntézy cholesterolu u nestabilních nemocných (kriticky nemocný, po úrazu, velkých operacích apod). Navíc přesnost této metody je závislá na precizním sběru stolice a přesném stanovení příjmu cholesterolu.

Jinou metodou je stanovení hladiny prekurzorů cholesterolové syntézy. Takto lze stanovovat

- a) kyselinu mevalonovou v séru a v 24hodin sbírané moči [29]
- b) isopren ve vydechovaném vzduchu [30]
- c) koncentraci prekurzorů syntézy cholesterolu (skvalen, lathosterol) v krevní plasmě nebo žluči [31,32].

Plasmatické koncentrace prekurzorů cholesterolové syntézy poměrně přesně odpovídají relativní rychlosti syntézy cholesterolu, a to i během krátkých časových období. Některé z vyšetřovaných substrátů (isopren, kyselina mevalonová, skvalen) však vykazují cirkadiální kolísání, což vnáší do interpretace výsledků jistou nepřesnost [31]. Tuto zjevnou nevýhodu metody lze částečně odstranit zvýšením četnosti odběrů vzorků.

Další možností stanovení cholesterolové syntézy je inkorporace značených látek do sterolu. Jednou z možností je stanovení *ex vivo* aktivity  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA reduktázy po inkorporaci  $^{13}\text{C}$  nebo  $^{14}\text{C}$  značeného acetátu do sterolů nebo jejich lipofilních

prekursorů. Tento postup může být proveden na hepatocytech odebraných pomocí jaterní biopsie (omezením této metody je vlastní chirurgický výkon) nebo s cirkulujícími mononukleárními leukocyty, jejichž chování je však obtížně předvídatelné.

V úvahu přicházejí rovněž kinetické studie využívající aplikaci  $^{13}\text{C}$  nebo  $^{14}\text{C}$  značeného cholesterolu do oběhu, čímž je umožněno sledování značené látky v lipoproteinech i ve tkáních [33, 34]. Tímto způsobem lze získat informace o velikost poolu, distribuci a rychlosti syntézy cholesterolu. Bohužel z pohledu nemocných v kritickém stavu není tato metoda využitelná, neboť ke správné interpretaci výsledků je zapotřebí dosažení ustáleného stavu.

V současné době nejvíce využívané metody stanovení syntézy cholesterolu jsou založené na inkorporaci značených látek MIDA (mass isotopomer distribution analysis) a technika využívající inkorporaci deuteria (ID) [35]. První metoda využívá inkorporace  $^{13}\text{C}$  značeného acetátu do nově vznikajícího cholesterolu.  $^{13}\text{C}$  značený acetát je aplikován konstantní rychlostí, zatím co poměrné množství izotopomeru v produktech je měřeno současně pomocí plynové chromatografie – mass – spektrometrie. Množství distribuce izotopomeru v produktech je specificky určeno pomocí koncentrace značených podjednotek v prekursorovém poolu, ze kterého jsou polymery syntetizovány. Nevýhodou těchto moderních metod je potřeba homogenního stabilního zdroje prekursorů v pokud možno konstantním systému syntézy a vysoká nákladnost metody. Ta je dána zejména potřebou relativně vysokého množství značkovací látky, která musí zajistit dostatečnou velikost „značkovacího poolu“. Typická čistá rychlost syntézy stanovená pomocí této metody je  $570 \pm 55$  mg/den.

Alternativou MIDA metody je metoda inkorporace deuteria. [34]. Při této metodě je jako značkovací látka používán deuterium oxid a je zapotřebí relativně malých dávek. Pomocí této metody je možno detekovat změny rychlosti syntézy cholesterolu již v intervalech čtyř hodin [36]. Cena značkovací látky je relativně nižší ve srovnání s MIDA technikou.

Ke stanovení míry absorpce cholesterolu se používají dvě metody. První metodou je „double tracer“ metoda [37], která používá značkovací látky, která navázáním na konkrétní metabolit umožní sledování absorpce látky v lidském těle. V případě výše zmíněné metody je aplikace značkovací látky intravenózní a perorální [38]. Tyto metody jsou finančně náročné a jejich využití je především experimentální. Druhým způsobem je stanovení plasmatických hladin fytosterolů - rostlinných sterolů, jejichž koncentrace v plasmě odráží stupeň absorpce cholesterolu z potravy [39]. Fytosteroly jsou steroly rostlinného původu, které mají podobnou strukturu jako cholesterol. Frakce absorbovaných fytosterolů je mnohem menší než frakce

cholesterolová (kolem 10%). Výhoda stanovení fytoosterolů spočívá v tom, že mohou být analyzovány společně s prekurzory cholesterolu.

## 2.4 Necholesterolové steroly

Steroly jsou látky, které jsou charakterizované přítomností hydroxylové skupiny na 3. uhlíku steroidního jádra. Jako necholesterolové steroly jsou označovány prekurzory biosyntézy cholesterolu a rostlinné steroly (fytoosteroly).

Prekurzory cholesterolu (lanosterol, 7-dehydrocholesterol, lathosterol), které jsou stanovovány v plasmě, jsou považovány za indikátory syntézy cholesterolu. Tyto prekurzory cholesterolu jsou uvolňovány z buněk v neesterifikované (volné) podobě a jejich uvolňování je proporcionální k rychlosti, s jakou dochází k jejich tvorbě v biosyntetické cestě cholesterolu. Steroly obecně se vyskytují v krevní plasmě částečně jako estery mastných kyselin (především kyseliny olejové a linolové) a částečně jako neesterifikované. Pouze neesterifikované formy methylsteroidů jsou považovány za markery reflektující syntézu cholesterolu, neboť k jejich esterifikaci dochází pouze v játrech cestou acyl cholesterol acyltransferázy (ACAT) a ne v plasmě cestou lecitin cholesterol acyltransferázy (LCAT) [39]. Inhibice biosyntézy cholesterolu je spojena s výskytem prekurzorů sterolů v plasmě, zatímco inhibice cholesterolové konverze do žlučových kyselin je spojena s výskytem oxidovaných intermediálních produktů cholesterolu v plasmě.

Složitost struktur prekurzorů cholesterolu, jejich relativně nízké koncentrace a chemická nestabilita přináší řadu obtíží v jejich izolaci, identifikaci a následné kvantifikaci. Každý z prekurzorů cholesterolu totiž vyžaduje speciální metodu izolace, identifikace a kvantifikace.

Skvalen, jeden z prekurzorů cholesterolové syntézy (byť bez steroidního jádra), je polynenasycený 30-ti uhlíkatý uhlovodík. V přírodě se vyskytuje jako významná složka oleje z jater hlubinného žraloka (80%), zároveň je obsažen v některých rostlinných olejích (až 3% v olivovém oleji, až 10% v amarantovém oleji). Jeho obsah v ostatních zdrojích tuku v potravinách je malý. Skvalen je součástí lipoproteinů plasmy, kde asi polovina je zastoupena ve VLDL, asi 25% v LDL a 25% v HDL [40,41]. Částečně pochází z potravy, ale jeho majoritní podíl je syntetizován v játrech. Při hodnocení koncentrace skvalenu v plasmě je potřeba kalkulovat s tím, že vykazuje cirkadiální kolísání s maximální koncentrací kolem třetí hodiny ranní a drobným poledním píkem [31]. Nejvyšší obsah skvalenu ve tkáních je v kůži a

tukové tkáni. Vzhledem k tomu, že je skvalen obsažen v kožním mazu, je mimo jiné eliminován také touto cestou. V lidském těle plní roli antioxidační a jako součást olivového oleje byl identifikován jako jeden z chemoprotektivních faktorů rozvoje karcinomu rekta [42,43].

Lathosterol ( $5\alpha$ - $3\beta$ -cholest-7-en-3-ol) je v současné době nejuznávanějším markerem endogenní syntézy cholesterolu. Výhodou lathosterolu je jeho relativně vysoká koncentrace v plazmě. Jeho poměr k cholesterolu (lathosterol/cholesterol) je stabilní ve VLDL, IDL, HDL i LDL lipoproteinech a je považován za nejpřesnější marker syntézy cholesterolu rovněž vzhledem ke své jednoduché kvantifikaci. Vzhledem k tomu, že hladina lathosterolu velice těsně koreluje s aktivitou HMG-CoA reductázy [32], je hladina lathosterolu a poměr lathosterol/cholesterol využíván také jako marker úspěšnosti hypolipidemické terapie, kde při terapii statiny dochází při úspěšné léčbě k poklesu tohoto poměru [44].

V lidské plasmě jsou přítomny také rostlinné steroly, které se nazývají fytosteroly. Vzhledem k tomu, že skupina fytosterolů čítá více než 250 steroidních alkoholů [45], budou v této části zmíněny pouze ty, které mají bezprostřední vztah k předkládané práci. Fytosteroly, podobně jako cholesterol v živočišných buňkách, tvoří základní stavební kámen rostlinné buněčné stěny [46]. Fytosteroly jsou nejčastěji děleny na dvě skupiny:  $\Delta^5$ -steroly a  $5\alpha$ -redukované stanoly. Svoji chemickou strukturou jsou podobné cholesterolu, odlišují se však strukturou postranního řetězce. Například  $\beta$ -sitosterol má kratší uhlovodíkový zbytek na 24 uhlíku, kampesterol metylovou skupinu na stejném místě. V plasmě jsou detekovány v malém množství ( $< 1$  mg/dL) [47] a jejich přítomnost reflektuje jejich absorpci z diety [48], neboť živočišný organismus je nedokáže sám syntetizovat. V dietě konzumované v našich zeměpisných šířkách se nejvíce vyskytuje  $\beta$ -sitosterol. Je obsažen v běžných rostlinných olejích jako jsou řepkový, slunečnicový a olivový olej. Při běžných dietních zvyklostech se pohybuje denní příjem fytosterolů v rozsahu 200-300 mg /den. Přitom jejich absorpce ve střevě je nízká pouze okolo 0,1 - 5% [49]. Nehydrolyzované estery fytosterolů jsou relativně hodně hydrofobní a pokud vytvoří jádro micely s cholesterolem, jsou špatně vstřebatelné. Hydrolyzované estery jsou součástí micel, které se vstřebávají a současně jsou schopny vytěšňovat z vazby cholesterol [50,51]. Tohoto poznatku se bohatě využívá v tzv. funkčních potravinách, jako jsou margariny obohacené o rostlinné steroly, jejichž prostřednictvím dochází k regulaci absorpce cholesterolu a tím i snížení hladiny cholesterolu v séru. Tento efekt je zprostředkován cestou zvýšení exprese LDL receptorů ve tkáních jako důsledek snížené střevní absorpce cholesterolu [52]. Touto cestou lze, při denním příjmu diety bohaté

na fytosteroly, snížit hladinu LDL-cholesterolu o 10 - 20% [53]. Navíc při výše zmíněném dietním režimu byl popsán vzestup HDL. Fytosteroly jsou z organismu vylučovány do žluče prostřednictvím liver X receptorem (LXR) regulované aktivity membranózních ATP-binding cassette (ABC) transportérů A1, G5/G8 a B4 (MDR2) [54]. Pomineme-li vzácná onemocnění provázená vysokými hladinami fytosterolů a rozvojem předčasné aterosklerozy jako je sitosterolemie [55], mají fytosteroly v přebytku v plasmě i své negativní vlastnosti. S tímto problémem se můžeme setkat u nemocných na dlouhodobé parenterální výživě, kde v tukových emulzích používaných pro tento typ výživy je signifikantní příměs fytosterolů. Tyto steroly se zabudovávají do žlučových kyselin, které tak velmi podstatně změny své fyzikální, chemické a metabolické vlastnosti, čímž dochází ke změně stability žluče a formování žlučových kamenů [56,57]. Navíc je nadbytek rostlinných sterolů v tukových emulzích dlouhodobě podávané parenterální výživy dáván do souvislosti s cholestatickým jaterním poškozením nemocných [58,59]. Některé práce ukázaly, že fytosteroly v přebytku mohou vést ke změně deformability erytrocytů změnou zastoupení cholesterolu v erytrocytární membráně a tím navození zvýšené fragility erytrocytů [60,61], jiné práce však toto nepotvrdily [62,63].

V každém případě ve vztahu k předkládané práci je potřeba připomenout, že stanovení hladin některých fytosterolů je využíváno ke kvantifikaci absorpce cholesterolu z potravy, jak již bylo uvedeno výše.

## **2.5 Mastné kyseliny a triacylglyceroly**

Mastné kyseliny (MK) jsou alifatické karboxylové kyseliny. Nejčastěji se vyskytují jako estery v přírodních tucích a olejích, mohou však být také ve formě neesterifikované jako volné mastné kyseliny. Mastné kyseliny lze rozdělit podle přítomnosti a počtu dvojných vazeb na nasycené (neobsahují žádnou dvojnou vazbu) a nenasycené s jednou či více dvojnými vazbami. V zásadě lze rozlišit v lidském organismu čtyři skupiny nenasycených mastných kyselin, které vznikají za pomoci desaturáz a elongáz ze čtyř tzv. mateřských mastných kyselin (kyseliny palmitové, kyseliny stearové, kyseliny linolové a kyseliny linolenové). Dále jsou mastné kyseliny charakterizovány počtem atomů uhlíku v molekule (mastné kyseliny s krátkým, středním a dlouhým řetězcem). Podle polohy dvojných vazeb k metylovému konci řetězce pak rozlišujeme řadu  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3. Kromě toho, že jsou mastné kyseliny zdrojem



energie, sehrávají v lidském organismu ještě další důležité role. Tvoří strukturální složky buněčných membrán a mají vliv na její fluiditu, permeabilitu a funkci membránových receptorů. Vysoce nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 jsou potřebné pro syntézu tkáňových mediátorů – prostaglandinů, prostacyklinů, tromboxanů a leukotrienů, které se uplatňují v procesu srážení krve, regulaci tonu cévní stěny nebo v zánětlivé reakci. Při nadbytku  $\omega$ -6 mastných kyselin vznikají silně reagující prozánětlivé, vasokonstrikční a prokoagulační mediátory, naopak při převaze  $\omega$ -3 mastných kyselin vznikají slabě reagující mediátory opačného působení [64,65]. Navíc se prokázalo, že  $\omega$ -3 mastné kyseliny tlumí produkci zánětlivých cytokinů blokadou signální cesty nukleárního faktoru  $\kappa$ B. Tato cesta je blokována aktivací cytoplasmatických receptorů PPAR- $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ ), o nichž je navíc známo, že ovlivňují metabolismus lipidů. Optimální poměr  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 v tukových emulzích je 1:2 až 1:4 [64]. Tuky slouží jako nosiče pro liposolubilní vitamíny. Lidský organismus dokáže syntetizovat nasycené a monoenoové mastné kyseliny, polyenoové mastné kyseliny (kyselina linolová jako  $\omega$ -6 a kyselina  $\alpha$ -linolenová jako  $\omega$ -3) jsou však esenciální a musí být přijímány ve výživě.

Volné mastné kyseliny pocházejí ze dvou zdrojů. Většinou jsou produkty adipocytů, kde jsou uloženy jako zásoba a jsou uvolňovány v době potřeby metabolického substrátu. Druhým zdrojem volných mastných kyselin jsou lipoproteinové částice bohaté na triacylglyceridy. Po hydrolýze těchto lipoproteinů je většina volných mastných kyselin využita coby nutriční substrát. Pouze malá část mastných kyselin není ihned využita a vytváří cirkulující pool navázaný na albumin. Před vstupem do buňky se komplex albumin - volná mastná kyselina naváže na receptor pro albumin, má-li buňka takovýto receptor. V ostatních tkáních, kde buňkám albuminový receptor chybí, dochází k disociaci komplexu ještě před internalizací.

Tuky obsažené v potravě jsou ve střevě nejprve mechanicky a dále prostřednictvím žlučových kyselin emulgovány, což umožňuje jejich následné štěpení pankreatickou lipázou a fosfolipázou A2. Účinkem pankreatické lipázy se z triacylglycerolů tukových kapének odštěpují mastné kyseliny v poloze 1 a 3 za vzniku 2 – monoacylglycerolů a spontánně se formují do micel, které jsou dobře rozpustné ve vodném prostředí. V centru micel jsou monoacylglyceroly, cholesterol a mastné kyseliny, na povrchu se nacházejí polární konce žlučových kyselin a fosfolipidů. Přestože triacylglyceroly mohou být v malých množstvích resorbovány i nerozštěpené, je enzymatické štěpení tuků potravy podmínkou pro jejich normální resorpci. Po kontaktu micel s mikrokly enterocytů difundují jejich lipidové složky

(mastné kyseliny, monoglyceroly a cholesterol) do enterocytů. Vedle prosté difuze se na transportu mastných kyselin podílí také facilitovaná difuze pomocí FATP (fatty acid transport protein). Po vstřebání do enterocytů dochází zpět k re-esterifikaci na triacylglyceroly, které jsou transportovány do chylomikronů. Chylomikrony jsou syntetizovány v endoplasmatickém retikulu enterocytu a poté transportovány do Golgiho aparátu, odkud exocytózou vstupují do extracelulárního prostoru. Při vzniku chylomikronů sehraává důležitou úlohu apoprotein apo B-48 a apoprotein A. Nově vzniklé chylomikrony jsou ihned po vstupu do cévního řečiště obohaceny o apoproteiny E a C (zdrojem je HDL) a následně štěpeny lipoproteinovou lipázou, jak již bylo uvedeno výše. Triacylglyceroly, které jsou syntetizované v játrech, se dostávají do oběhu ve VLDL. Ve tkáňových kapilárách pak TAG z těchto lipoproteinů podstupují hydrolyzu prostřednictvím lipoproteinové lipázy (LPL). Volné mastné kyseliny jsou absorbovány do tkání a glycerol se vrací do jater a ledvin k finální přeměně na dihydroxyaceton fosfát (DHAP). Mastné kyseliny vstupují do buňky kombinací prosté a facilitované difuze [66,67]. Princip prosté difuze je založen na koncentračním spádu, zatímco facilitovaná difuze skýtá možnost regulace transportu pomocí změn počtu a prostupnosti přenašečů. Nejvýznamnější systém pro facilitovanou difuzi je FAT/CD36 (fatty acid translocase CD36) a FATP 1-6, které jsou uloženy v sarkolemě srdečního a kosterního svalu. Jejich počet se zvyšuje při práci svalu a je také regulován hormonálně a to inzulinem, jehož působením dochází ke zvýšení kapacity pro přenos. [68]. Po vstupu do buňky jsou vyšší MK metabolizovány na acetyl – CoA, nebo se váží na cytoplasmatický FABP (fatty acid binding protein), který umožňuje jejich transport k místu utilizace [67, 69].

Výchozí látkou pro syntézu mastných kyselin je acetyl-CoA, jehož hlavním zdrojem je glukóza, v menším množství laktát a některé aminokyseliny. Protože syntéza mastných kyselin probíhá v cytoplasmě a většina acetyl – CoA je vytvořena v mitochondriích, jejichž membrána je pro acetyl – CoA nepropustná, musí se acetyl – CoA nejdříve přeměnit na citrát za přispění citrátsyntázy. Citrát je následně přenesen za pomoci trikarboxylátového transportéru do cytozolu. Tam je za pomoci ATP-citrátlyázy rozštěpen na acetyl – CoA a oxalacetát. Prvním a zároveň rozhodujícím krokem při syntéze mastných kyselin z acetyl – CoA je jeho přeměna na malonyl – CoA pomocí acetyl – CoA – karboxylázy. Dále pak pokračuje syntéza mastných kyselin ve sledu hydrogenačních a dehydratačních reakcí katalyzovaných multienzymovým komplexem označovaným jako syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase – FAS). jehož součástí je bílkovina ACP (acyl carrier protein). Hlavním zdrojem vodíku pro redukční syntézu mastných kyselin je NADPH vznikající v pentozovém cyklu

nacházejícím se v cytozolu. Pro funkci syntázy mastných kyselin je nezbytný NADPH, ATP, Mn<sup>2+</sup>, biotin a kyselina pantotenová.

Syntéza mastných kyselin je regulována na několika úrovních. Kromě ATP-citrátlyázy, která stojí na samém začátku syntézy mastných kyselin (jejím produktem je acetyl – CoA), je dalším klíčovým regulačním enzymem acetyl – CoA – karboxyláza (ACC). Jeho dvě isoformy ACC1 a ACC2 [70] jsou aktivovány citrátem a inhibovány palmitoyl-CoA. Kromě toho je v regulaci syntézy mastných kyselin důležitý inzulin. Aktivuje nejen syntézu mastných kyselin z acetyl – CoA, ale i tvorbu acetyl – CoA z glukózy v pentozovém cyklu. Hlavní regulace probíhá na úrovni acetyl – CoA – karboxylázy, která je regulována kovalentně fosforylací/defosforylací i allostericky. Defosforylace zprostředkovaná inzulinem jí aktivuje, fosforylace zprostředkovaná glukagonem, adrenalinem a samotným acetyl – CoA její aktivitu inhibuje. Na regulaci acetyl – CoA – karboxylázy fosforylací se podílí AMPK (AMP-aktivovaná proteinkináza). Její aktivita stoupá při vzestupu poměru AMP/ATP v buňce, čímž dochází k inhibici syntézy mastných kyselin [71]. V regulaci syntézy polyenových mastných kyselin má zásadní význam  $\Delta 6$  – desaturáza. Její aktivita je zvyšována účinkem inzulinu a deficitu esenciálních mastných kyselin, naopak její aktivitu snižují glukokortikoidy, glukagon a deficit nutričního substrátu.

Syntéza triacylglycerolů z mastných kyselin a glycerolu probíhá v tukové tkáni, střevní sliznici a játrech. V tukové tkáni je nedostatek enzymu glycerol kinázy, proto zde není hlavním zdrojem glycerol, ale dihydroxyaceton fosfát (DHAP) uvolňovaný z glykolýzy. Zatímco syntéza triacylglycerolů ve střevní sliznici probíhá tzv. monoacylglycerolovou drahou, je v ostatních tkáních dominantní fosfatidátová cesta.

Resorbované mastné kyseliny jsou v cytosolu enterocytů transportovány ve vazbě na speciální protein – FABP (fatty acid binding protein) k hladkému endoplasmatickému retikulu, kde jsou společně s monoacylglyceroly použity k resyntéze triacylglycerolů. Syntéza triacylglycerolů v enterocytech probíhá monoacylglycerolovou drahou, ve které se 2-monoacylglyceroly postupně přeměňují pomocí monoacylglyceroltransferázy a diacylglyceroltransferázy na 1,2 – diacylglycerol a triacylglycerol. Syntézou triacylglycerolů a vazbou mastných kyselin na FABP je udržován gradient, který umožňuje resorbci dalších lipidů. Část mastných kyselin s krátkým a středním řetězcem (do 12 uhlíků) není po vstupu do enterocytu využita ke tvorbě triacylglycerolů ale vstupují přímo do portální krve.

V rámci fosfatidové cesty, která je dominantní cestou syntézy triacylglycerolů mimo enterocyty, je z glycerol–3–fosfátu vytvořeného glykolýzou nebo hydrolýzou triacylglycerolů syntetizován 1,2–diacylglycerolfosfát (fosfatidát). Tento meziprodukt je dále za účasti

fosfatidátfosfohydrolázy (PAP1) přeměněn na 1,2-diacylglycerol. Na ten je následně esterifikována další molekula acyl- CoA pomocí diacylglycerolacyltransferázy.

Regulace syntézy triacylglycerolů je proces, který je těsně spjatý s metabolismem mastných kyselin a jejich regulací (viz výše). Závisí na nabídce substrátu, především acetyl – CoA. Mechanismy zvyšující dostupnost mastných kyselin tak zároveň aktivují syntézu triacylglycerolů. Nicméně v jednotlivých tkáních má lipogeneze svá specifika. Ve střevě se TAG syntetizují monoacylglycerolovou dráhou. Ze střeva jsou uvolňovány do lymfy a teprve poté do krevního oběhu ve formě chylomiker. V játrech je hlavním substrátem TAG glukóza, zbytky chylomiker a IDL. Většina TAG je uvolňována do krevního oběhu ve formě VLDL. V tukové tkáni jsou hlavními substráty pro syntézu TAG glukóza, chylomikra a VLDL.

Lipolýza a oxidace mastných kyselin představují dvě fáze pochodu uvolnění energie z triacylglycerolů ve tkáních. V rámci lipolýzy jsou triacylglyceroly štěpeny na mastné kyseliny a glycerol a při oxidaci mastných kyselin jsou tyto využity pro tvorbu energie.

V regulaci lipolýzy sehrává důležitou úlohu hormon senzitivní lipáza (HSL), která hydrolyzuje esterické vazby glycerolu se dvěma mastnými kyselinami a monoacylglycerolová lipáza, která uvolňuje mastnou kyselinu z monoacylglycerolfosfátu. Rozhodující význam má HSL, jejíž regulace procesem defosforylace a fosforylace je analogická jako u ACC [72].

Oxidace mastných kyselin převažuje u zátěžových stavů, kde je většina MK získávána štěpením TAG. Oxidace probíhá v mitochondriích. Mastné kyseliny s krátkým a středním řetězcem vstupují do mitochondrie snadno. Pro vstup mastných kyselin s dlouhým řetězcem do mitochondrie je zapotřebí jejich esterová vazba na karnitin. Do matrix mitochondrie přesune estery mastné kyseliny karnitincylnitrotranslokáza (KACT) a karnitincylnitrotransferáza (KAT).  $\beta$ -oxidace postupuje opakovaným odštěpováním dvouuhlíkatých zbytků za vzniku energie a jejím konečným produktem je acetyl – CoA. Energetický zisk  $\beta$  - oxidace je dán počtem vytvořeného acetyl – CoA a redukovaných nukleotidů. Vzhledem k tomu, že MK neprocházejí přes hematoencefalickou bariéru, není  $\beta$  - oxidace přímým zdrojem energie (ATP) pro mozek.

Regulace oxidace MK probíhá prostřednictvím hladiny acyl – CoA, karnitinu, malonyl – CoA a poměru AMP/ATP. V důsledku aktivace HSL dochází u zátěžových stavů ke zvýšenému vstupu MK do buněk a z toho plynoucího vzestupu intracelulární hladiny acyl – CoA. Malonyl – CoA je inhibítoem karnitin – acyltransferázy I, která je nezbytná pro vstup acyl – CoA do mitochondrie. Přitom malonyl – CoA je intermediálním produktem při syntéze mastných kyselin, tzn. že oxidace mastných kyselin je inhibována, když je aktivována jejich

syntéza. Vzestup poměru AMP/ATP aktivuje AMPK (AMP – aktivovaná proteinkináza), která fosforylací inhibuje acetyl – CoA – karboxylázu, čímž se sníží tvorba malonyl – CoA a následně dochází ke stimulaci  $\beta$  - oxidace. Mastné kyseliny jsou přirozeným ligandem pro jaderné receptory PPAR (peroxisome proliferator activated receptors). Aktivace PPAR  $\alpha$  a  $\delta$  stimuluje v játrech, svalech, srdci a ledvinách oxidaci MK prostřednictvím zvýšené exprese FABP, apoproteinu AI a AII, KAT – I a enzymů oxidace MK. V důsledku aktivace PPAR -  $\gamma$  dochází ke stimulaci TAG cestou zvýšení exprese FABP, LPL, FAT a acyl – CoA – syntetázy.

## 2.6 Mechanismy vzniku poruch metabolismu lipidů

V roce 1926 Thannhauser a Schaber informovali o výskytu nízké koncentrace sérového cholesterolu u akutního onemocnění [73]. Literatura následně zaznamenala řadu dalších medicínských situací, při kterých dochází k podstatnému snížení celkového cholesterolu, LDL a HDL [6,7,8,74-79].

Podle výsledků studia života primátů a volně žijících populací (od civilizace izolované volně žijící lidské kmeny) je odhadována jako optimální plazmatická koncentrace celkového cholesterolu v rozmezí mezi 3,0 a 4,0 mmol/l a tomu odpovídající rozmezí LDL cholesterolu pod 1,8 mmol/l [2]. Není však zcela zřejmé, kde je v klinicky závažných stavech kritická hladina cholesterolu, pod kterou dochází k projevům jeho deficitu. Z řady prací vyplývá, že tato hranice je mezi 2,6 až 3,5 mmol/l celkového cholesterolu [76,79-81]. Nicméně literárně se jako hypocholesterolemie označuje stav, kdy sérová koncentrace celkového cholesterolu klesá pod 3,5 mmol/L. Z některých prací však vyplývá, že za určitých klinických situací je vhodnější vyjádřit hypocholesterolemii jako procentuální pokles hladiny cholesterolu proti jeho původní hodnotě [12].

Na vzniku hypocholesterolemie v klinicky závažných stavech se může podílet řada faktorů. V zásadě lze říci, že k rozvoji hypocholesterolemie u klinicky závažných stavů dochází v důsledku narušení rovnováhy mezi příjmem a syntézou cholesterolu (resp. nedostatečné schopnosti navýšit syntézu dle aktuálních potřeb organismu) na straně jedné a katabolismem cholesterolu na straně druhé [82].

Jednak je to zvýšená spotřeba cholesterolu, která je vyvolána reparačními procesy spojenými s rychlým buněčným dělením a tím také zvýšenou spotřebou cholesterolu. V buněčné membráně představuje cholesterol 20 – 25 %. Za patologických procesů spojených s tvorbou hnisu dochází k enormním ztrátám cholesterolu, který odchází z organismu ve formě rozpadlých bílých krvinek a tento cholesterol nemůže být ani reutilizován. Podobná situace nastává v případě rychle se množících buněk typu blastů u leukemií [83]. Zvýšená spotřeba cholesterolu, vznikající při dělení buněk a v reparačních procesech poškozených buněčných membrán, může být podle experimentů 5 až 6x vyšší, než jsou možnosti maximální endogenní syntézy cholesterolu [10,80].

V důsledku zánětu nebo operačního traumatu dochází k uniformní cytokinové reakci organismu – vyplavení prozánětlivých cytokinů typu tumor necrosis  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukinu IL-1, IL-6 apod., která se nazývá SIRS (systemic inflammatory response syndrom). Přibývá

důkazů, že zánětlivé cytokiny mohou ovlivňovat syntézu cholesterolu rozličným způsobem. Syntéza cholesterolu patří k energeticky nejnáročnějším enzymatickým dějům v organismu. V počátečních fázích kritického stavu je syntéza prekurzorů cholesterolu zřejmě zvýšena, a to až po úroveň farnesyly nebo skvalenu. Tyto prekurzory jsou však zvýšeně spotřebovány nebo je zablokován enzym dalšího kroku přeměny isoprenoidů na cholesterol, a to buď v oblasti skvalen syntetázy nebo v počátečních krocích syntézy steroidního nukleu ze skvalenu, případně v prvních enzymatických procesech přeměny steroidního nukleolu – cyklopentanoperhydrofenantrenového jádra cestou přes lathosterol a lanosterol na cholesterol [84,85]. Prekurzory cholesterolu charakteru isoprenu, farnesolu a geranyl-geraniolu mohou být v kritickém stavu zvýšeně spotřebovány jako molekuly důležité pro komunikaci mezi signálními proteiny a buněčnou membránou a jsou výrazně ovlivněny cytokiny a katabolickými hormony. Zánětlivé cytokiny jsou schopny up-regulace aktivity LDL receptorů a jsou schopny zvýšit periferní up-take cholesterolu [86,87]. Interleukin IL-6 stimuluje in vivo jaterní lipogenezi [88,89] cestou vzestupu aktivity lipogenetického enzymu acetyl-CoA karboxylázy a syntetasy mastných kyselin. Nicméně efekt cytokinů na lipoproteinový metabolismus je komplexní a mechanismy vedoucí k poklesu koncentrace cholesterolu a jeho dostupnosti v plasmě nejsou do detailu prostudovány.

U nemocných v kritickém stavu s obrazem nitrobřišní katastrofy, kde dochází ke ztrátám sterkorálního obsahu píštělemi nebo přerušením zažívacího traktu, je potřeba kalkulovat s velkými ztrátami cholesterolu ve formě žlučových kyselin, které normálně podléhají enterohepatálnímu cyklu. Navíc může docházet k jistému stupni blokády tohoto cyklu také bez přerušení zažívacího traktu.

Na opačném konci příčin hypocholesterolemie je snížení přísunu cholesterolu. Nikoho jistě nepřekvapí, že kriticky nemocný pacient nepřijímá perorální stravu, která je významným externím zdrojem cholesterolu. Jedinou možností nutriční podpory těchto nemocných poté zůstává parenterální či enterální výživa. Pouze některé tukové emulze používané k parenterální výživě obsahují stopové množství cholesterolu (zde je zdrojem cholesterolu lecitin z vaječného žloutku používaný jako stabilizátor a emulgátor nitrožilně používaných tukových emulzí). Množství cholesterolu v parenterální výživě však nepřesáhne ani při použití tukových emulzí s nejvyšším obsahem cholesterolu hodnotu 25 mg za den, což nepochybně nestačí pokrýt ani zlomek potřeby organismu kriticky nemocných. Nicméně existují práce které dokazují, že adekvátní přísun arteficiální nutriční podpory vede ke zvýšení hladin cholesterolu. Pravděpodobně se jedná o efekt indukce syntézy cholesterolu dostatečným přísunem energetického substrátu [90]. Obdobně byl dokumentován také

příznivý vliv aplikované enterální výživy (byť také bezcholesterolové) na vzestup HDL cholesterolu u kriticky nemocných [91,92].

Hypocholesterolemie je také běžným jevem u nemocných s popáleninami. Je způsobena vlivem zánětlivých cytokinů na metabolismus cholesterolu, hemodilucí a současnými ztrátami apoproteinů rannými plochami [93]. Hypocholesterolemie u popálených nemocných odpovídá závažnosti onemocnění a mortalitě. Pokles sérového cholesterolu v této situaci mívá stejnou výpovědní hodnotu týkající se osudu nemocného jako standardní parametry užívané v popáleninových centrech celého světa [93,94].

Hypocholesterolemie má také vztah k poklesu některých plasmatických bílkovin. Literárně je dobře známý vztah mezi cholesterolem a albuminem, celkovou bílkovinou, prealbuminem, retinol vázajícím proteinem, transferinem, vazebnou kapacitou železa, cholinesterazou a aktivitou protrombinu [95-99]. Tento vztah může být vysvětlen současně na cholesterol a na další proměnné působícím uvolněním mediátorů akutní fáze a cytokinů a narušením jaterní syntézy nebo nedostatkem substrátu. Je velmi dobře známý vztah mezi hypocholesterolemií a podvýživou. Experimentálně byla navozena hypocholesterolemie nízkobílkovinou dietou [100] a naopak byla zmírněna parenterální suplementací aminokyselin (AMK), zejména AMK s rozvětveným řetězcem [96,101]. Hlavní vlivy, které současně snižují cholesterol a mnoho plasmatických bílkovin, souvisí se zánětlivou odpovědí akutní fáze. To podporuje fakt, že většina z těchto bílkovin představuje tzv. „negativní“ reaktanty akutní fáze a že hypocholesterolemie je spojena na druhé straně se zvýšením tzv. „pozitivních“ reaktantů akutní fáze.

Hypocholesterolemie je často pozorována u starších nemocných, a to dokonce za nepřítomnosti klinicky zjevné choroby. Může být způsobená různými kombinacemi malnutrice, funkčního zhoršení stavu, infekčních chorob, perzistující imunitní aktivací, chronickými a nádorovými chorobami a je považována za ukazatel lability, rizika neaterosklerotické nemoci a prediktor krátkého přežití [2, 95, 102-103]. Zvýšená hladina cholesterolu ve vysokém stáří je naopak spojena se sníženou úmrtností na infekce a rakovinu [104,105].

Plasmatické koncentrace cholesterolu mohou ovlivňovat i klinické situace a terapeutické zásahy, které zdánlivě s metabolismem lipidů nesouvisí. Řadu let byl diskutován vztah hypocholesterolemie a hemodiluce. Ukazuje se, že na prudkém poklesu cholesterolu např. u polytraumatizovaných nemocných se nemůže podílet pouze hemodiluce [106], ale že většinou je tento pokles spojen se ztrátou krve a z toho rezultující anemií [74,76,107]. Ukazuje se, že v souvislosti s anemií může docházet k výměně cholesterolu mezi plasmou a



membránou červených krvinek nebo mezi extravaskulárním a intravaskulárním prostorem [107]. Zcela klasickým terapeutickým počinem ovlivňujícím metabolismus cholesterolu je aplikace statinů, které ovlivňují aktivitu klíčového enzymu HMG CoA-reduktázy, čímž dochází k poklesu plasmatického cholesterolu. Pokud je v terapii nemocného použit heparin, dochází k mobilitaci jaterní lipázy a lipoproteinové lipázy s jejich uvolněním z cévního endotelu do plasmu. Zároveň může docházet ke vzestupu internalizace LDL a VLDL lipoproteinů, který je následován poklesem v hladině sérového cholesterolu [108]. Jinými způsoby, jak může být ovlivněn metabolismus lipidů je aplikace inzulínu, druh aplikované sedace (anestetika a hypnotika v tukových emulzích) a v neposlední řadě i hypotermie.[109]. Navíc u klinicky závažných stavů, provázených hypoperfuzí orgánů a potřebou katecholaminů, dochází k zachování průtoku krve životně důležitými orgány na základě redistribuce krevního toku ze splachnické oblasti. A právě jaterní parenchym sehrává důležitou úlohu v metabolismu lipidů, ale i jejich kosterních bílkovin apoproteinů. Při jeho poškození (a to jak akutně v rámci hypoperfuze, tak i chronicky např. toxicky) dochází k propadu v hladinách lipoproteinů narušením jejich syntézy a narušením produkce apoproteinů [110]. Tento stav může být jistým způsobem modifikován v případě cholestázy. Cholestáza je totiž spojena se vzestupem v hladinách cholesterolu a zmírňuje pokles cholesterolu spojený s jinými faktory [76, 111,112]. Pravděpodobně souvisí se stimulací uvolňování cholesterolem bohatého lipoproteinu X z jater a nebo poruchou exkrece cholesterolu do žluči. Tímto se vysvětluje fakt, že u kriticky nemocných s cholestázou nebývá pozorována extrémní hypocholesterolemie [113].

Hypocholesterolemie v akutních stavech bývá provázena změnou v hladinách triacylglycerolů (TAG). Kupodivu se v literatuře vyskytují informace jak o vzestupu hladin TAG [114,115] tak o poklesu hladin TAG [116,117]. Změny v hladinách TAG mají nepochybně souvislost se změnou hormonálního nastavení organismu v rámci stresové reakce a s vyplavením cytokinové kaskády v rámci univerzální SIRS reakce. Ve stresu dochází k aktivaci hormon senzitivní lipázy (HSL) jejímž působením dochází k mobilizaci volných mastných kyselin z tukové tkáně do krevního oběhu. Vlivem cytokinů (IL-1, IL – 6 a TNF- $\alpha$ ) a vznikající inzulínové rezistence dochází k přesměrování metabolismu mastných kyselin, vzestupu malonyl CoA a inhibici karnitin-acyltransferázy I, která je nezbytná pro vstup vyšších mastných kyselin do mitochondrií [118]. Část mastných kyselin je reesterifikována za vzniku TAG, které jsou uvolňovány do krevního oběhu ve formě lipoproteinů, především VLDL [119]. Na vzestupu TAG v plasmě se může navíc spolupodílet inhibiční vliv prozánětlivých cytokinů na lipoproteinovou lipázu (LPL) [120]. V důsledku výše zmíněného

vlivu cytokinů, endotoxinů a poruchy oxygenace v kritickém stavu dochází ke snížení hydrolýzy triacylglycerolů a oxidace tuků, k ukládání TAG nejen do jater, ale i pankreatu, srdečního svalu a příčně pruhovaných kosterních svalů, čímž dochází k dalšímu zhoršení jejich již tak kompromitované funkce.

## **2.7 Možné klinické důsledky poruch metabolismu lipidů**

Ukazuje se, že v případě kriticky nemocných může být hypocholesterolemie považována za velmi významný ukazatel prognózy těchto nemocných. Dle literatury byla perzistující, nikoliv přechodná, hypocholesterolemie spojena s horším přežitím kriticky nemocných, s vyšším počtem septických komplikací, s delší dobou hospitalizace a delší dobou strávenou na umělé plicní ventilaci [5,10,11,12,82]. Důležitým klinickým zjištěním je fakt, že u nemocných s hypocholesterolemií dochází ke zvyšování cholesterolu současně s všeobecným zlepšením klinického stavu, takže opakovaná stanovení cholesterolu poskytují informace o vývoji nemoci resp. o úzdravě [7,10,12,76,79,99,113,]. Z tohoto pohledu je doporučeno sledování dynamiky vývoje hladiny cholesterolu u kriticky nemocných jako jeden z velmi cenných prognostických ukazatelů. Povědomost o tomto však bohužel v klinické praxi není příliš veliká.

Kromě toho z epidemiologických studií u lidí s významnou hypocholesterolemií vyplývá, že tito jedinci významně častěji trpí malignitami a chronickými záněty trávicího a dýchacího ústrojí, než zbytek populace. Za příčinu těchto nemocí jsou považovány poruchy buněčné imunity provázející významnou hypocholesterolemií, hlavně snížený počet cirkulujících lymfocytů a jejich nižší celkový počet, včetně sníženého počtu T-buněk a snížení CD8 lymfocytů [104,121,122] a také snížená funkce leukocytů chudých na cholesterol.

Cholesterol v lidském těle plní klíčovou roli také z hlediska reparačních funkcí poškozených buněčných membrán. Jeho snížená dostupnost může vést k narušení reparačních procesů poškozených buněčných membrán, funkčním poruchám receptorů a buněčných kanálů. Je zcela nezbytný pro zachování fluidity membrán, zachování sterické a chemické struktury, zachování permeability buněčné membrány.

Cholesterol má kromě reparační úlohy obnovy poškozené buněčné membrány i významnou úlohu v organizaci tkání a orgánů. Prokazuje to existence tzv. Smith-Lemli-Opitzova syndromu. Při nedostatku cholesterolu v průběhu embryonálního vývoje je porušena funkce proteinu, který reguluje vývojový gen SHH (Sonitz-Hedge-Hog). Tento gen zodpovídá

za správný vývoj tkání a specifický způsob organizace embryonální tkáně. Pro aktivitu SHH regulujícího proteinu je nutná jeho vazba na cholesterol [123].

Prekurzory cholesterolu charakteru isoprenu, farnesolu a geranyl-geraniolu mohou být v kritickém stavu zvýšeně spotřebovány, čímž dochází k narušení komunikace mezi signálními proteiny a buněčnou membránou. Z tohoto pohledu sehrávají tyto prekurzory životně důležitou roli v lidském metabolismu. Umožňují interakci a působení hydrofilních signálních proteinů s buněčnou membránou, která má lipofilní charakter. Intermediální produkty syntézy cholesterolu jako je farnesyl difosfát a geranyl-geranyl difosfát po navázání na hydrofilní signální protein umožní zakotvení alifatické části komplexu molekuly isoprenoidu s bílkovinou do predilekční části lipofilní buněčné membrány [124]. Tudíž toto bezpečné ukotvení signálních proteinů na povrch buněk umožňuje přenos signálních informací do buněk. Další důležité meziproducty na cestě syntézy cholesterolu jsou ubiquinony, které hrají důležitou roli v udržování oxidačně-redukční rovnováhy a oxidační fosforylaci v buňkách, dolicholy jsou zároveň esenciální v procesu syntézy glykoproteinů [13].

Ukazuje se, že lipidy sehrávají důležitou roli v reakci organismu na zánět a obecně v imunitních funkcích. Obzvláště důležitá je jejich role v neutralizaci endotoxinů a bakteriálních lipopolysacharidů [125,126]. Po proniknutí infekčního agens do vnitřního prostředí a jeho rozpoznání imunitním systémem dochází k velice rychlému vzestupu zánětlivých cytokinů. Zásadní roli v patogenezi sepse sehrávají lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, které se váží na řadu vazebných proteinů a receptorů a spouští komplexní imunitní odpověď [127]. Jednou z takovýchto bílkovin je lipopolysacharidový vazebný protein (LBP - lipopolysacharid binding protein), na který se naváže uvolněný lipopolysacharid a tento komplex posléze vazbou na buněčný receptor – CD14 monocyto-makrofágového systému spustí tvorbu a výdej celé kaskády zánětlivých cytokinů. V experimentu na zdravých dobrovolnících došlo po aplikaci jedné intravenózní dávky endotoxinu k vyplavení cytokinů a stresových hormonů, zároveň byly pozorovány změny v metabolismu lipidů včetně poklesu hladin HDL [116]. A právě endotoxin se může vázat i s lipoproteinem HDL a je pak při vstupu do buňky neutralizován [125, 128, 129], čímž dochází k redukci intenzity uvolňovaných zánětlivých mediátorů [130,131]. Sérum zbavené lipoproteinů není schopno uvolňování cytokinů efektivně suprimovat. Hypocholesterolemie, potažmo hypolipoproteinemie, pak může snižovat vazebnou kapacitu pro lipopolysacharid (LPS) [114]. Naopak vazba LPS na lipoproteiny usnadňuje dodání LPS do hepatocytů k detoxikaci [126]. Tyto poznatky by mohly mít své klinické konsekvence. Aplikace

rekonstituovaného HDL v experimentu na zvířecím modelu snížila produkci TNF-  $\alpha$  po podání LPS [132]. Podobné výsledky byly i na prasečím modelu se směsí lipoproteinových fosfolipidů včetně zlepšení vybraných hemodynamických parametrů [133] a stejně tak v humánních experimentech sledujících protizánětlivý efekt a vybrané koagulační parametry [134]. Není však doposud známo, zda výše zmíněné pozitivní efekty rekonstituovaného HDL povedou ke zlepšení prognózy nemocných a snížení mortality.

Cholesterol je základním stavebním kamenem v tvorbě stresových hormonů (kortizolu). Prvním krokem v biosyntéze steroidních hormonů je vytvoření (přes více mezistupňů) pregnenolonu z cholesterolu. Z pregnenolonu se tvoří progesteron, který je jednak sám o sobě účinný hormon, jednak se z něho mohou syntetizovat všechny ostatní steroidní hormony včetně kortizolu. Steroidní hormony jsou skladovány v místech své produkce (kůra nadledvin) pouze v malém množství, tzn. že při vzniku potřeby musí být nejprve syntetizovány ze zásob cholesterolu v organismu. Podnětem k zvýšení syntézy stresových hormonů je vyplavení ACTH (adrenokortikotropní hormon). Během stresu je cholesterol z 80% dominantním donorem substrátu pro tvorbu kortizolu, zbývajících 20% je syntetizováno in situ z acetátu a ostatních prekurzorů [135]. Nadledvinková insuficience byla pozorována až u 61% nemocných se septickým šokem [136,137]. Experimentální studie ukázaly, že HDL je preferovaným cholesterolovým zdrojem steroidogenního substrátu v nadledvinkách [138,139]. Předpokládá se, že pokles substrátu pro syntézu kortizolu by mohl vést k rozvoji nadledvinkové insuficience. Jestliže endogenní syntéza cholesterolu překračuje 1000 mg denně, může snadno dojít k situaci, kdy tato syntéza při déle trvající nebo často se opakující stresové zátěži nestačí a vede k insuficienci nadledvin [8,80].

Jak již bylo zmíněno, stupeň hypocholesterolemie koreluje s tíží onemocnění, morbiditou a mortalitou. Nejsou však do detailu známy všechny mechanismy, kterými dochází k hypocholesterolemii a zda-li nízká plasmatická koncentrace cholesterolu je pouze epifenomen závažných stavů nebo sehrává aktivní roli ve vývoji onemocnění.

### **3. Cíl disertační práce**

1. sledovat trend vývoje závažných hypocholesterolemií v závislosti na charakteru metabolismu cholesterolu rozdílných skupin pacientů v akutních stavech
2. sledovat trend hypocholesterolemie u nemocných s a bez konkomitantní terapie ovlivňující jeho metabolismus
3. ozřejmit vztah předpokládané hypocholesterolemie na funkci nadledvin ve smyslu syntézy stresových hormonů (kortizolu)
4. ozřejmit vztah předpokládané hypocholesterolemie na baktericidní funkci granulocytů

## 4. Soubor a metoda

### 4.1 Charakteristika souboru

Jedná se o monocentrickou prospektivní studii, do které bylo celkem zařazeno 53 konsekutivně přicházejících pacientů a sledovány byly dvě předem vybrané skupiny nemocných. První skupinu tvořili pacienti s koronární aterosklerozou, kteří podstoupili miniinvazivní revaskularizační kardiologický výkon bez použití mimotělního oběhu. Stresovou zátěž představoval jednorázový chirurgický výkon, u kterého bylo možné jasně stanovit začátek. Stres byl dostatečně veliký a bylo možné předpokládat, že byl pro všechny pacienty stejně definovaný. Celkem bylo zařazeno 22 kardiologických nemocných, kteří byli po celou dobu studie hospitalizováni. Druhou skupinu tvořilo 31 pacientů, kteří utrpěli polytrauma v rámci dopravní nehody. Také zde bylo možné přesně stanovit začátek stresové zátěže. Stres byl dostatečně veliký (v této skupině bylo kromě APACHE skóre stanoveno i NISS skóre - New Injury Severity Score). Skupina polytramat byla tedy dostatečně homogenní z hlediska velikosti stresové zátěže.

Pacienti byli hospitalizováni na JIP Kardiologické kliniky FN Hradec Králové a na JIP Chirurgické kliniky FN Hradec Králové. Charakteristika jednotlivých skupin je uvedena v tab.č.2.

|                                | <b>Skupina Traumat</b> | <b>Skupina kardiochirurgie</b> |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| <b>Počet pacientů</b>          | 31                     | 22                             |
| <b>Muži</b>                    | 24                     | 19                             |
| <b>Ženy</b>                    | 7                      | 3                              |
| <b>Věk (průměr ± SD)</b>       | 36 ± 17                | 66,5 ± 8,8                     |
| <b>ICHS</b>                    | 0                      | 22                             |
| <b>Arteriální hypertenze</b>   | 0                      | 17                             |
| <b>DM II. typu</b>             | 0                      | 8                              |
| <b>HLP</b>                     | 0                      | 22                             |
| <b>HLP terapie</b>             | 0                      | 22                             |
| <b>BMI (průměr ± SD)</b>       | 24,8 ± 2,2             | 26,7 ± 2,5                     |
| <b>APACHE II (průměr ± SD)</b> | 20 ± 6                 | 14 ± 2,4                       |
| <b>NISS (průměr ± SD)</b>      | 39,2 ± 9,1             | 0                              |

*Tab. č.2 Charakteristika skupin*

*(SD – standardní odchylka; ICHS – ischemická choroba srdeční; DM II. typu – diabetes mellitus II. typu; HLP – hyperlipoproteinemie; HLP terapie – hypolipidemická terapie; BMI – body mass index; APACHE II - Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; NISS – New Injury Severity Score)*

Základním předpokladem bylo, že se nemocní uvedených skupin budou chovat z hlediska vývoje trendů parametrů metabolismu cholesterolu podobně. Ve skupině kardiochirurgických nemocných byl předpoklad, že u nemocných bude zajištěna nutrice p.o. příjmem stravy následující den po operaci (tohoto bylo ve 100% případů dosaženo aplikací diety s regulovaným příjmem cholesterolu – dieta č. 9 diabetická), u nemocných ve skupině polytraumat nebylo možné dopředu stanovit způsob zajištění nutrice, když tento byl zajištěn kombinovaným způsobem parenterálně a enterálně [v průměru byla většina nemocných od 2 dne ( $2,1 \pm 0,74$  dne) zajištěna parenterální výživou s tukovou emulzí, od 4 dne ( $4,36 \pm 1,61$  dne) pak byla k této postupně přidávána enterální výživa s následným přechodem na plný p.o. příjem].

K porovnání obvyklých koncentrací sterolů za tzv. „normálních“ okolností, tj. bez stresové zátěže, byla jednorázově odebrána skupina dárců krve bez kardiovaskulárního onemocnění (celkem 100 probandů).

U pacientů kardiochirurgické skupiny bylo již vstupně počítáno s konkomitantní terapií ovlivňující metabolismus cholesterolu (statiny) a podle protokolu tuto terapii nemocní

užívali do posledního dne před operací a následně byla tato terapie navrácena do chronické medikace druhý pooperační den. Z tohoto pohledu se jevila zvláště zajímavou otázkou, zda užívání hypolipidemické terapie ve skupině kardiochirurgických nemocných ovlivní trend změn parametrů metabolismu cholesterolu. Všichni kardiochirurgičtí nemocní bez výjimky užívali statiny (terapie byla nasazena odborným kardiologem řádově několik týdnů až měsíců před přijetím do nemocnice a nebyla měněna v průběhu studie), a to atorvastatin v průměrné dávce 20 mg/den nebo simvastatin v průměrné dávce 25 mg/den.

Všichni nemocní udělili s účastí ve studii písemný informovaný souhlas. Ve skupině polytraumatizovaných nemocných nebylo možné získat u části nemocných souhlas bezprostředně při přijetí do nemocnice vzhledem k závažnosti zdravotního stavu. Nemocným byly odebrány vzorky krve v rámci plánovaných odběrů, tyto byly hluboce zamrazeny na –80°C a až po dodatečném získání informovaného souhlasu byly dále zpracovány. Nikdo z nemocných neodmítl účast ve studii. Protokol studie byl schválen etickou komisí FN Hradec Králové.

## **4.2 Vylučující kritéria studie:**

- plánovaná další operace po dobu 8 dnů od zařazení nemocného do studie
- předoperační jaterní dysfunkce (více jak trojnásobný vzestup jaterního souboru)
- verze miniinvazivního výkonu na operaci v mimotělním oběhu
- diabetes mellitus I. typu na inzulínové terapii
- šokový stav vyžadující kardiopulmonální resuscitaci

### **4.3.1 Odběrový protokol pro kardiochirurgickou skupinu**

Den 0 - příjem na kardiochirurgickou kliniku

Den 1 - první pooperační den

Den 4 - čtvrtý pooperační den

Den 8 - osmý pooperační den

Laboratorně byla provedena následující vyšetření: celkový cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, TAG, markery syntézy cholesterolu (skvalen, lathosterol) a markery absorpce cholesterolu (campesterol, sitosterol), koncentrace C- reaktivního proteinu



(CRP), celkový protein (TP), albumin, prealbumin, stanovení interleukinu IL-6, test funkční zdatnosti nadledvin bez stimulace a 60 min po stimulaci 0,250 ug ACTH , test funkční zdatnosti granulocytů „oxidative burst test“.

V den 0 byl analyzován vzorek na koncentrace sterolů, CRP, albuminu, TP, prealbuminu, IL-6. V den 1 byly provedeny odběry stejné jako v den 0 a navíc bylo provedeno stanovení koncentrace inzulinu, C peptidu, byl proveden test oxidativního vzplanutí leukocytů. V den 4 byl proveden odběr ve stejném rozsahu jako den 1 a navíc byl proveden test funkce nadledvin za pomoci synactenového testu. V den 8 byly provedeny stejné odběry jako v den 1.

### **4.3.2 Odběrový protokol pro skupinu polytraumat**

Den 0 - den traumatu – (odběry byly provedeny bezprostředně po přijetí do nemocnice, t.j. do 60 min od vzniku úrazu) – zde byl předpoklad, že poměry koncentrací sterolů budou odpovídat normální situaci pacienta (u traumatu vzhledem ke krátké době od vzniku nebyl předpoklad ovlivnění plasmatických hladin sterolů stresovou zátěží)

Den 1 - první potraumatický den

Den 4 - čtvrtý potraumatický den

Den 8 - osmý potraumatický den

Laboratorně byla provedena následující vyšetření: celkový cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, TAG , markery syntézy cholesterolu (skvalen, lathosterol) a markery absorpce cholesterolu (campesterol, sitosterol), koncentrace C-reaktivního proteinu (CRP), celkový protein (TP), albumin, prealbumin, stanovení interleukinu IL-6, inzulinu, C paptidu, test funkční zdatnosti nadledvin bez stimulace a 60 min po stimulaci 0,250 ug ACTH , test funkční zdatnosti granulocytů „oxidative burst test“.

V den 0 byl analyzován vzorek zbytkového séra na koncentrace sterolů, CRP, albuminu, total proteinu, prealbuminu. Vzhledem k malému množství zbytkového séra nebyla stanovena v této skupině hladina IL-6. V den 1 byly provedeny odběry stejné jako v den 0 a navíc bylo provedeno stanovení koncentrace inzulinu, C peptidu, IL-6 a byl proveden test oxidativního vzplanutí leukocytů. V den 4 byl proveden odběr ve stejném rozsahu jako den 1 a navíc byl proveden test funkce nadledvin za pomoci synactenového testu. V den 8 byly

provedeny stejné odběry jako v den 1. U nemocných na totální parenterální výživě byly odběry provedeny 1 hod po přerušení aplikace výživy.

#### 4.4 Použité analytické metody

1. hladiny celkového cholesterolu byly stanovoveny na principu enzymatického stanovení s fotometrickým měřením barevného reakčního produktu. Podstatou této metody je hydrolýza esterů cholesterolu enzymem cholesterolesterázou, tím dochází k oxidaci cholesterolu za katalytického působení enzymu cholesteroxidázy. Následně reaguje peroxid vodíku s fenolem a 4-aminoantipyrinem za katalytického působení enzymu peroxidázy. Vzniká tak červeně zbarvený chinonimin, jehož absorbance se měří při 540 nm. K měření se používala firemní souprava Cholesterol OSR 6216 a biochemický fotometrický analyzátor (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basilej, Švýcarsko).
2. kvantitativní stanovení LDL cholesterolu a HDL cholesterolu byla prováděna taktéž na principu enzymatického stanovení s fotometrickým měřením barevného reakčního produktu. Byly použity firemní soupravy LDL-Cholesterol OSR 6283 a HDL-Cholesterol OSR 6287. Za účasti enzymů cholesterolesterázy a cholesteroxidázy dochází k enzymatické reakci s LDL cholesterolem a HDL cholesterolem za tvorby peroxidu vodíku. Peroxid vodíku reaguje s N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilinem a 4-aminoantipyrinem v přítomnosti peroxidázy za tvorby modře zbarveného komplexu. Absorbance je následně změřena fotometrickým analyzátozem (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basilej, Švýcarsko)
3. kvantitativní stanovení triacylglyceridů v plasmě se provádělo principem enzymatického stanovení s fotometrickým měřením barevného reakčního produktu. Triacylglyceroly se hydrolyzují za katalytického působení lipoproteinové lipázy. Uvolněný glycerol se působením glycerolkinázy přeměňuje na glycerol-3-fosfát a následně oxiduje enzymem glycerolfosfátoxidázou na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku reaguje s 4-aminofenazonem a 4- chlorfenolem za vzniku barevného produktu. Tento je analyzován fotometricky analyzátozem (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basilej, Švýcarsko)
4. analýza markerů syntézy cholesterolu (skvalen, lathosterol) a markerů absorpce cholesterolu (campesterol, sitosterol) v krevní plasmě probíhala pomocí extrakce

Abell-Kendallovou metodou, saponifikací séra roztokem hydroxidu draselného v ethanolu. V průběhu saponifikace dochází k alkalické hydrolyze triacylglycerolů a fosfolipidů na polární látky a esterifikované steroly se uvolňují z vazby na mastné kyseliny. Následuje trojnásobná liquid-liquid extrakce n-hexanem a vzniklý produkt je derivatizován bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamidem s pyridinem za vzniku trimethylsilyletherů. Separace vzniklých derivátů byla provedena plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GS-MS přístroj TurboMass, Perkin Elmer, Waltham, USA).

5. koncentrace C-reaktivního proteinu, celkového proteinu, albuminu a prealbuminu byly vyšetřeny na přístroji Modular (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basilej, Švýcarsko) a koncentrace C peptidu byly stanoveny na přístroji Immulite 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA)
6. stanovení inzulinu bylo provedeno radioimunoanalýzou (Imunotech, Praha, Česká republika)
7. stanovení interleukinu IL-6 pomocí ELISA metody (Quantikine HS Heman IL-6)
8. test funkční zdatnosti nadledvin byl proveden tzv. zkráceným ACTH stimulačním testem. Byl proveden stanovením hladiny kortizolu v séru (Immulite 2000) bez stimulace v ranních hodinách (7:00 hod). Následně byla provedena aplikace ACTH intravenózně (Synacthen, Novartis, Švýcarsko, amp. 1 ml/0,25 mg v 50 ml Glc 5% perfuzorem na 30 min) a poté za 60 min po stimulaci byl proveden druhý odběr na hladinu kortizolu v séru.

Hodnocení: pro hodnocení nadledvinkové insuficience jsme použili jako kritéria hladinu kortizolu v séru bez stimulace < než 250 µg/L, a vzestup kortizolu po stimulaci < než 2-násobek basální hladiny kortizolu. Test možno provést kdykoliv během dne, pacient nemusí být nalačno.

9. funkční zdatnost granulocytů byla sledována pomocí „oxidative burst“ testu schopnosti oxidativního vzplanutí. Oxidativní vzplanutí je odpovědí fagocytárních buněk na stimulaci. Je základem nespecifického obranného mechanismu proti bakteriím. Jedná se o řadu reakcí, při nichž jsou za spoluúčasti NADPH oxidázy tvořeny superoxidové ionty, které přechází na peroxid vodíku a jiné reaktivní radikály. Konečné produkty tohoto procesu jsou vysoce toxické pro mikroorganismy a jsou podstatou baktericidie. Test oxidativního vzplanutí je založen na stimulaci granulocytů solubilním stimulans phorbol-myristat acetátem (PMA). Vznik oxidativních produktů je detekován dihydrorhodaminem 123 (DHR 123), který se oxiduje z nefluorescentní

formy na rhodamin 123, který vykazuje fluorescenci detekovatelnou při 530 nm (měřeno průtokovým cytometrem Beckman Coulter, Mnichov Německo). Výsledkem je procento buněk, které je schopno odpovídat na stimulaci tvorbou kyslíkových radikálů.

## **4.5 Statistika**

Výsledky byly zpracovány statistickým programem Sigmastat 3.1 (Systat software, USA) . Ke zpracování dat byla použita One Way Anova repeated measures (Holm-Sidak test), dále test lineární regrese se stanovením koeficientu determinace, Mann-Whitney test. Za statisticky významnou byla považována hodnota  $p < 0,05$ . Grafická zobrazení jsou prezentována formou krabicových grafů.

## 5. Výsledky

Vstupní profil celkového cholesterolu a cholesterolových prekurzorů byly porovnány se stejným profilem skupiny kardiologicky i jinak zdravých dobrovolných dárců krve.

Výsledky shrnuje tab. č.3.

|  | Dárci krve |       | Skupina kardiochirurgie |       | Skupina traumat |       |
|--|------------|-------|-------------------------|-------|-----------------|-------|
|  | průměr     | ± SD  | průměr                  | ± SD  | průměr          | ± SD  |
| TC (mmol/l)                                      | 4,921      | 1,094 | 3,559                   | 1,130 | 2,960           | 0,963 |
| Skvalen (μmol/l)                                 | 1,162      | 0,906 | 1,993                   | 0,95  | 1,962           | 1,189 |
| Lathosterol (μmol/l)                             | 7,769      | 4,896 | 2,994                   | 1,738 | 4,300           | 1,982 |
| campesterol (μmol/l)                             | 10,254     | 4,249 | 4,514                   | 1,861 | 3,706           | 1,544 |
| β-sitosterol (μmol/l)                            | 5,044      | 2,553 | 3,404                   | 1,388 | 2,915           | 1,517 |
| poměr skvalen/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )        | 0,236      | 0,174 | 0,612                   | 0,369 | 0,627           | 0,392 |
| poměr lathosterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )    | 1,623      | 1,024 | 0,867                   | 0,408 | 1,423           | 0,652 |
| poměr<br>campesterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> ) | 2,142      | 0,905 | 1,331                   | 0,588 | 1,250           | 0,519 |
| poměr β-sitosterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )   | 1,043      | 0,527 | 1,023                   | 0,483 | 0,970           | 0,417 |

Tab. č.3 Výchozí koncentrace cholesterolu a prekurzorů cholesterolu - deskriptivní statistika (data jsou prezentována jako průměr a ± SD – standardní odchylka) TC – celkový cholesterol

## 5.1 Kardiochirurgická skupina

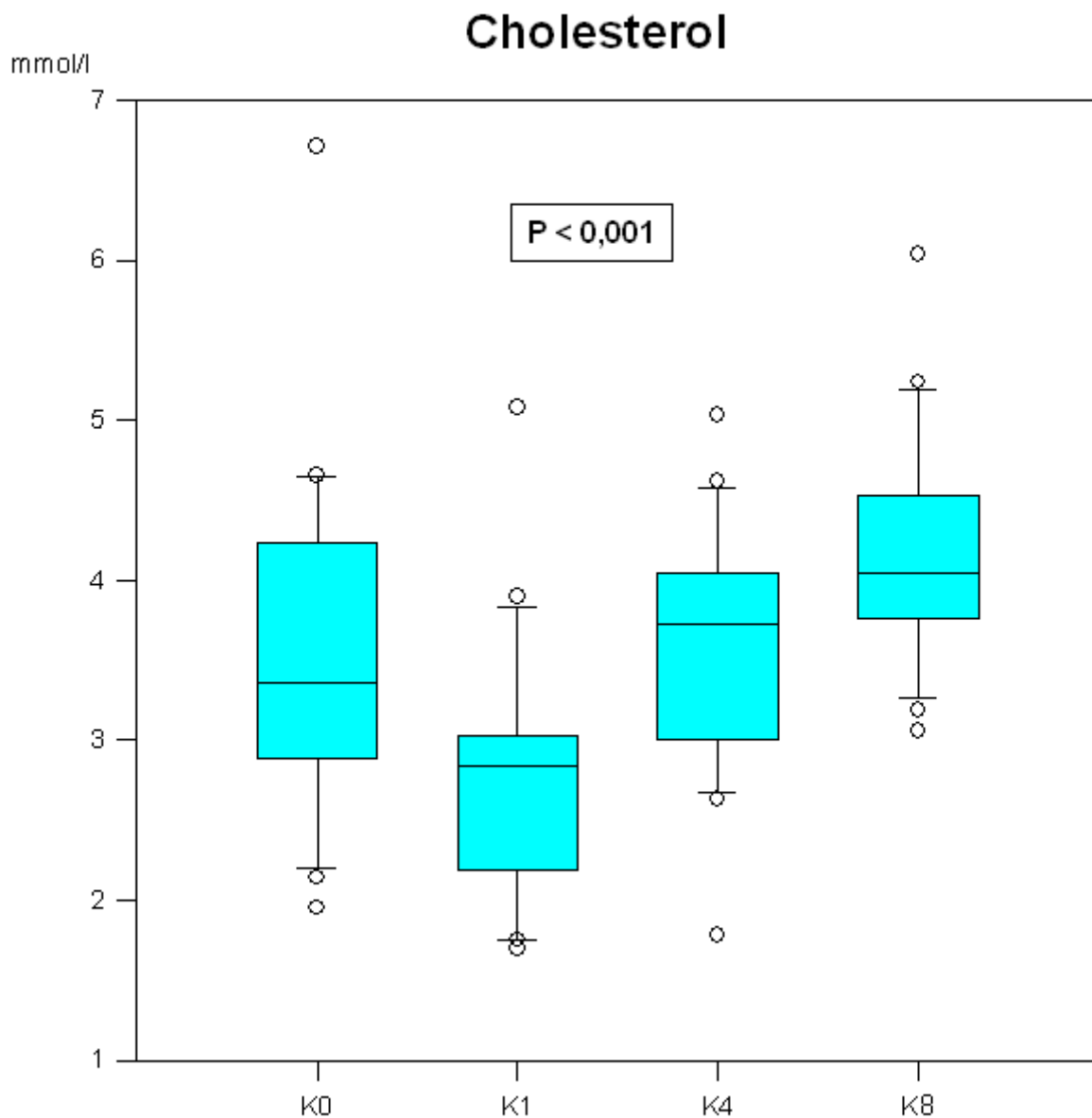
Souhrn výsledků (deskriptivní statistika) je uveden v tabulkách 4 a 5.

|  | 0 den  |       | 1 den  |       | 4 den  |       | 8 den  |       |
|--|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
|  | průměr | ± SD  | průměr | ± SD  | průměr | ± SD  | průměr | ± SD  |
| TC (mmol/l)                                    | 3,559  | 1,130 | 2,687  | 0,785 | 3,527  | 0,704 | 4,094  | 0,559 |
| HDL (mmol/l)                                   | 0,853  | 0,316 | 0,879  | 0,226 | 0,805  | 0,229 | 0,689  | 0,145 |
| LDL (mmol/l)                                   | 2,171  | 0,681 | 1,400  | 0,703 | 1,900  | 0,681 | 2,652  | 0,573 |
| TAG (mmol/l)                                   | 1,575  | 0,779 | 0,998  | 0,419 | 1,519  | 0,358 | 1,809  | 0,660 |
| Skvalen (μmol/l)                               | 1,993  | 0,95  | 1,895  | 0,631 | 1,925  | 0,726 | 1,833  | 0,94  |
| Lathosterol (μmol/l)                           | 2,994  | 1,738 | 2,897  | 1,185 | 3,967  | 1,947 | 5,962  | 3,712 |
| campesterol (μmol/l)                           | 4,514  | 1,861 | 3,658  | 1,594 | 4,062  | 1,533 | 4,504  | 1,789 |
| β-sitosterol (μmol/l)                          | 3,404  | 1,388 | 3,079  | 1,239 | 3,305  | 1,280 | 3,247  | 1,482 |
| poměr skvalen/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )      | 0,612  | 0,369 | 0,728  | 0,220 | 0,554  | 0,193 | 0,455  | 0,225 |
| poměr lathosterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )  | 0,867  | 0,408 | 1,115  | 0,422 | 1,110  | 0,481 | 1,436  | 0,927 |
| poměr campesterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )  | 1,331  | 0,588 | 1,424  | 0,706 | 1,189  | 0,516 | 1,113  | 0,462 |
| poměr β-sitosterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> ) | 1,023  | 0,483 | 1,229  | 0,608 | 0,968  | 0,451 | 0,800  | 0,372 |

Tab. č.4. Koncentrace cholesterolu a prekurzorů cholesterolu v kardiochirurgické skupině  
(data jsou prezentována jako průměr a ± SD – standardní odchylka)

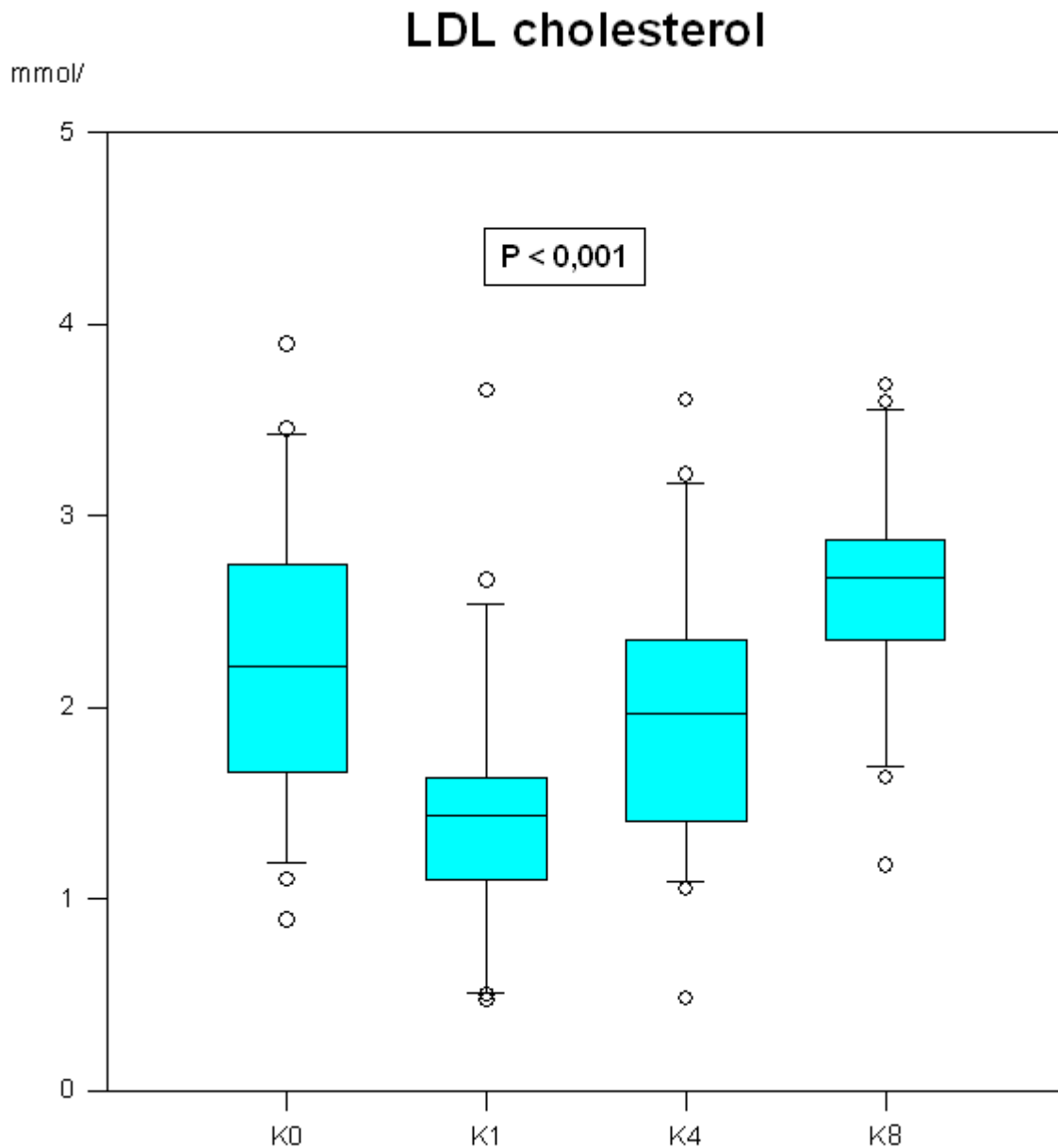
TC – celkový cholesterol, TAG - triacylglyceroly

V kardiokirurgické skupině došlo ke staticky významné změně v plasmatické koncentraci celkového cholesterolu (TC) a to tak, že v D1 došlo k prudkému poklesu hladiny TC s postupnou úpravou v průběhu 8 sledovaných dnů. Statisticky vysoce signifikantní byl rozdíl v koncentracích TC mezi D0 vs D1, D0 vs D8, D1 vs D4, D1 vs D8 a D4 vs D8. Trend vývoje ukazuje graf č.1



*Graf č. 1 Změny v plasmatické koncentraci celkového cholesterolu (TC – total cholesterol) v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiokirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

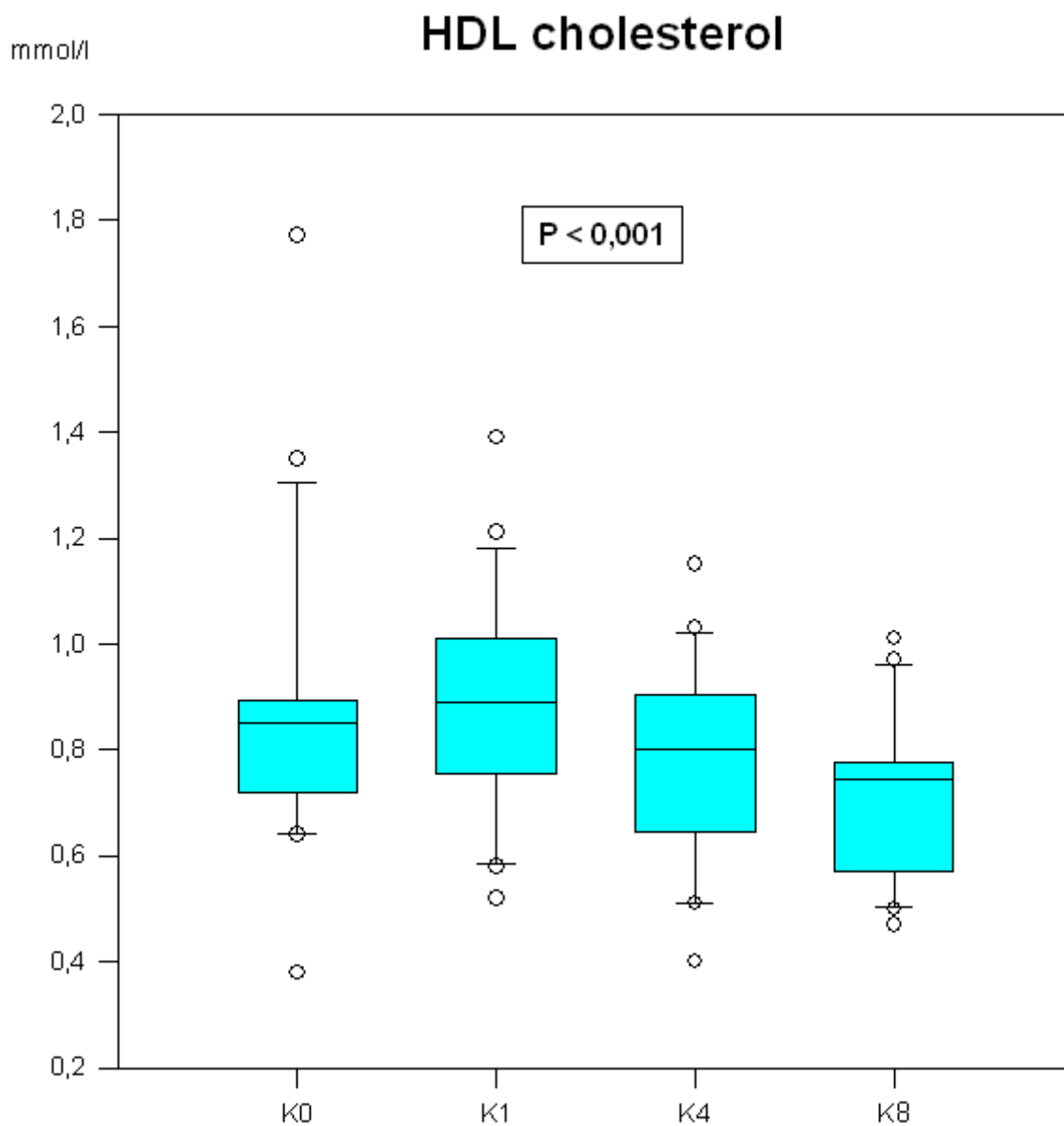
Obdobná situace jako u celkového cholesterolu, byla zaznamenána také v měřených koncentracích LDL. I zde došlo ke statisticky významné změně s prudkým poklesem v prvním dnu a následným vzestupem během sledovaného období 8 dnů. Statisticky významné byly změny mezi D0 vs D1, D0 vs D8, D1 vs D4, D1 vs D8 a D4 vs D8. Trend vývoje je uvedený v grafu č. 2.



*Graf č.2 Změny v koncentraci LDL cholesterolu v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

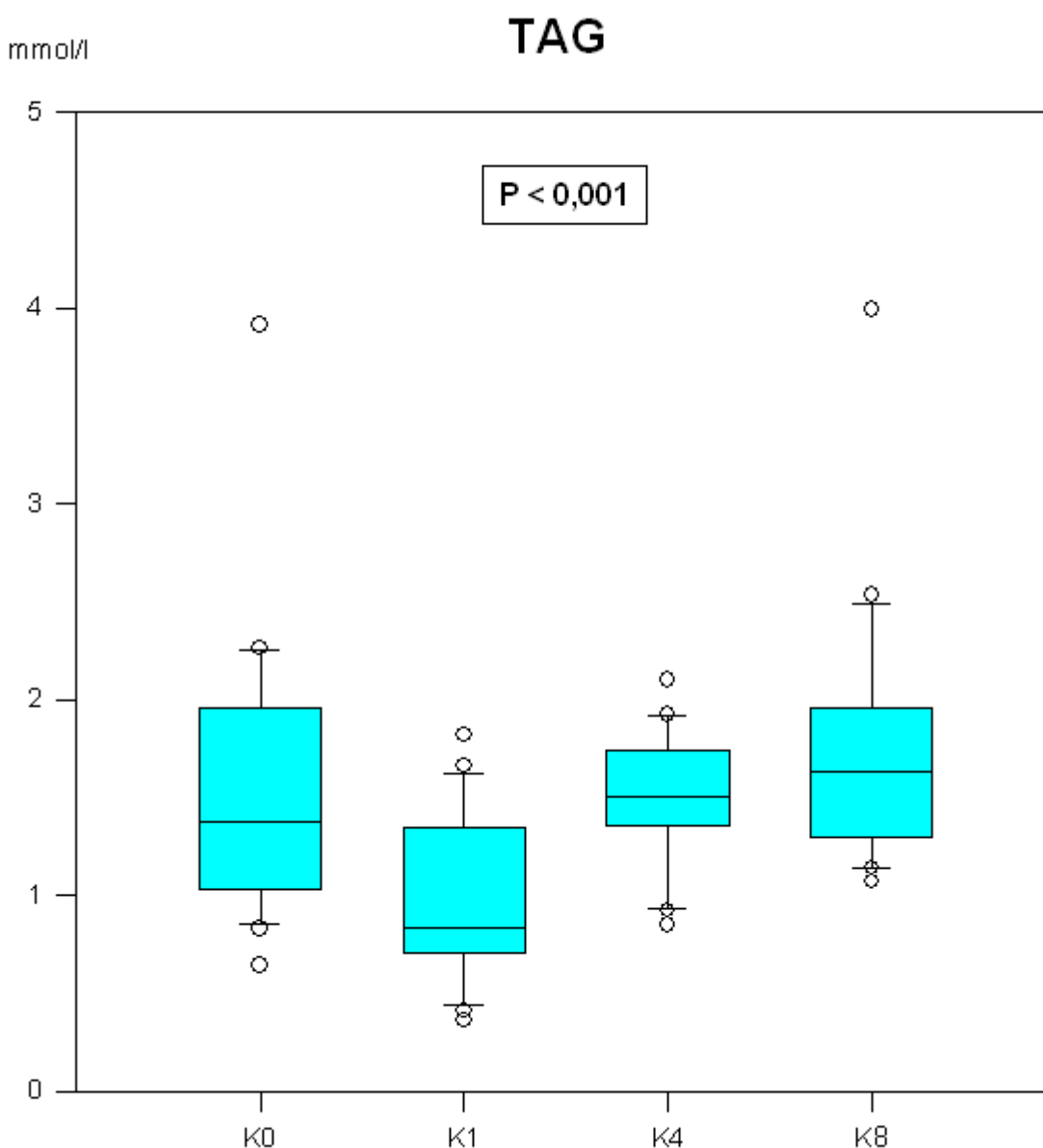


V plasmatických koncentracích HDL cholesterolu byl zaznamenán ztelný sestupný trend během celé doby sledování. Statisticky významné změny v HDL cholesterolu byly nalezeny mezi D0 vs D8 a D1 vs D8. Trend vývoje ukazuje graf č. 3.



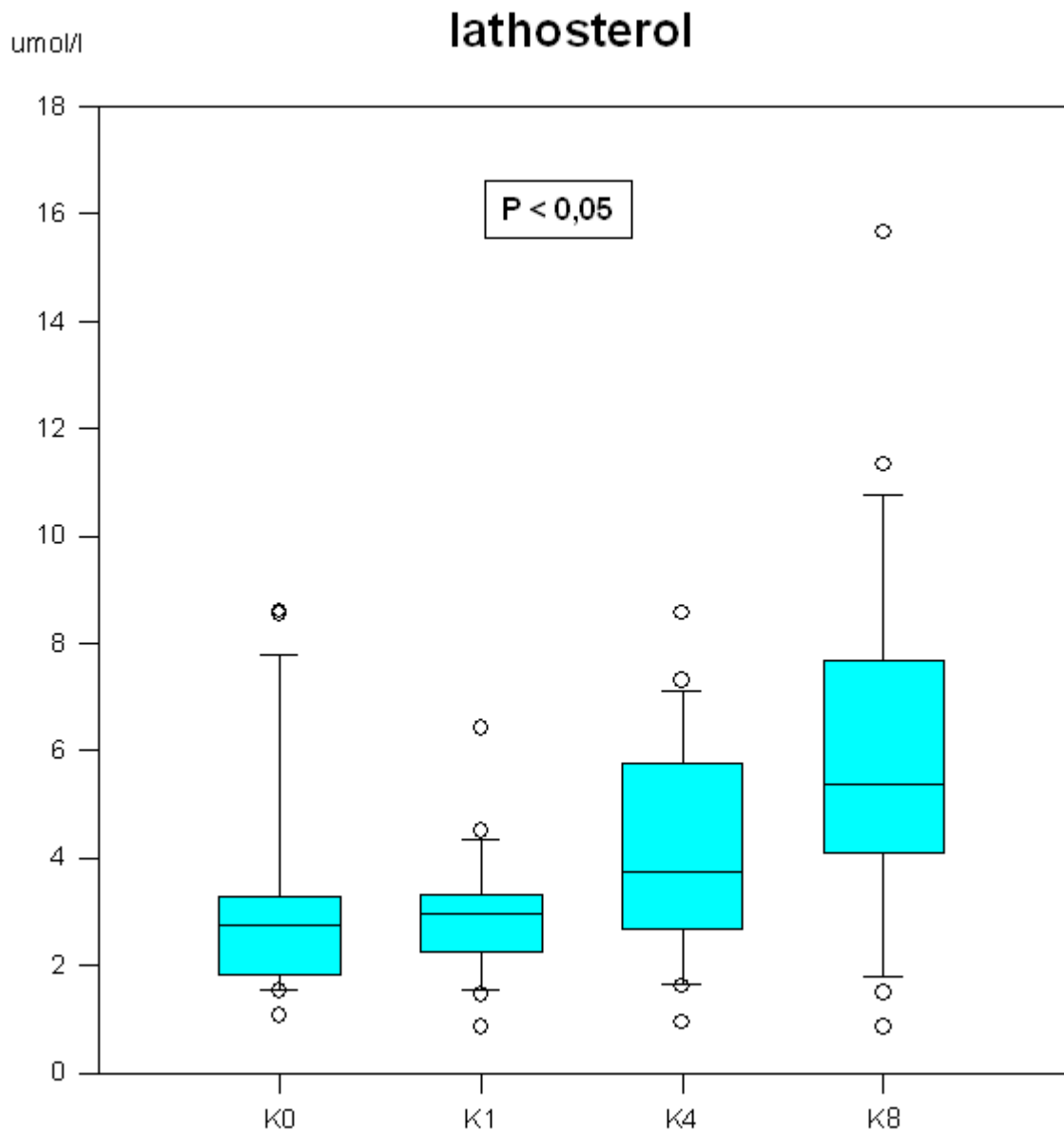
*Graf č.3 Změny v koncentracích HDL cholesterolu v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiologické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

V plasmatických hladinách triacylglyceridů (TAG) došlo ke statisticky významným změnám s tím, že vysoce statisticky významná změna byla mezi D0 vs D1, D1 vs D4 a D1 vs D8. Trendově změna TAG kopírovala změny v TC a LDL cholesterolu. Maximální hladiny TAG v průměru nepřekročily arbitrálně stanovené fyziologické rozmezí. Trend vývoje zobrazuje graf č. 4.



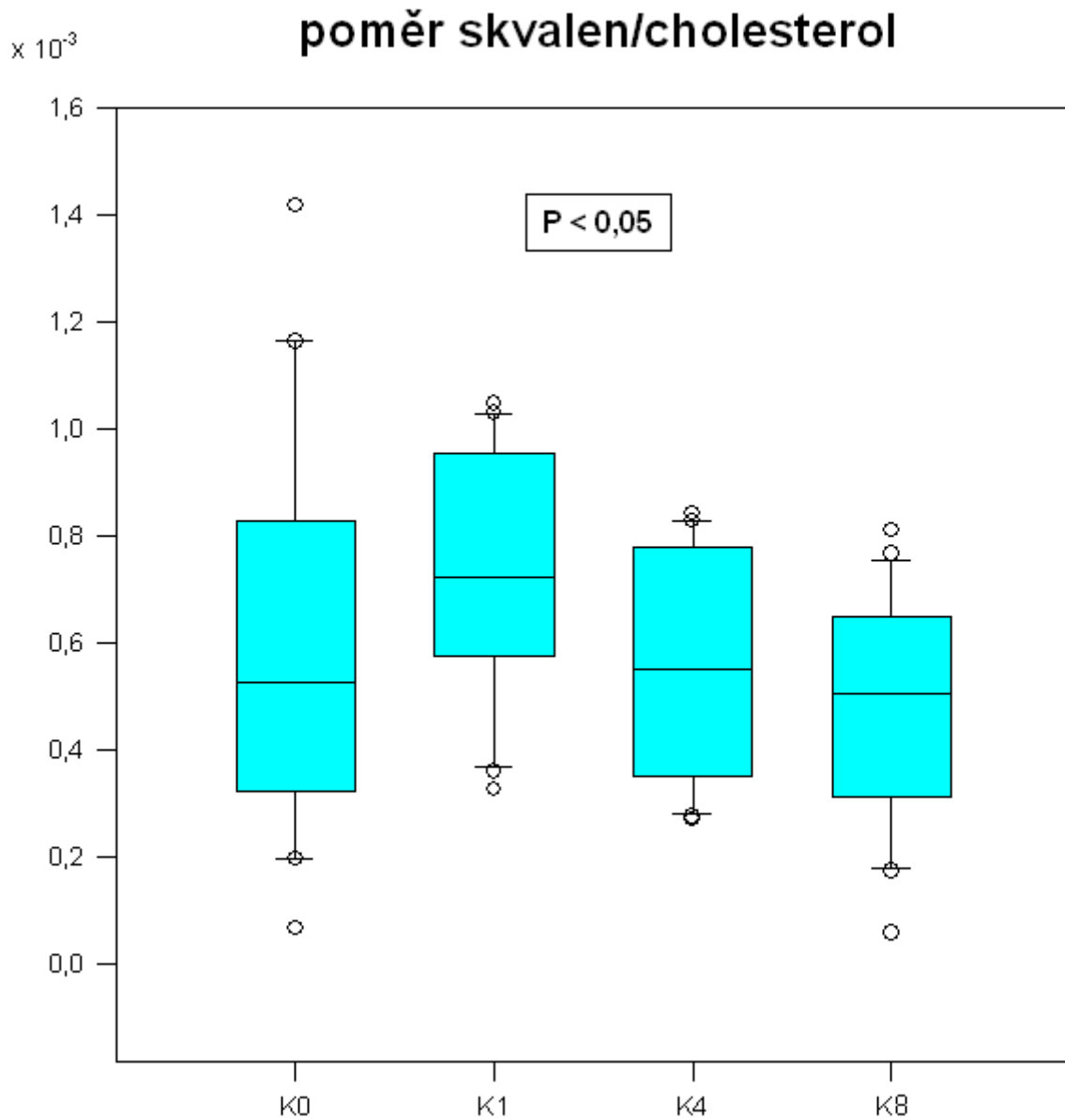
Graf č.4 Změny v koncentracích TAG v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace

V oblasti prekurzorů endogenní syntézy cholesterolu byl zaznamenán přechodný pokles 1 den sledování s následným vzestupným trendem v koncentracích lathosterolu. Statisticky vysoce signifikantní byly změny mezi D0 vs D4, D0 vs D8, D1 vs D4 a D1 vs D8. Trend vývoje ukazuje graf č. 5.



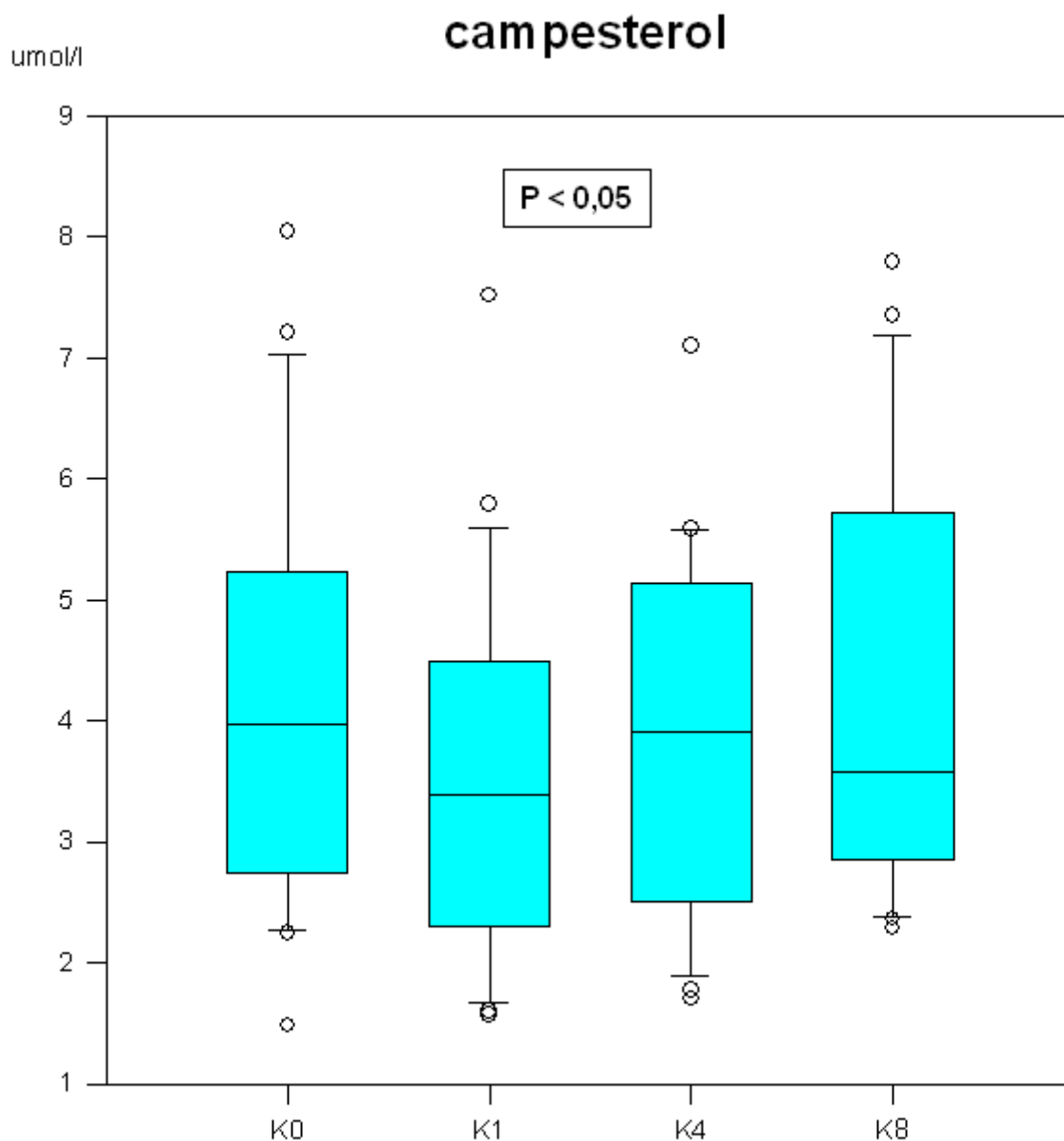
*Graf č.5 Změny v koncentracích lathosterolu v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

V plasmatických koncentracích skvalenu nebyly zaznamenány statisticky významné změny, zato v poměru skvalen/TC dosáhly změny statistické významnosti mezi D1 vs D4 a D1 vs D8. Trendové změny jsou v grafu č. 6.

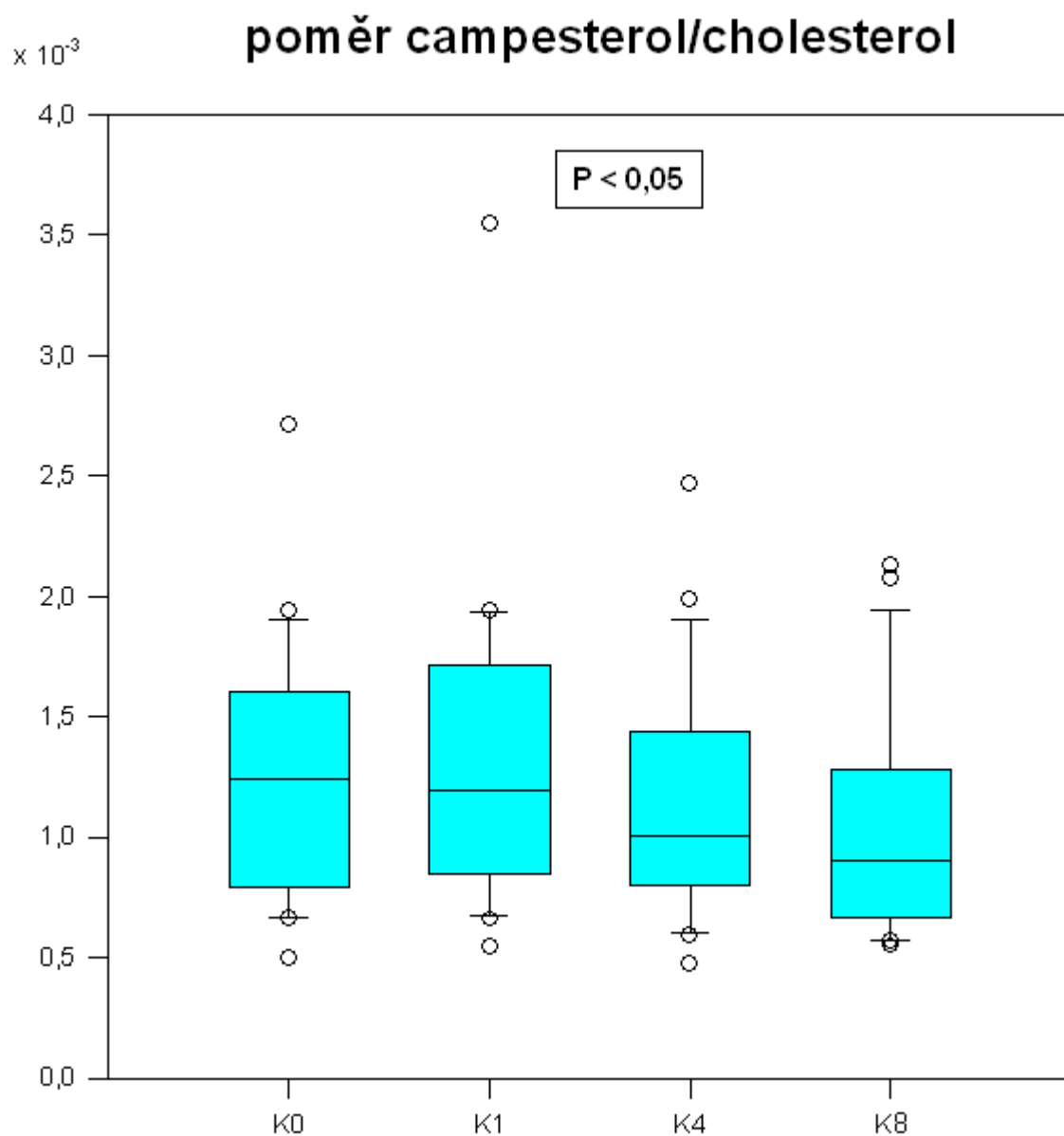


*Graf č.6 Změny v poměru skvalen/cholesterol v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

V markrech absorpce cholesterolu, vyjádřené plasmatickou koncentrací campesterolu, byl zaznamenán pokles první den po operaci s postupným vzestupem k původním hladinám během sledovaného období. Statisticky významná byla změna v campesterolu mezi D0 vs D1 a D1 vs D8. Statistické významnosti dosáhly změny v poměru campesterol/TC mezi D0 vs D8 a D1 vs D8. Trendové změny ukazují grafy č. 7 a 8.

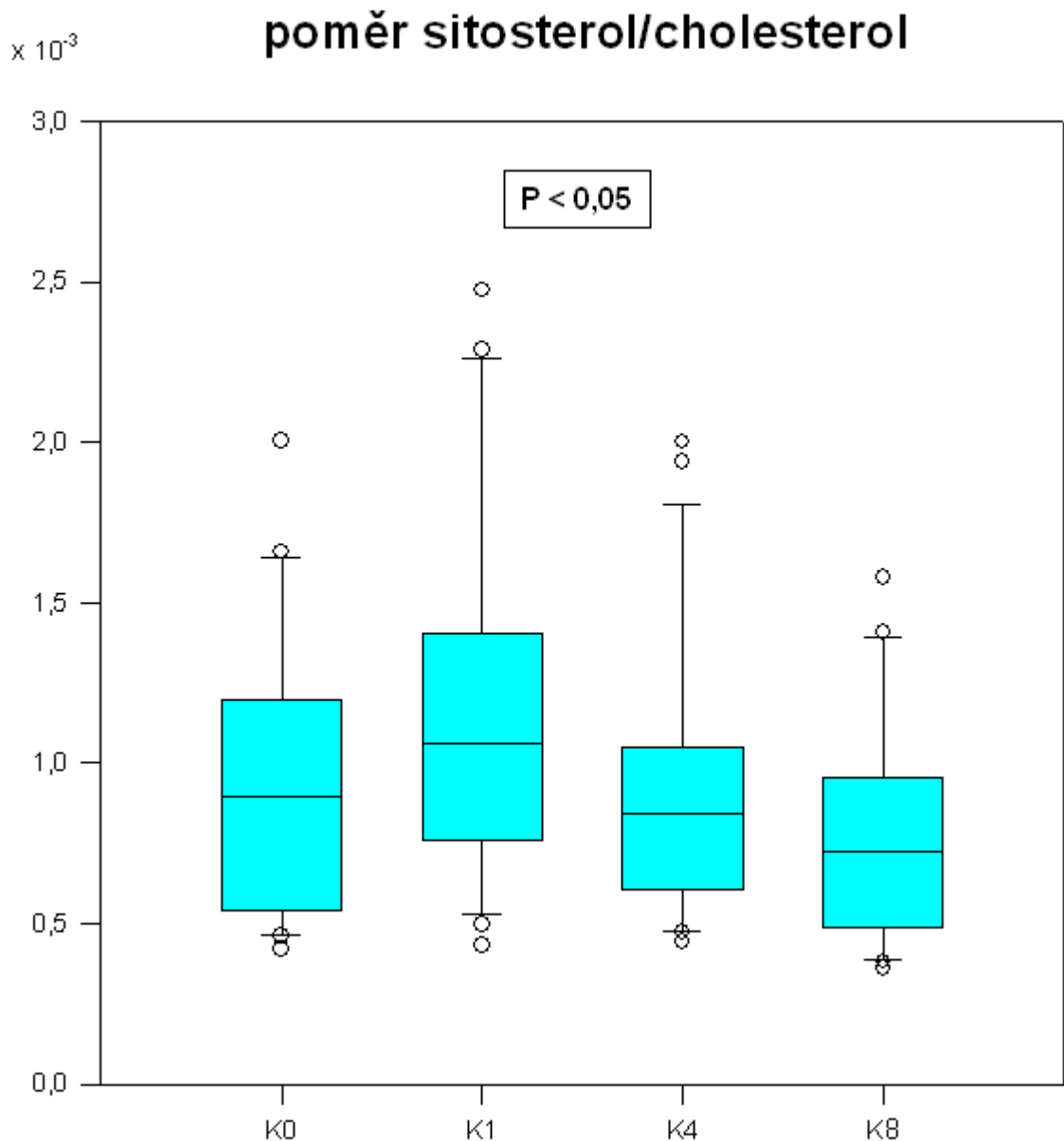


*Graf č.7 Změny v koncentraci campesterolu v průběhu 8 sledovaných dní v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*



*Graf č.8 Změny v poměru campesterol/cholesterol v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiologické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

V plasmatických hladinách  $\beta$ -sitosterolu byl zaznamenán vzestup v období D1 a D4, změny však nedosáhly statistické významnosti. Na druhé straně v poměru  $\beta$ -sitosterol/TC bylo dosaženo statisticky významných změn mezi D0 vs D1, D0 vs D8, D1 vs D4, D1 vs D8 a D4 vs D8. Trendové změny zobrazuje graf č. 9.



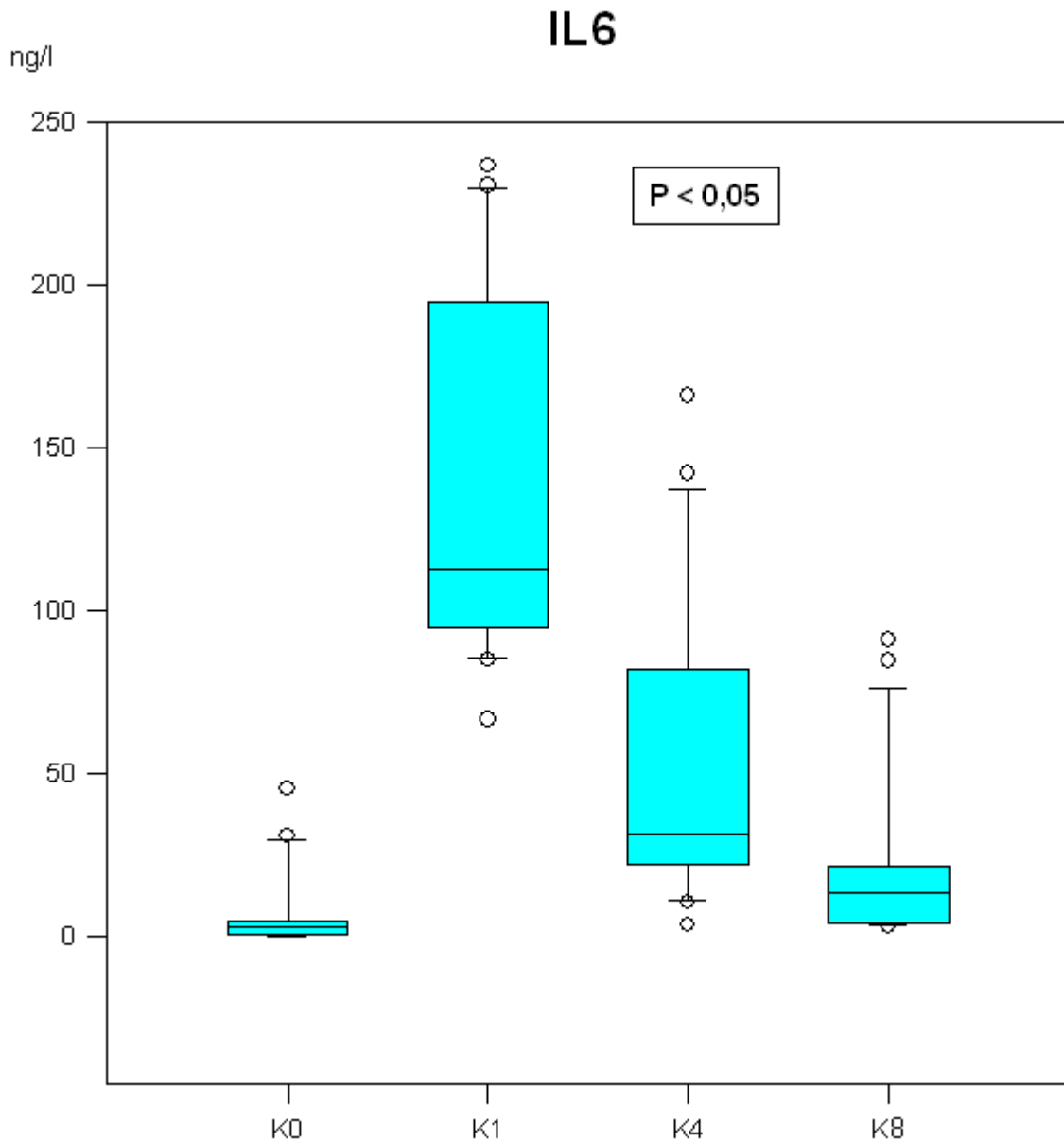
*Graf č.9 Změny v poměru sitosterol/cholesterol v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiokirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

|                            | 0 den  |        | 1 den   |        | 4 den   |         | 8 den  |        |
|----------------------------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|
|                            | průměr | ± SD   | průměr  | ± SD   | průměr  | ± SD    | průměr | ± SD   |
| IL - 6 (ng/l)              | 8,831  | 13,017 | 130,194 | 65,069 | 70,318  | 64,081  | 16,265 | 19,686 |
| Kortizol I (nmol/l)        |        |        |         |        | 671,091 | 186,326 |        |        |
| Kortizol II (nmol/l)       |        |        |         |        | 515,556 | 234,292 |        |        |
| CRP (mg/l)                 | 6,75   | 18,524 | 90,00   | 42,773 | 145,706 | 92,536  | 36,765 | 21,542 |
| TP (g/l)                   | 60,438 | 9,250  | 56,871  | 4,530  | 62,253  | 5,215   | 67,041 | 5,010  |
| Albumin (g/l)              | 37,250 | 5,125  | 33,335  | 2,946  | 35,024  | 3,614   | 37,371 | 4,259  |
| prealbumin (g/l)           | 0,241  | 0,067  | 0,211   | 0,051  | 0,209   | 0,259   | 0,216  | 0,067  |
| stimulovaný burst test (%) | 96,3   | 0,001  | 93,753  | 3,173  | 89,3    | 7,908   | 82,6   | 6,207  |

Tab. č. 5 Koncentrace markerů nutrice a zánětu v kardiochirurgické skupině (data jsou prezentována jako průměr a ± SD – standardní odchylka), TP – celkový protein

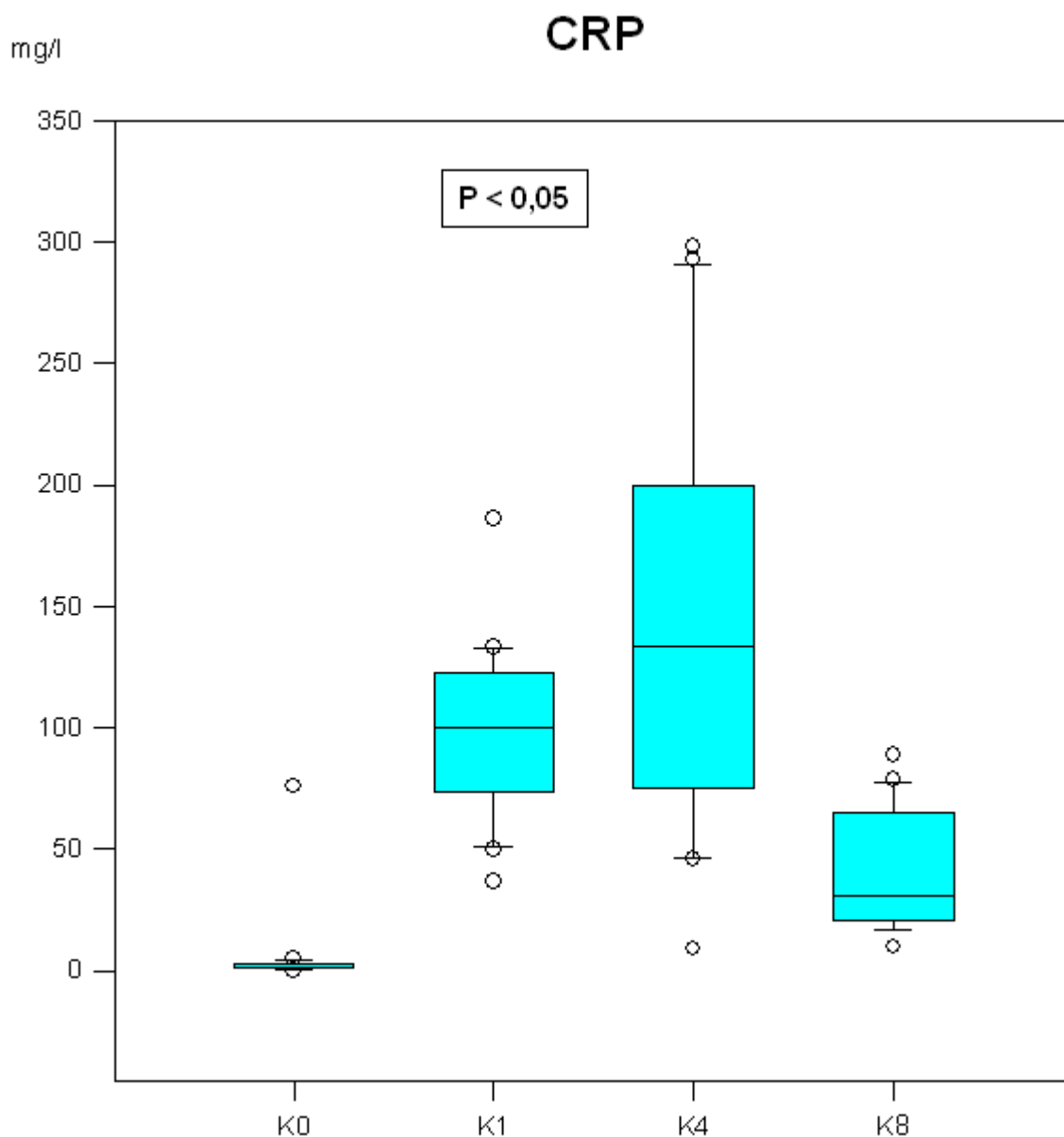


Dynamika změn v plasmatických koncentracích interleukinu IL-6 korespondovala se stresovou zátěží a bylo dosaženo statisticky významných změn s tím, že nejvyšší koncentrace IL-6 kulminovala první pooperační den a následně docházelo k poklesu. Statisticky významných změn bylo dosaženo mezi D0 vs D1 a D4, D1 vs D4 a D8, D4 vs D8. Trendové změny ukazuje graf č. 10.



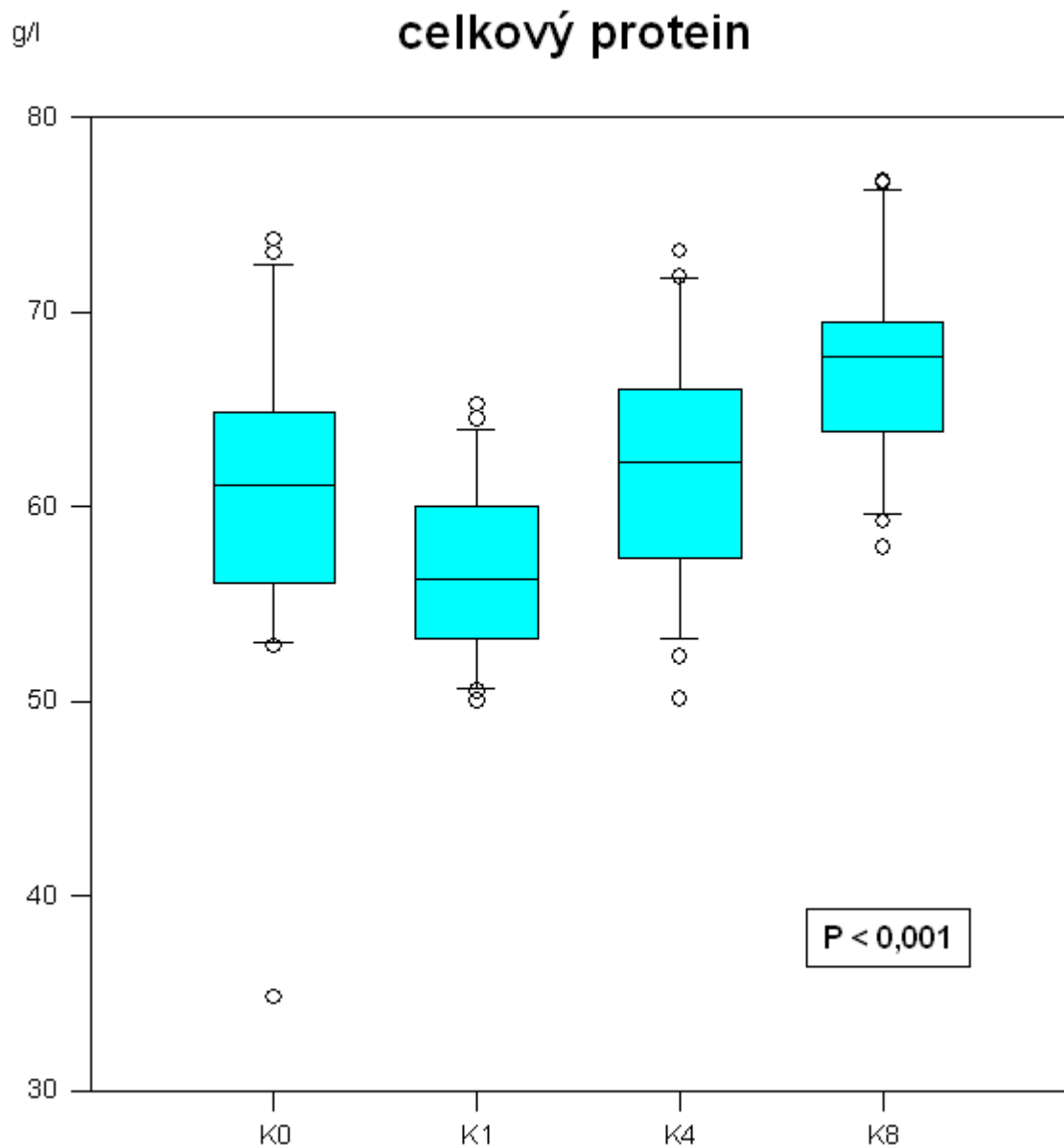
Graf č.10 Změny v koncentraci interleukinu IL-6 v průběhu 8 sledovaných dní v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace

V syntéze bílkovin akutní fáze (CRP) došlo k identickým změnám jako v produkci IL-6 s tím, že CRP stoupalo první 4 dny s následným postupným poklesem. Změny byly vysoce statisticky významné mezi D0 vs D1, D4, D8; D1 vs D4, D8; D4 vs D8. Trendové změny jsou zobrazeny v grafu č. 11.



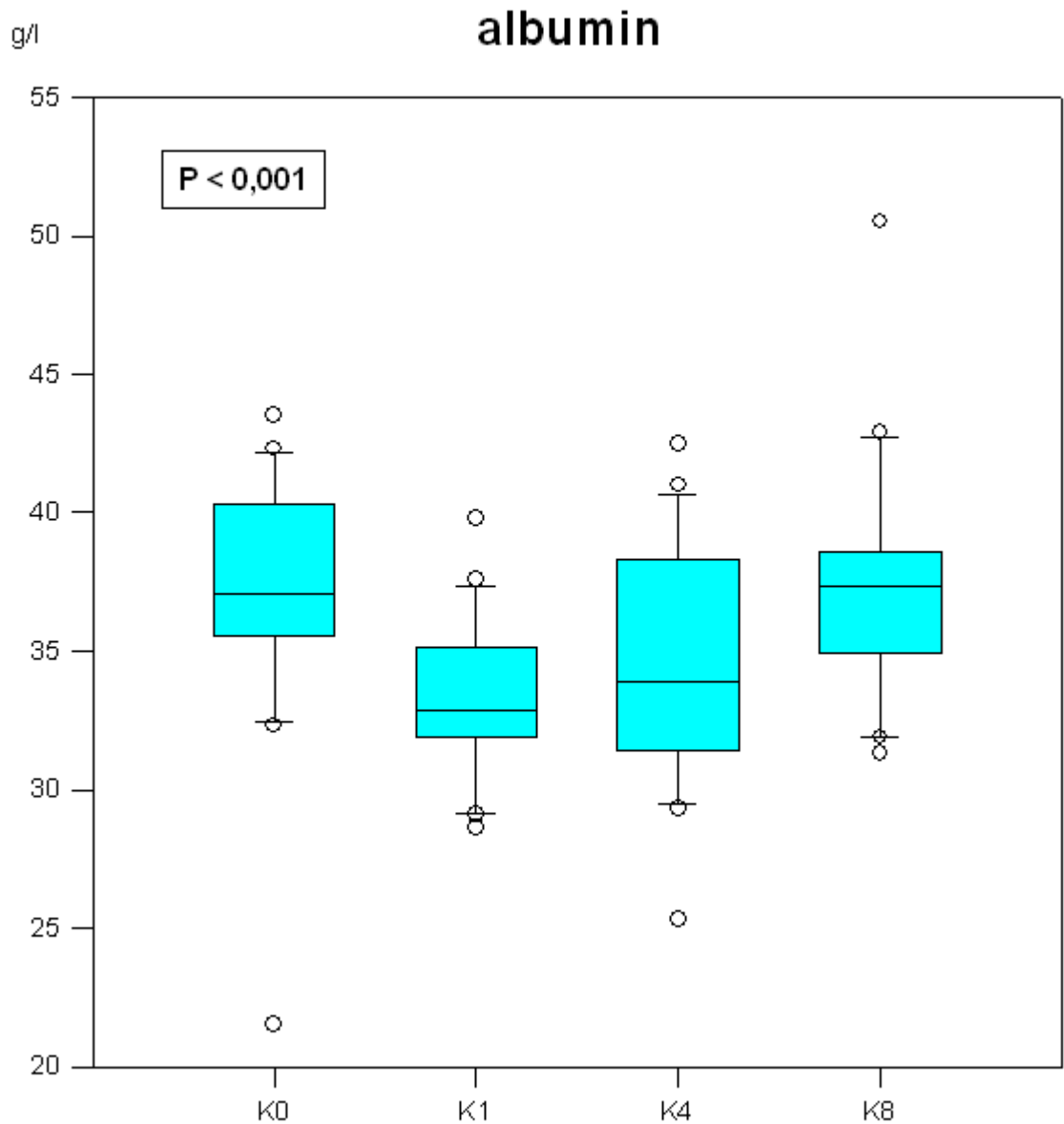
Graf č.11 Změny v koncentraci CRP v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace

Statisticky signifikantních změn bylo dosaženo i v tzv. negativních reaktantech akutní fáze. V celkovém proteinu (TP – total protein) došlo první den k poklesu s následným postupným vzestupem během sledovaného období. Statistické významnosti změny bylo dosaženo mezi D0 vs D1 a D4, dále pak mezi D1 vs D8 a D4 vs D8. Trendové změny ukazuje graf č. 12.



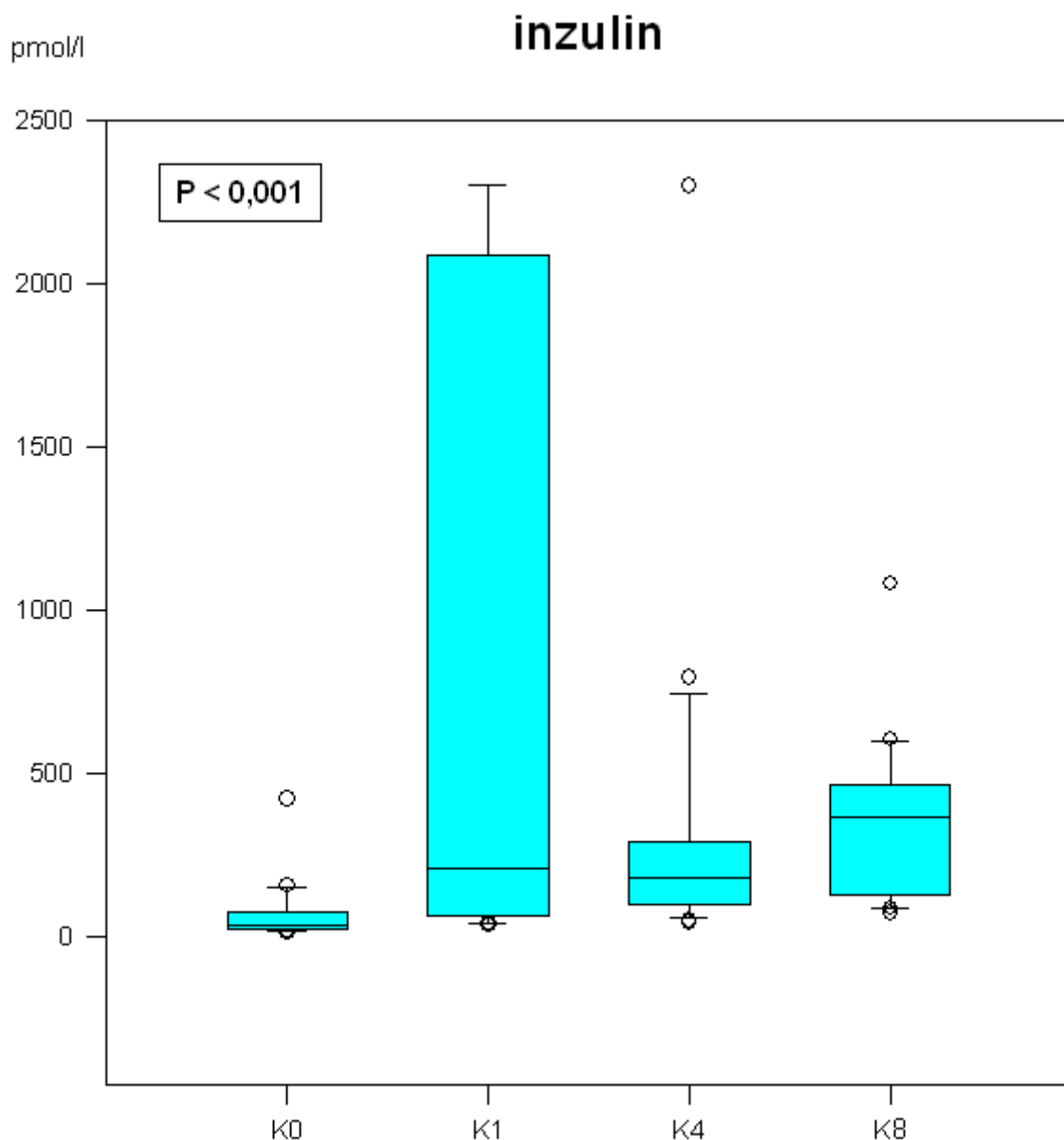
Graf č.12 Změny v koncentraci celkového proteinu v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace

V plasmatických koncentracích albuminu (bílkovina s kratším biologickým poločasem) bylo dosaženo taktéž statisticky významných změn mezi D0 vs D1, D1 vs D8. Trendové změny ukazuje graf č. 13. V plasmatických koncentracích prealbuminu (bílkovina s nejkratším biologickým poločasem) došlo k trendově stejným změnám jako u předchozích bílkovin, změny však byly na hranici statistické významnosti.

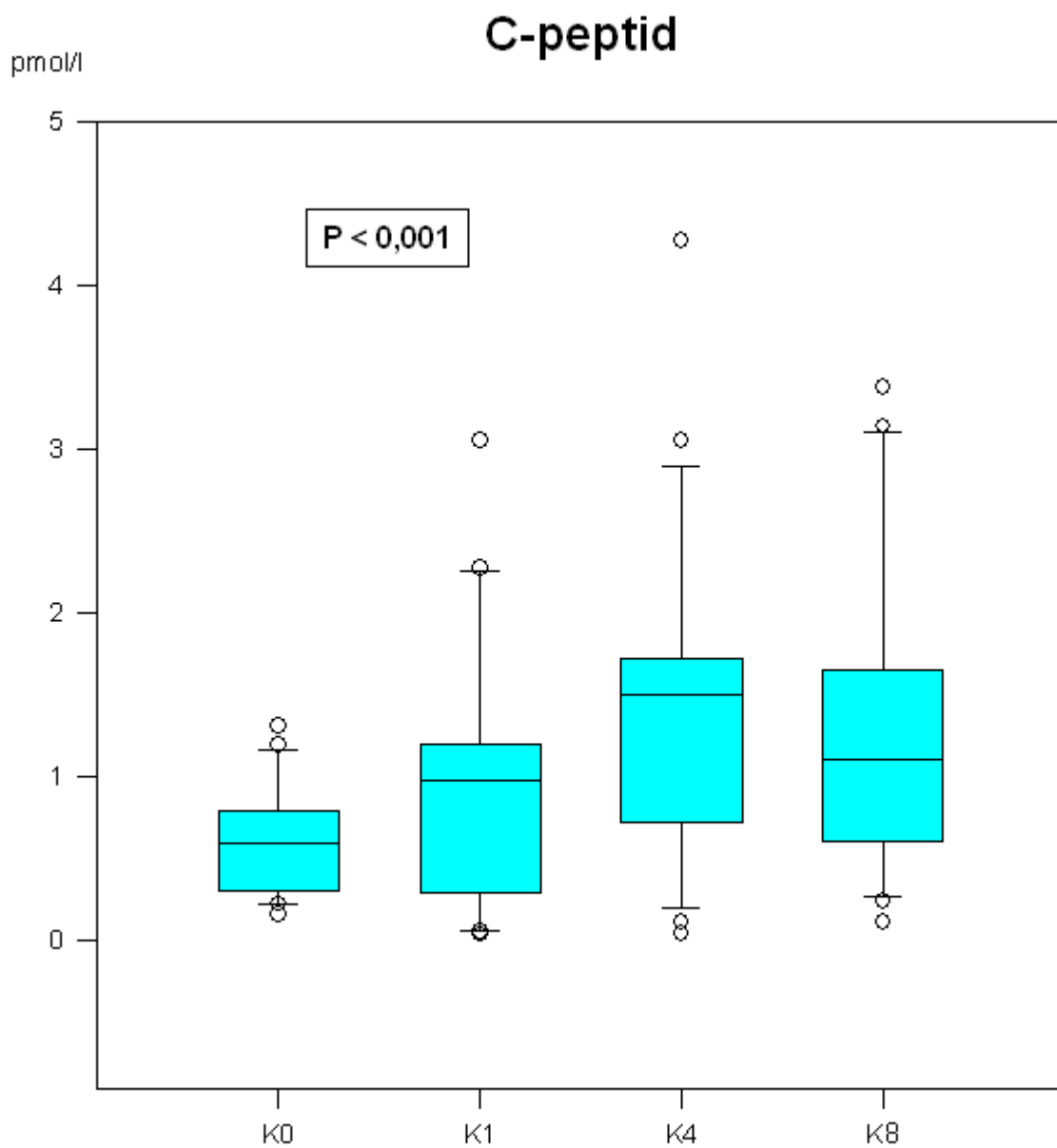


Graf č.13 Změny v koncentraci albuminu v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiologické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace

V plasmatických koncentracích imunoreaktivního inzulínu došlo během sledovaného období u nemocných k vysokému peaku první pooperační den, následně trendově docházelo k mírnému vzestupu oproti výchozím hodnotám. K odlišení externě podaného inzulínu (ve skupině kardiochirurgické bylo 8 diabetiků II. typu na PAD) byly stanoveny také hladiny C peptidu, které během 4 pooperačních dnů dosáhly maxima s následným poklesem na konci sledovaného období. V koncentraci inzulínu bylo dosaženo statisticky významných změn mezi D0 vs D1, D1 vs D4 a D8. V koncentraci C peptidu bylo dosaženo statisticky významných změn mezi D0 vs D4 a D0 vs D8. Trendové změny ukazují grafy č. 14 a 15.

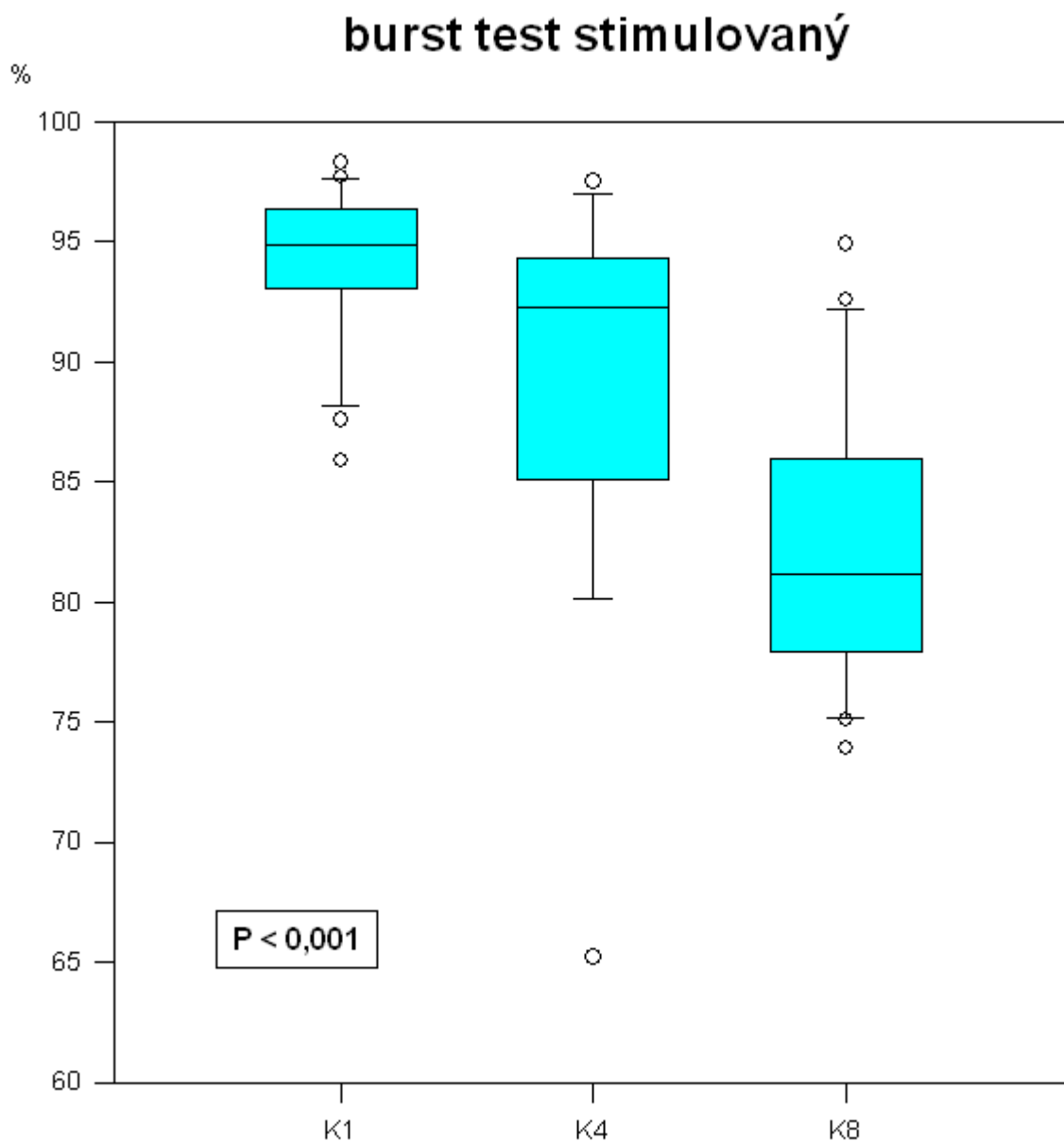


*Graf č.14 Změny v koncentraci inzulínu v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*



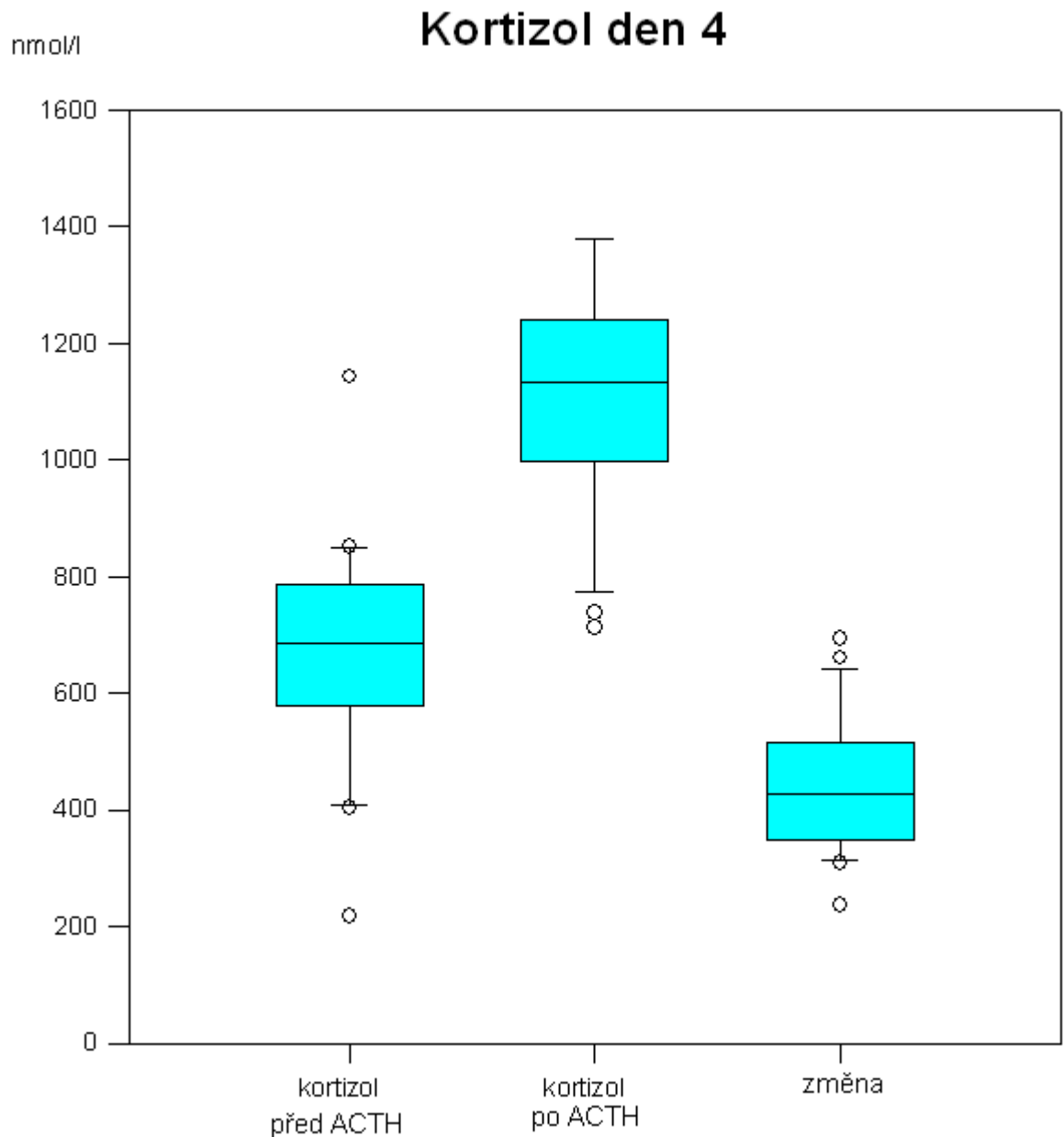
*Graf č.15 Změny v koncentraci C-peptidu v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiologické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

Ve sledování baktericidní schopnosti leukocytů bylo pomocí stimulovaného burst testu nalezeno statisticky signifikantní snížení schopnosti tvorby kyslíkových radikálů mezi D1 vs D4, D1 vs D8 a D4 vs D8, což naznačuje poruchu iniciální fáze nespecifické imunitní reakce na bakteriální infekci. Trendové změny ukazuje graf č.16.



*Graf č.16 Trendové změny v burst stimulovaném testu v průběhu 8 sledovaných dnů v kardiochirurgické skupině, (K) 0,1,4,8 den od operace*

Jedním z cílů studie bylo prokázat absolutní nebo relativní nadledvinkovou insuficienci ve vztahu k syntéze cholesterolu. V provedeném sledování koncentrací kortizolu bez a po stimulaci došlo ke statisticky významnému vzestupu kortizolu po stimulaci, jak dokládá graf č.17. V absolutních číslech byly hladiny kortizolu nad stanovenými diskriminačními hladinami pro průkaz nadledvinkové insuficience.

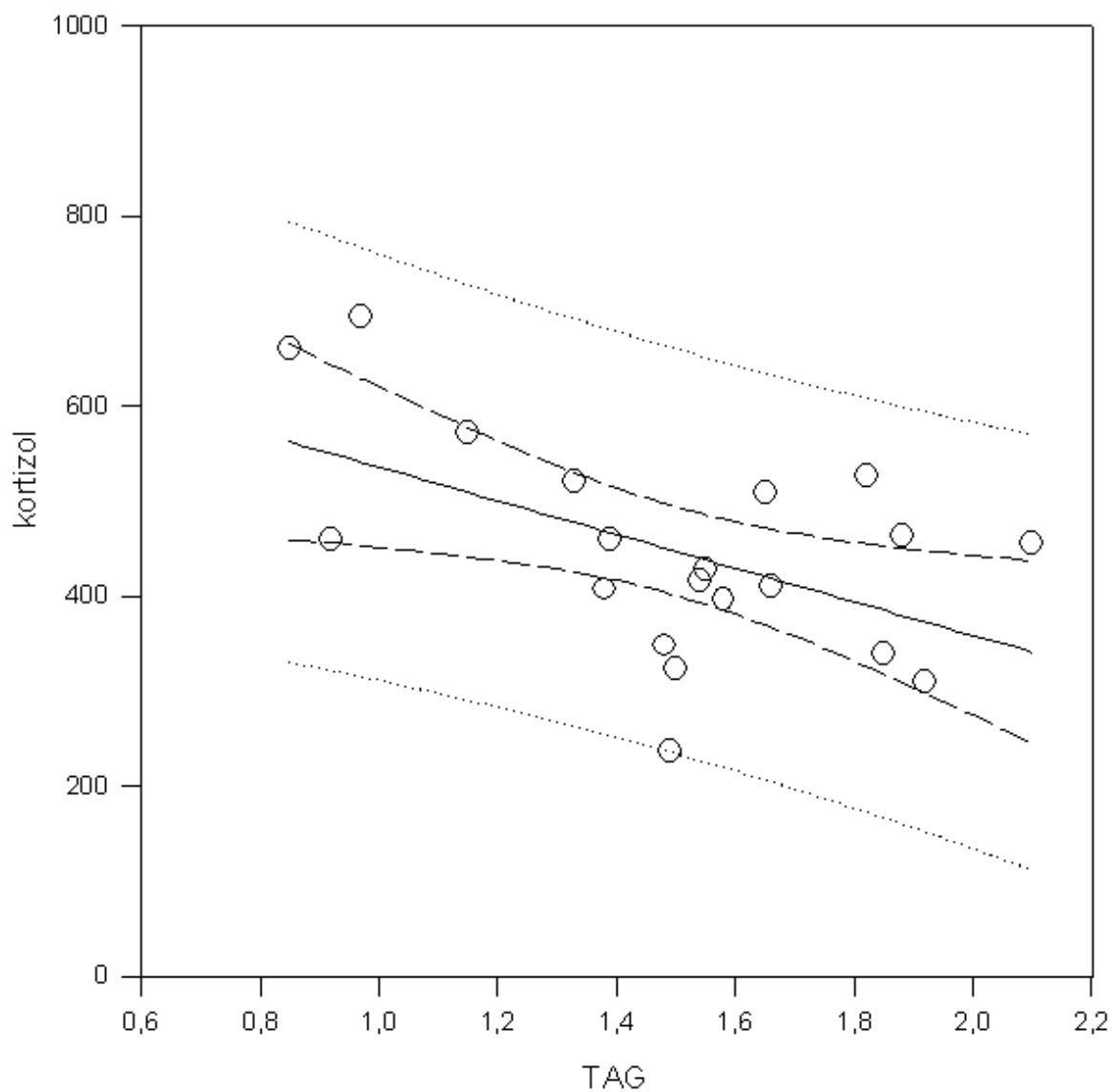


*Graf č.17 Změny v koncentraci kortizolu před a po stimulaci ACTH v kardiochirurgické skupině*



Nicméně byla nalezena statisticky významná korelace mezi změnou hladiny kortizolu po stimulaci ACTH a hladinou TAG ( $P = 0,017$  a  $R_{sq} = 0,280$ ), kterou dokládá graf č.18.

### Regrese - TAG vs. změna kortizolu



*Graf č. 18 Regresní porovnání mezi změnou koncentrace kortizolu po stimulaci ACTH a koncentrací TAG v kardiochirurgické skupině*

Přehled statistických významností změn měřených parametrů je uveden v tab.č. 6.

| <b>P</b>                                  | den 0<br>vs.<br>den 1 | den 0<br>vs.<br>den 4 | den 0<br>vs.<br>den 8 | den 1<br>vs.<br>den 4 | den 1<br>vs.<br>den 8 | den 4<br>vs.<br>den 8 |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| TC (mmol/l)                               | < 0,001               | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               |
| HDL (mmol/l)                              | ns                    | ns                    | < 0,05                | ns                    | < 0,05                | ns                    |
| LDL (mmol/l)                              | < 0,001               | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               |
| TAG (mmol/l)                              | < 0,001               | ns                    | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | ns                    |
| Skvalen (μmol/l)                          | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| lathosterol (μmol/l)                      | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | ns                    |
| Campesterol (μmol/l)                      | < 0,05                | ns                    | ns                    | ns                    | < 0,05                | ns                    |
| β-sitosterol (μmol/l)                     | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| poměr skvalen/TC ( $\cdot 10^{-3}$ )      | ns                    | ns                    | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | ns                    |
| poměr lathosterol/TC ( $\cdot 10^{-3}$ )  | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| poměr campesterol/TC ( $\cdot 10^{-3}$ )  | ns                    | ns                    | < 0,001               | ns                    | < 0,001               | ns                    |
| poměr β-sitosterol/TC ( $\cdot 10^{-3}$ ) | < 0,001               | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               |
| IL-6 (ng/l)                               | < 0,001               | < 0,001               | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               |
| CRP (mg/l)                                | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               |
| TP (g/l)                                  | < 0,001               | < 0,001               | ns                    | ns                    | < 0,001               | < 0,001               |
| albumin (g/l)                             | < 0,004               | ns                    | ns                    | ns                    | < 0,004               | ns                    |
| prealbumin (g/l)                          | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| inzulín (pmol/l)                          | < 0,001               | ns                    | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | ns                    |
| C-peptid (pmol/l)                         | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | ns                    | ns                    | ns                    |
| bazální burst test                        | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| Stimulovaný burst test (%)                | ns                    | ns                    | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               |

Tab. č. 6 Statistické signifikance v kardiochirurgické skupině

TC – celkový cholesterol, TP – celkový protein, TAG – triacylglyceroly, ns – nesignifikantní ( $p > 0,05$ )

## 5.2 Skupina polytraumat

Souhrn výsledků (deskriptivní statistika) je uveden v tabulkách 7 a 8.

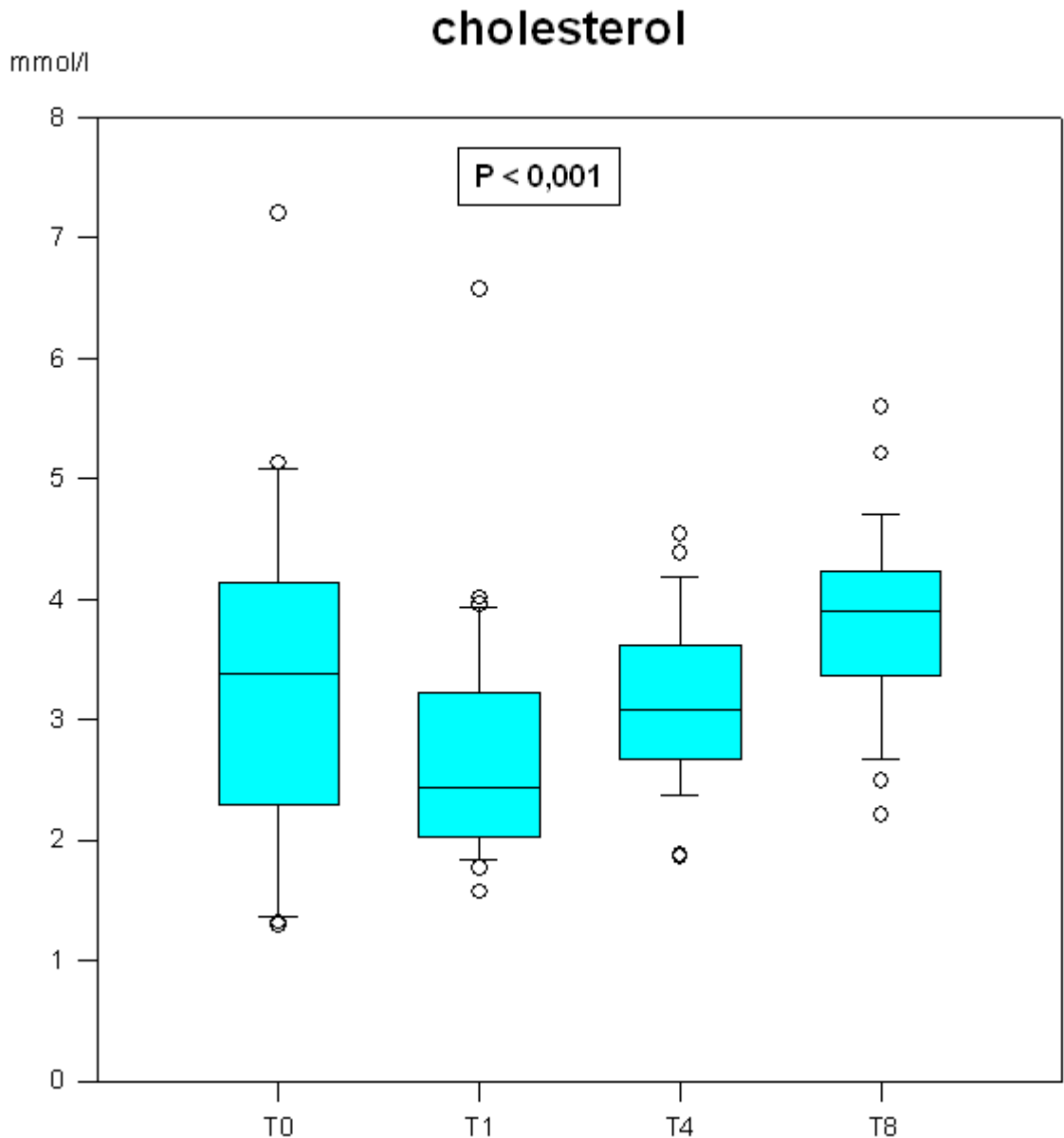
|  | Den 0  |       | Den 1  |       | Den 4  |       | Den 8  |       |
|--|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
|  | průměr | ± SD  | průměr | ± SD  | průměr | ± SD  | průměr | ± SD  |
| TC (mmol/l)                                    | 2,960  | 0,963 | 2,428  | 0,644 | 3,035  | 0,703 | 3,664  | 0,727 |
| HDL (mmol/l)                                   | 0,749  | 0,252 | 0,783  | 0,302 | 0,572  | 0,233 | 0,489  | 0,254 |
| LDL (mmol/l)                                   | 1,789  | 0,712 | 1,228  | 0,661 | 1,473  | 0,557 | 2,136  | 1,028 |
| TAG (mmol/l)                                   | 1,069  | 0,458 | 1,139  | 0,543 | 1,575  | 0,848 | 2,003  | 1,167 |
| skvalen (μmol/l)                               | 1,962  | 1,189 | 1,471  | 0,832 | 1,446  | 0,596 | 1,321  | 0,549 |
| Lathosterol (μmol/l)                           | 4,300  | 1,982 | 3,154  | 1,201 | 4,057  | 1,758 | 4,269  | 1,615 |
| campesterol (μmol/l)                           | 3,706  | 1,544 | 3,416  | 0,813 | 4,347  | 1,551 | 5,026  | 2,162 |
| β-sitosterol (μmol/l)                          | 2,915  | 1,517 | 3,385  | 1,402 | 7,415  | 5,470 | 10,421 | 7,454 |
| Poměr skvalen/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )      | 0,627  | 0,392 | 0,605  | 0,316 | 0,494  | 0,232 | 0,392  | 0,233 |
| Poměr lathosterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )  | 1,423  | 0,652 | 1,317  | 0,47  | 1,338  | 0,534 | 1,181  | 0,452 |
| Poměr campesterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> )  | 1,250  | 0,519 | 1,456  | 0,396 | 1,459  | 0,479 | 1,422  | 0,609 |
| Poměr β-sitosterol/TC<br>(· 10 <sup>-3</sup> ) | 0,970  | 0,417 | 1,479  | 0,772 | 2,434  | 1,566 | 3,025  | 2,108 |

Tab. č. 7 Koncentrace cholesterolu a prekurzorů cholesterolu ve skupině polytraumat

(data jsou prezentována jako průměr a ± SD – standardní odchylka)

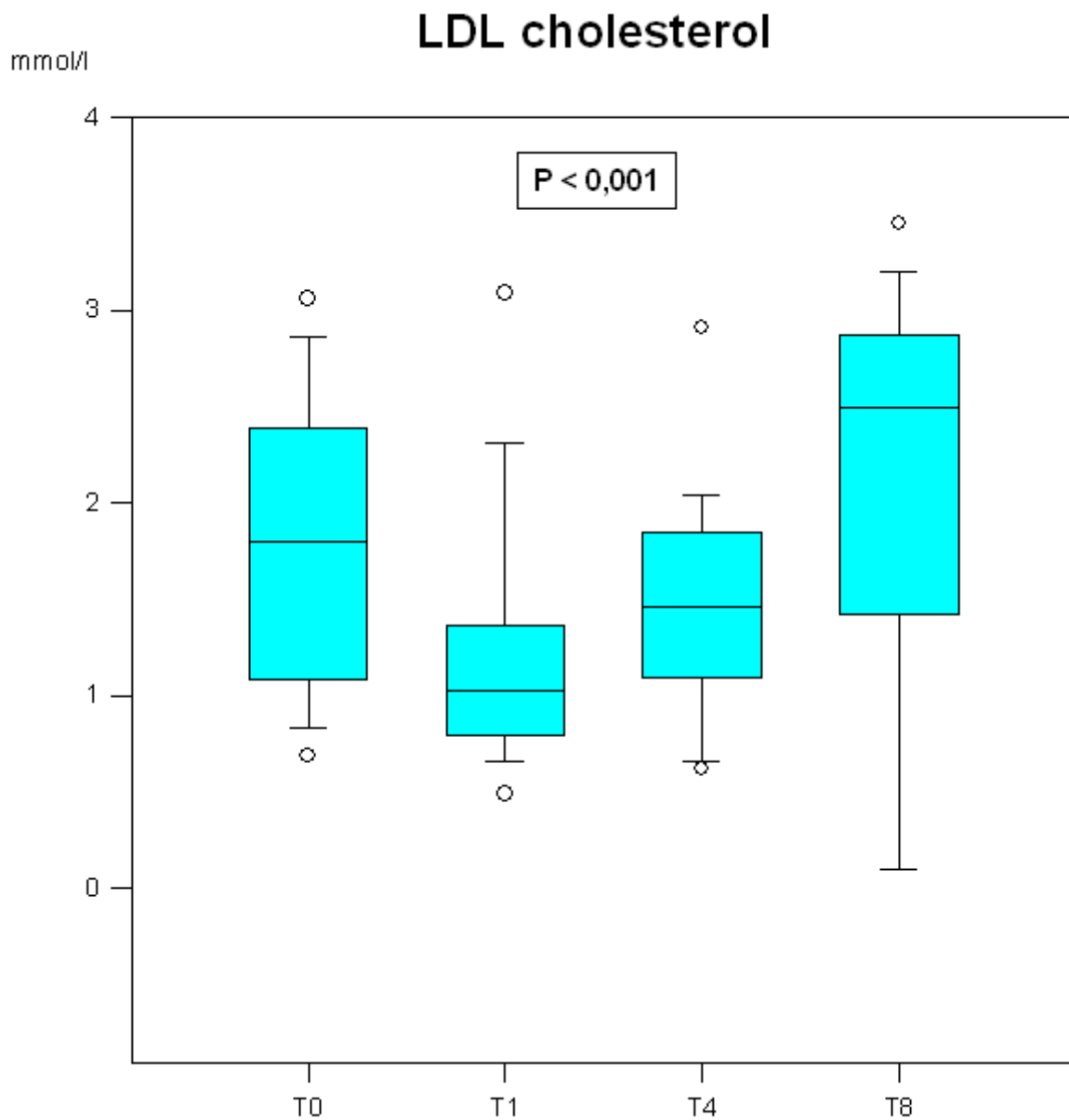
TC – celkový cholesterol, TAG - triacylglyceroly

I v této skupině akutně nemocných pacientů, u nichž byl stres definován jako dopravní polytrauma, byla nalezena vysoce statisticky významná změna v sérové koncentraci cholesterolu. Po dobu sledování došlo k prudkému poklesu první den po úrazu s postupným vzestupem hladin téměř k výchozím hodnotám na konci sledovaného období. Statistické významnosti bylo dosaženo mezi D0 vs D1, D0 vs D8, D1 vs D4, D1 vs D8 a D4 vs D8. Trendové změny ukazuje graf č. 19.



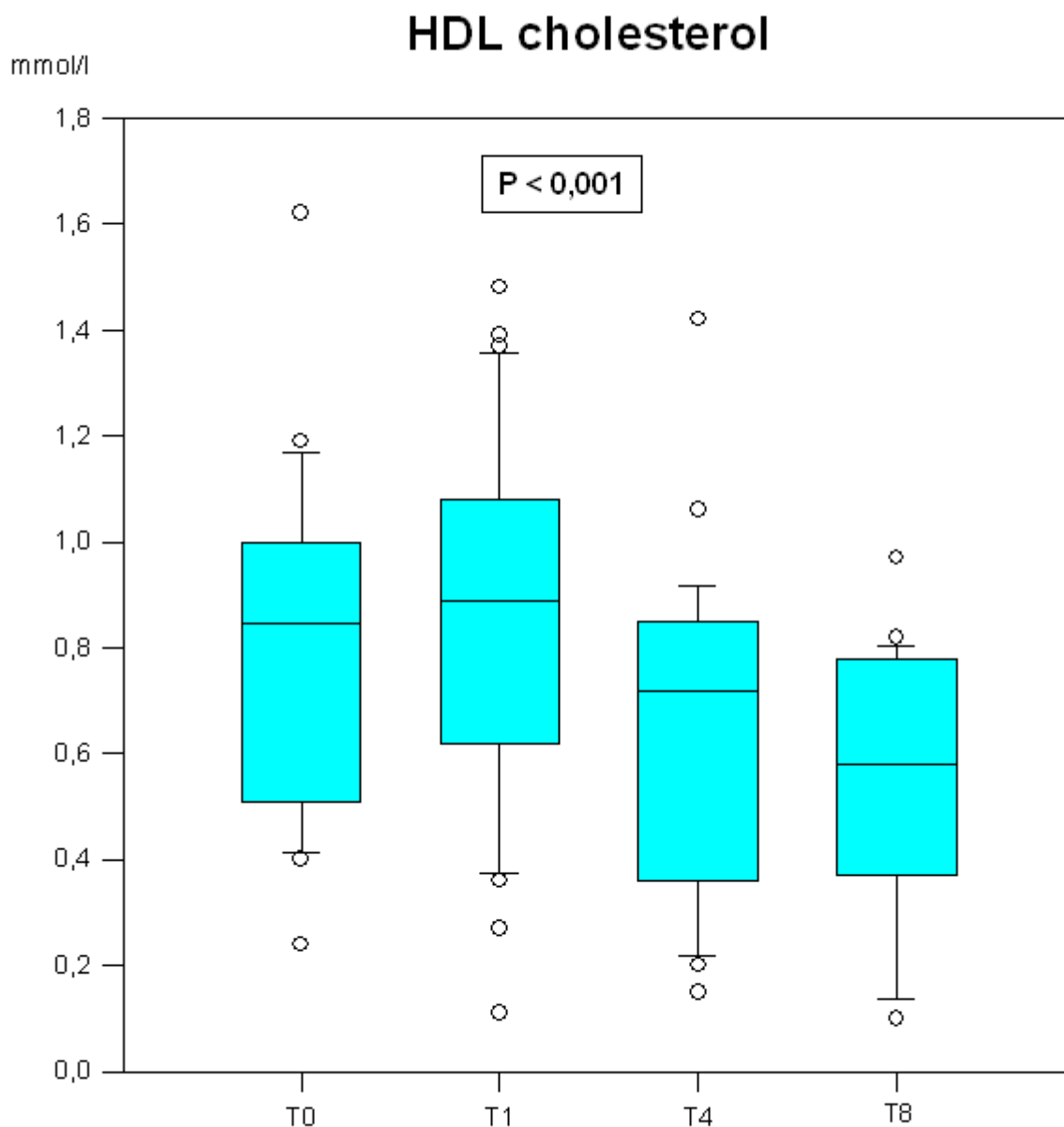
*Graf č.19 Změny v koncentraci celkového cholesterolu v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8*

Stejně jako ve skupině kardiochirurgických nemocných, také ve skupině polytraumat došlo k poklesu koncentrace LDL cholesterolu, který kopíroval počáteční propad a následný vzestup celkového cholesterolu. Statistické významnosti dosáhly změny mezi D0 vs D1, D1 vs D8 a D4 vs D8. Trendové změny jsou uvedeny v grafu č. 20.



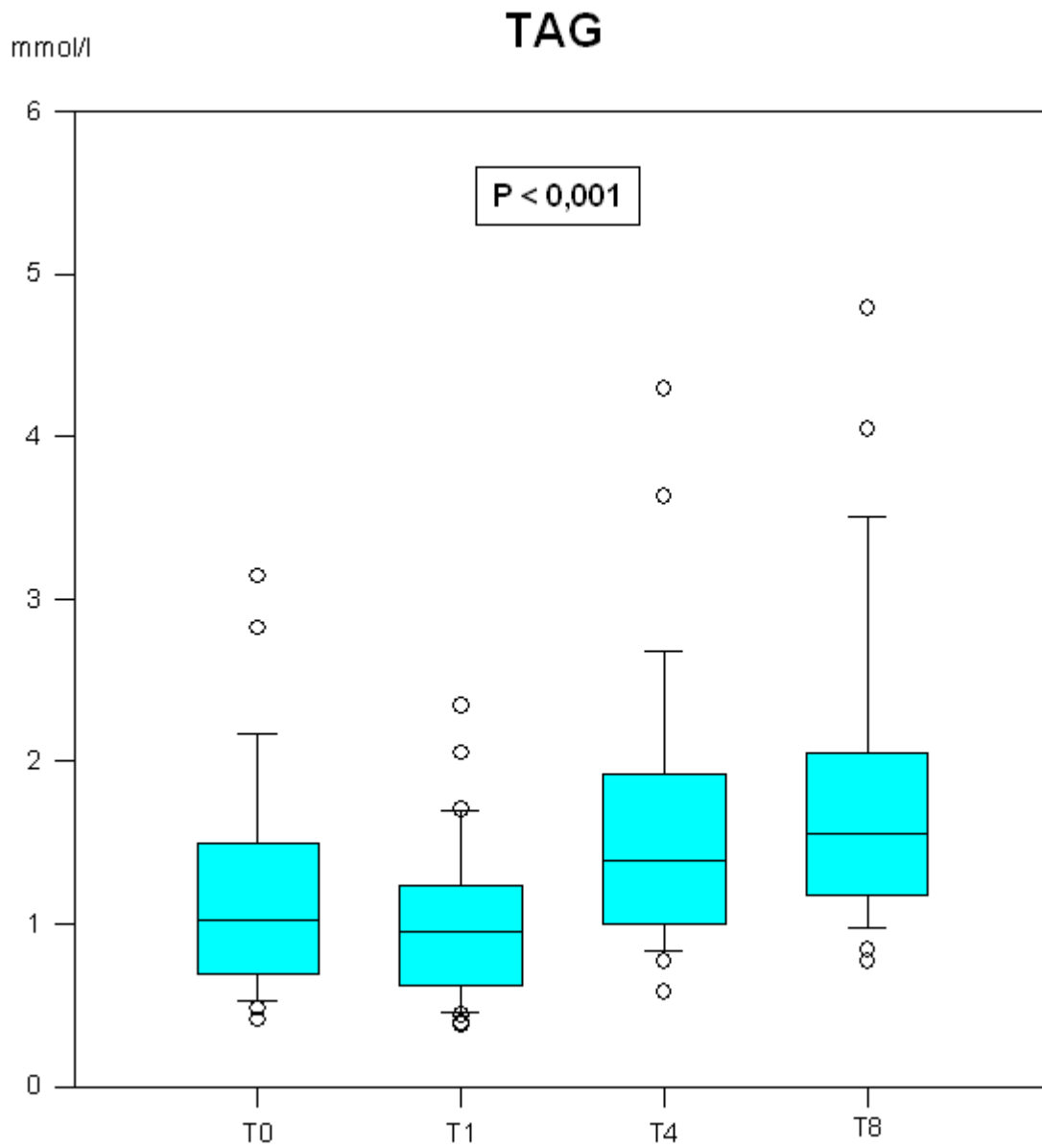
*Graf č.20 Změny v koncentraci LDL cholesterolu v průběhu 8 sledovaných dnů v skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8*

V plasmatické koncentraci HDL cholesterolu došlo ke statisticky významnému poklesu mezi D0 vs D4, D0 vs D8, D1 vs D4 a D1 vs D8. HDL cholesterol po mírném vzestupu první den trendově klesal po celou dobu sledování. Trendové změny ukazuje graf č. 21.



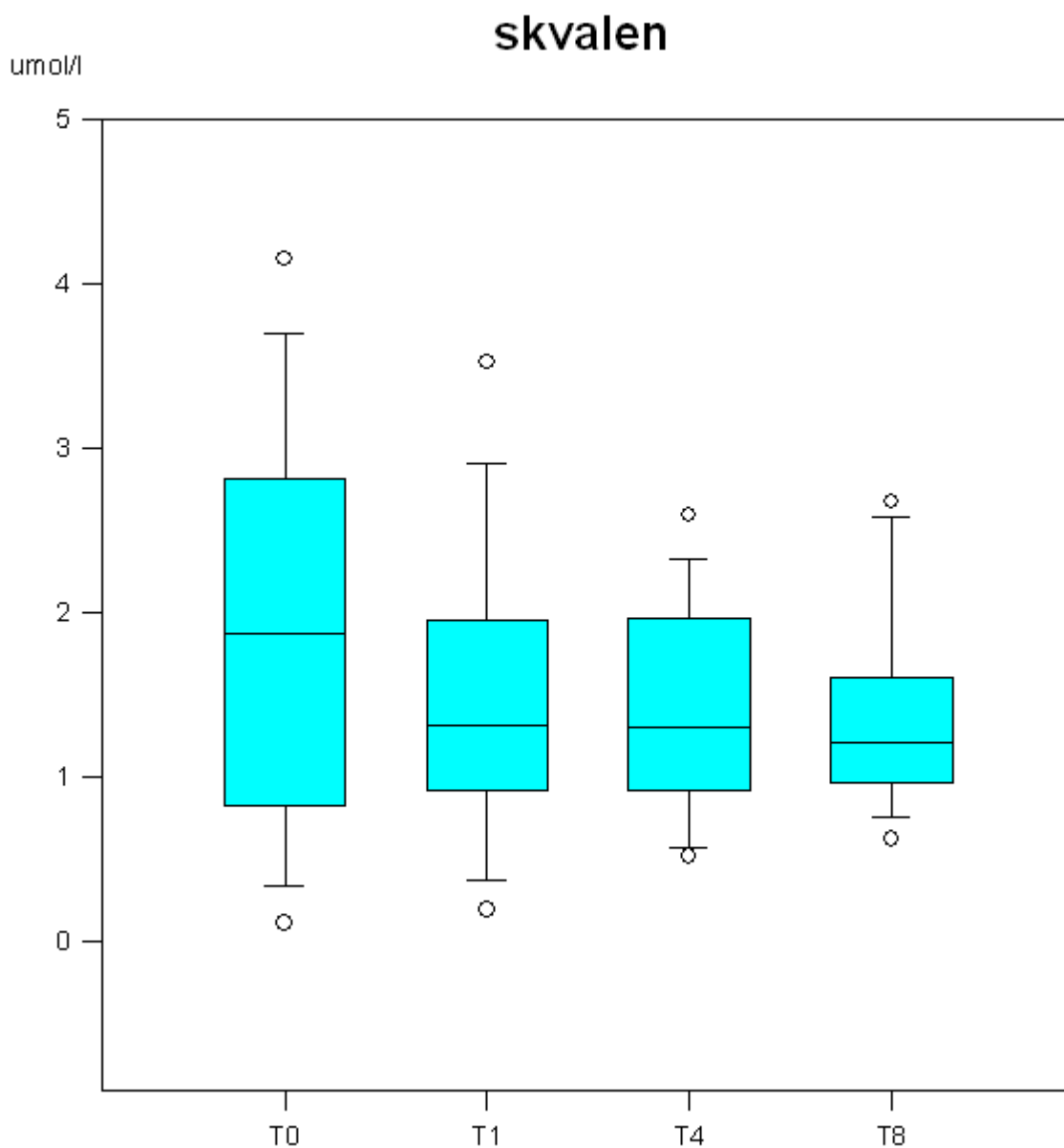
Graf č.21. Změny v koncentraci HDL cholesterolu v průběhu 8 sledovaných dnů v skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8

V plasmatických koncentracích triacylglyceridů byl nalezen vzestupný trend s tím, že vysoce statisticky významné byly změny D0 vs D4 a D8, D1 vs D4 a D8. Trendové změny ukazuje graf č. 22.



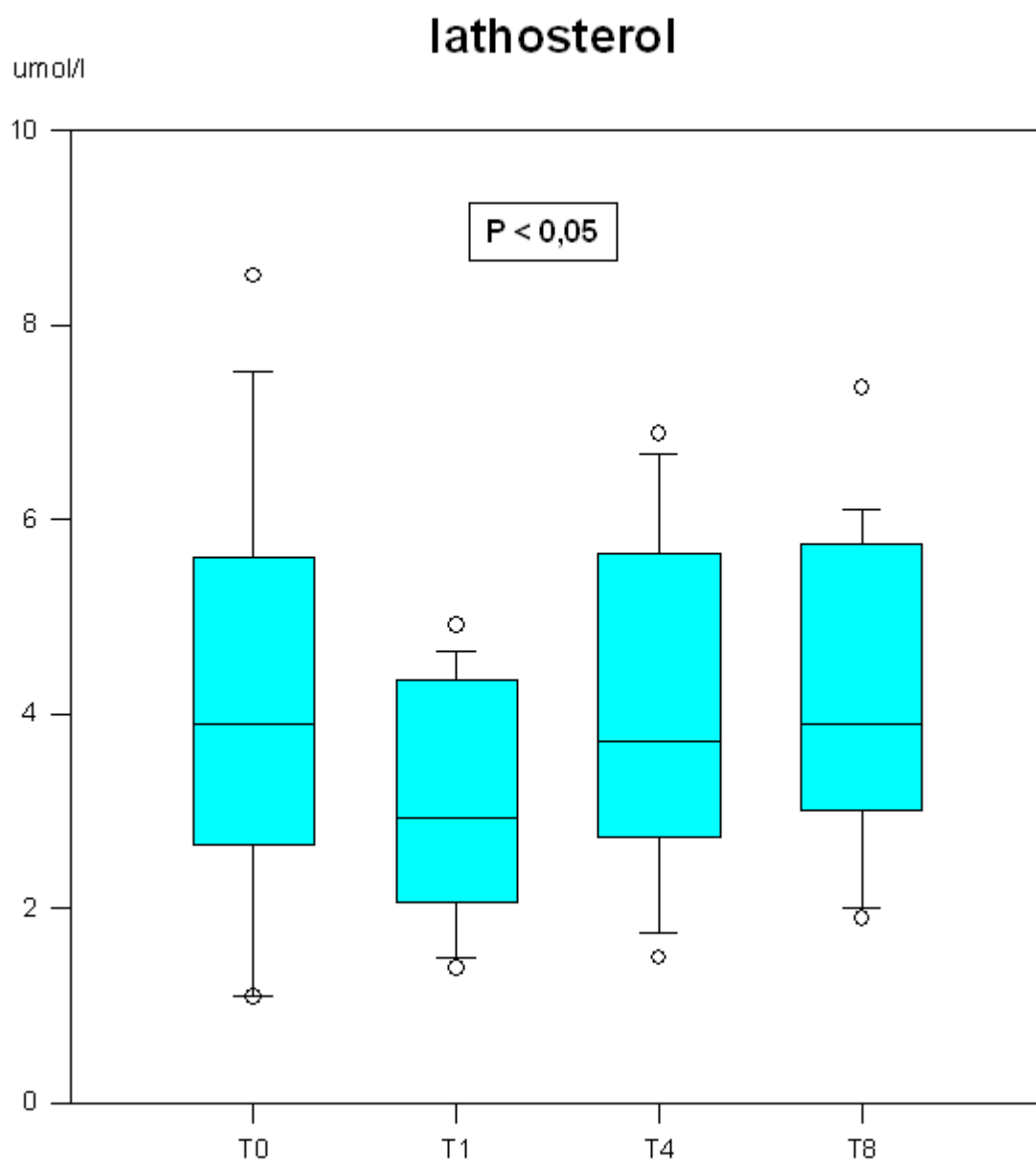
Graf č.22. Změny v koncentraci TAG (triacylglycerolů) v průběhu 8 sledovaných dnů v skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8

V sérových koncentracích skvalenu byl zaznamenán klesající trend, změny byly statisticky signifikantní mezi D0 vs D8. V sérových koncentracích lathosterolu došlo první den k poklesu s následným vzestupem a bylo dosaženo statistické významnosti změny mezi D1 vs D8. Trendové změny ukazují grafy č. 23 a 24.



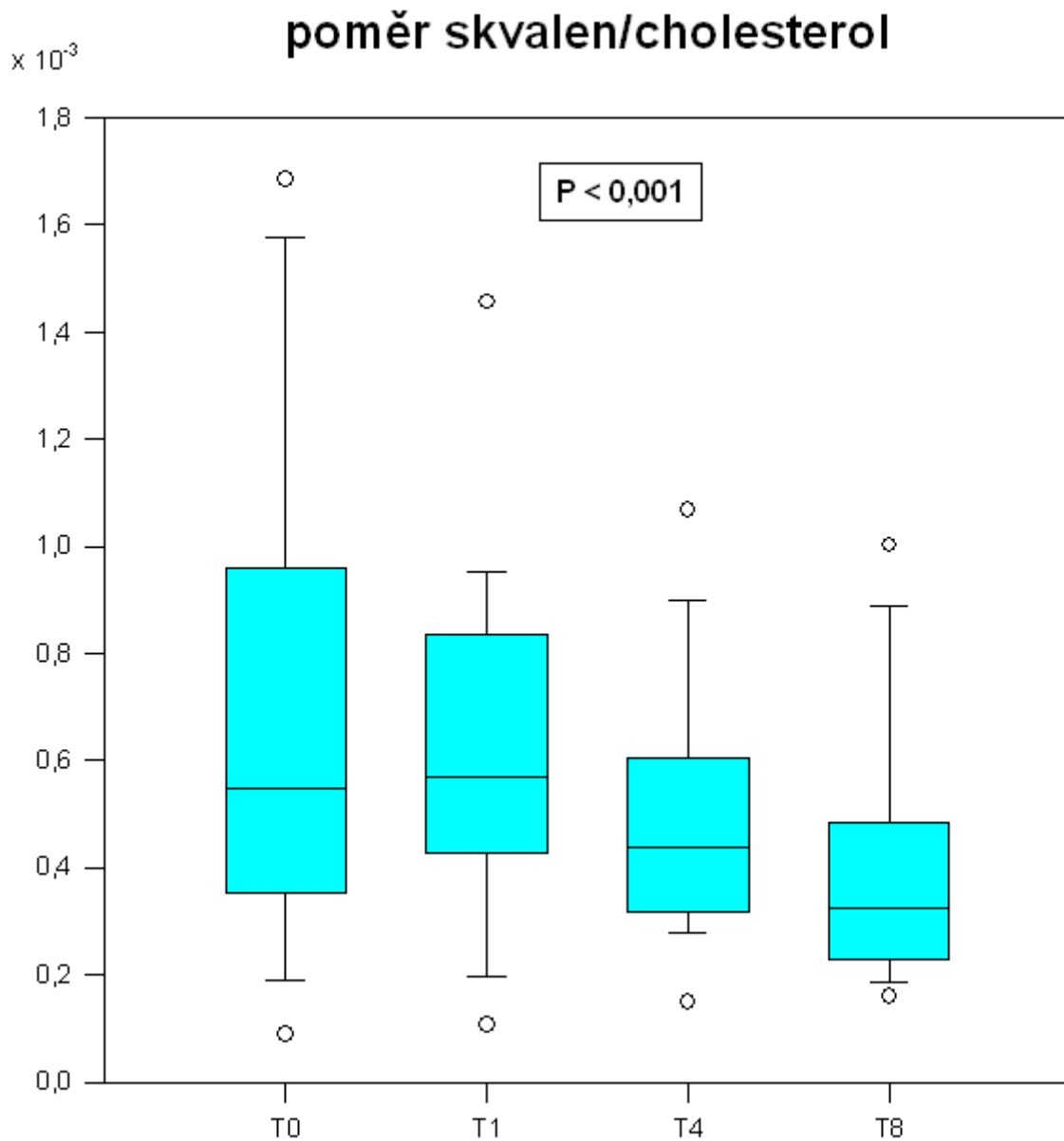
*Graf č.23. Změny v koncentraci skvalenu v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8*





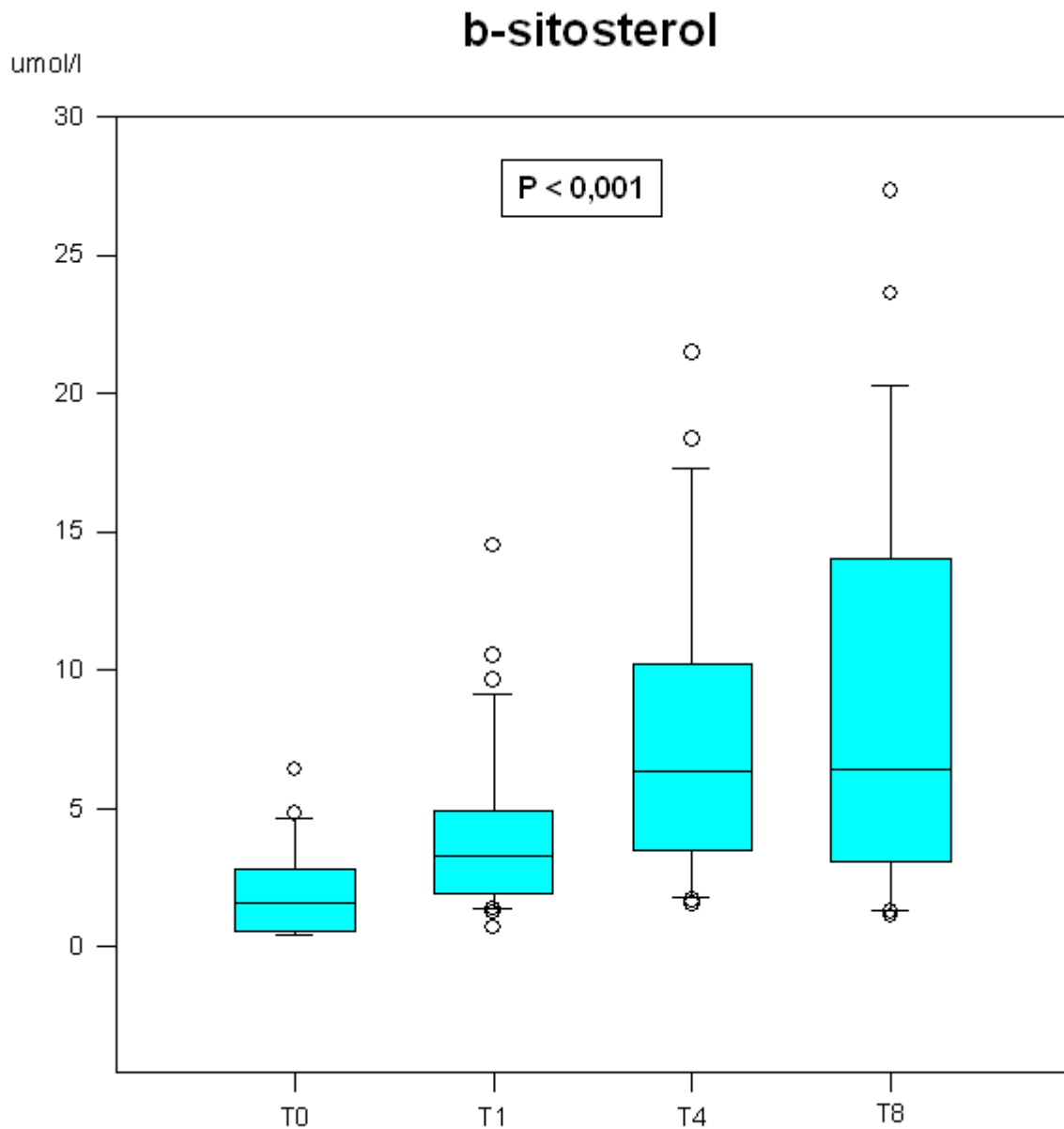
Graf č.24. Změny v koncentraci lathosterolu v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8

Podobný trend změn s klesající tendencí v celém sledovaném období měl poměr skvalen/TC, kde byla zaznamenána statisticky významná změna mezi D0 vs D4 a D8, D1 vs D8. V poměru lathosterol/TC nebyly zaznamenány změny, které by dosáhly statistické významnosti. Trendové změny jsou uvedeny v grafu č. 25.



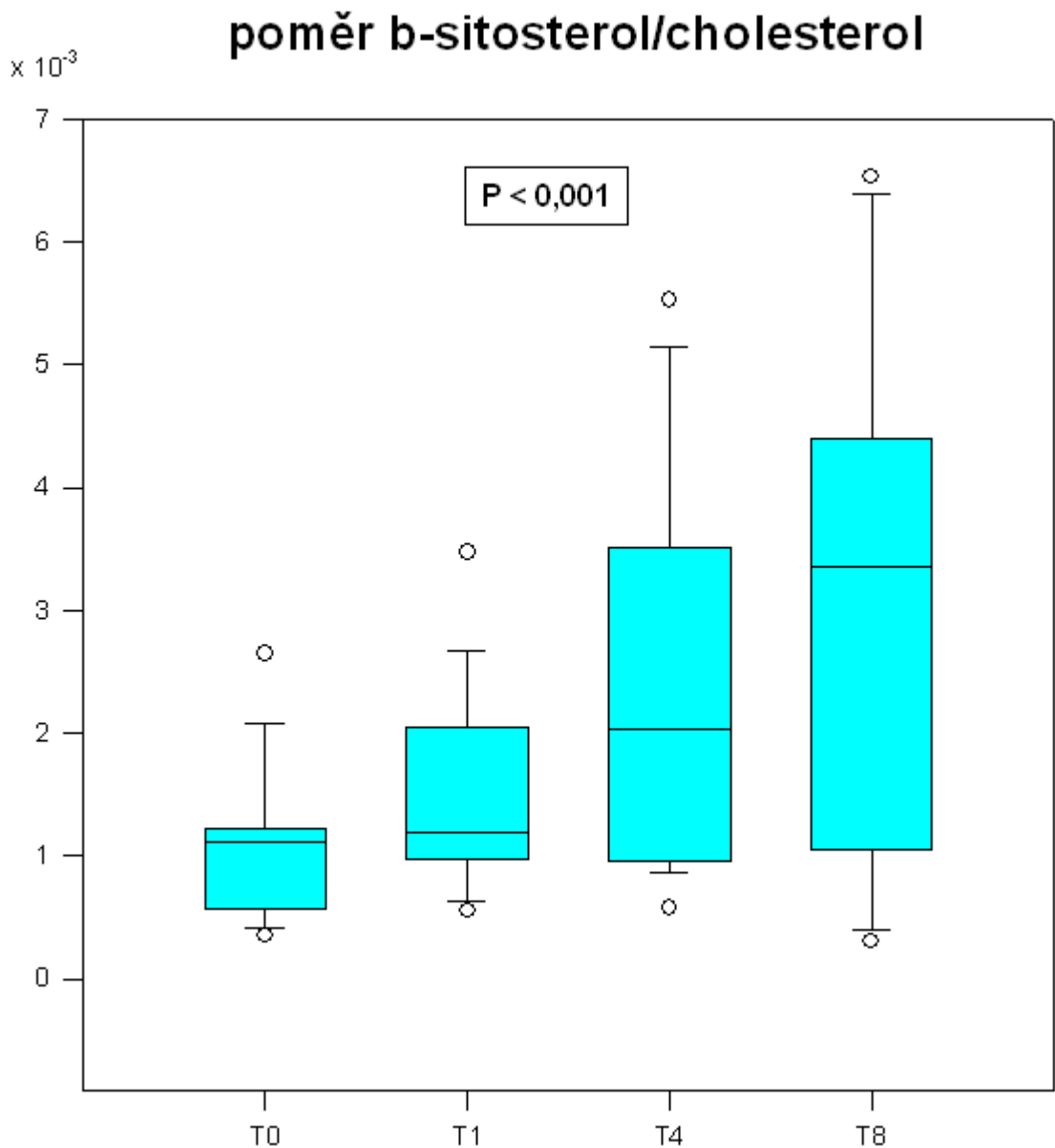
Graf č.25. Změny v poměru skvalen/cholesterol v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat ( $T = \text{trauma}$ ), den 0,1,4,8

V markerech absorpce cholesterolu, vyjádřené plasmatickou koncentrací  $\beta$ -sitosterolu, byl zaznamenán statisticky významný vzestupný trend mezi D0 vs D4, D8 a D1 vs D4, D8. Plasmatické koncentrace v průběhu sledovaného období rostly s maximálním urychlením od 4 dne sledování. Trendové změny ukazuje graf č. 26.



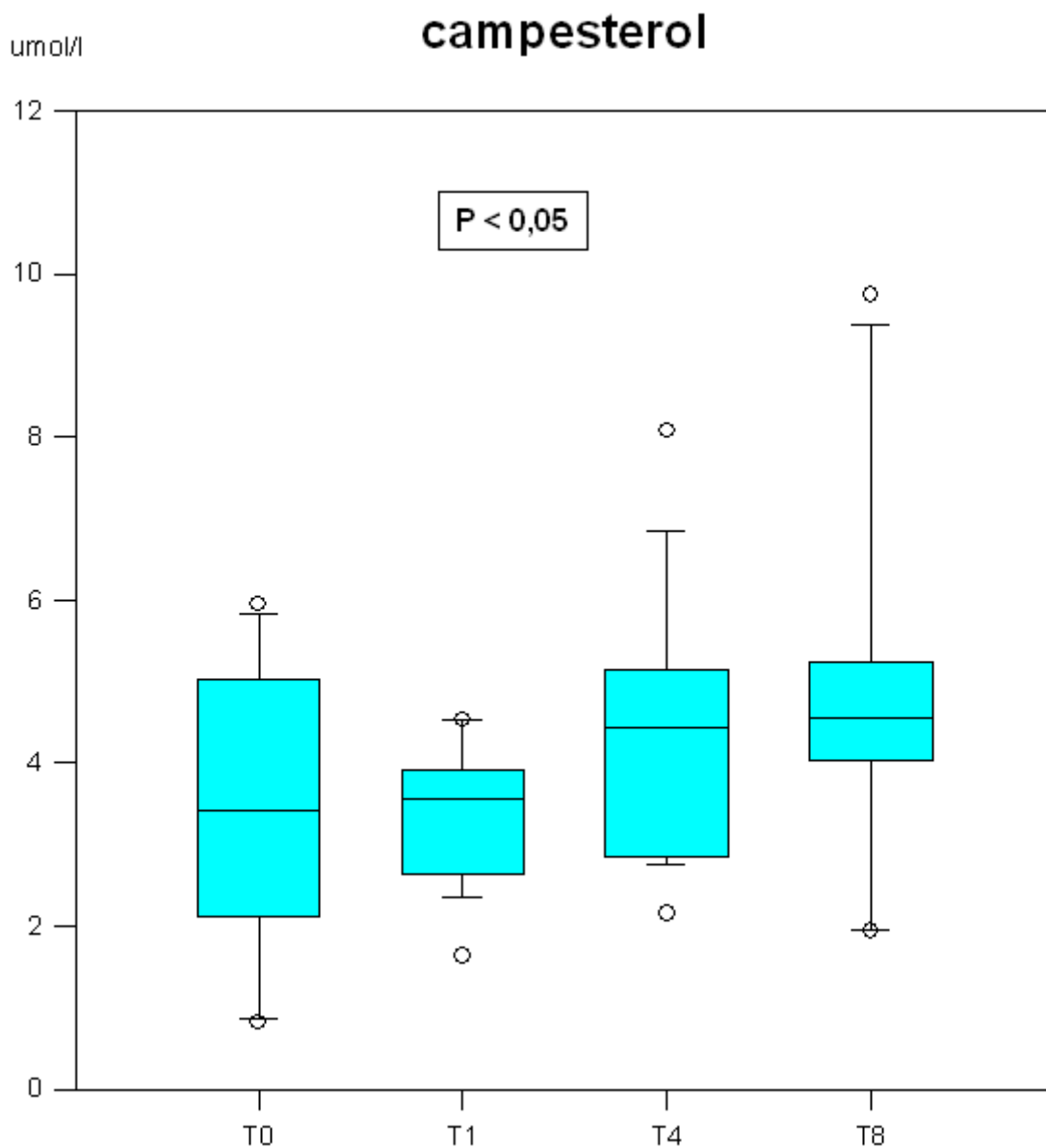
*Graf č.26. Změny v koncentraci  $\beta$ -sitosterolu v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8*

V poměru  $\beta$ -sitosterol/TC byla identická změna s hladinami  $\beta$ -sitosterolu a statistické významnosti bylo dosaženo mezi D0 vs D4 a D8, D1 vs D4 a D8. Trendové změny ukazuje graf č. 27.



*Graf č.27. Změny v poměru  $\beta$ -sitosterol/TC v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8*

Také v plasmatických koncentracích campesterolu (tj. jednoho z markerů absorpce cholesterolu) došlo první den po traumatu k mírnému poklesu s následným vzestupným trendem během celého sledovaného období. Změny dosáhly statistické významnosti mezi D0 vs D8, D1 vs D8. Trendové změny ukazuje graf č. 28. V poměru campesterol/TC byla nalezena statistická významnost mezi D0 vs D4.



Graf č.28. Změny v koncentraci campesterolu v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat ( $T = \text{trauma}$ ), den 0,1,4,8

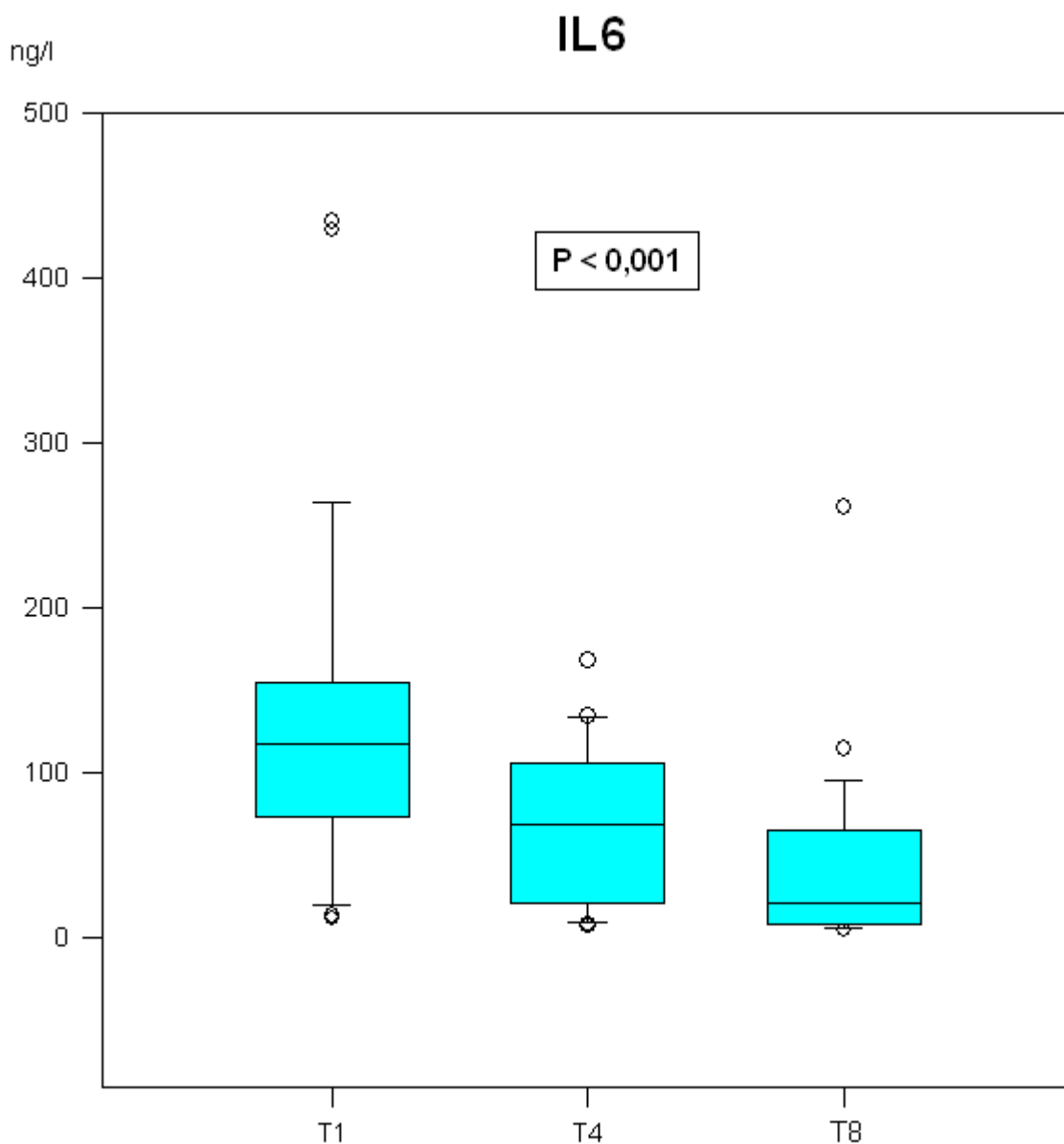
|                            | Den 0  |        | Den 1   |        | Den 4   |         | Den 8   |        |
|----------------------------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|--------|
|                            | průměr | ± SD   | průměr  | ± SD   | průměr  | ± SD    | průměr  | ± SD   |
| IL - 6 (ng/l)              |        |        | 118,976 | 64,118 | 88,021  | 42,833  | 45,626  | 35,292 |
| Kortizol I (nmol/l)        |        |        |         |        | 515,556 | 234,292 |         |        |
| Kortizol II (nmol/l)       |        |        |         |        | 927,389 | 229,108 |         |        |
| CRP (mg/l)                 | 20,375 | 65,151 | 111,211 | 78,969 | 149,895 | 70,784  | 102,833 | 74,577 |
| TP (g/l)                   | 51,519 | 14,779 | 46,8    | 8,784  | 49,653  | 8,942   | 57,511  | 9,512  |
| Albumin (g/l)              | 31,050 | 9,595  | 28,453  | 5,324  | 27,453  | 5,719   | 30,478  | 6,981  |
| prealbumin (g/l)           | 0,216  | 0,105  | 0,189   | 0,049  | 0,129   | 0,058   | 0,193   | 0,084  |
| stimulovaný burst test (%) |        |        | 95,5    | 3,506  | 84,1    | 15,747  | 80,306  | 15,492 |

*Tab. č.8 Koncentrace markerů nutrice a zánětu ve skupině polytraumat*

*(data jsou prezentována jako průměr a ± SD – standardní odchylka)*

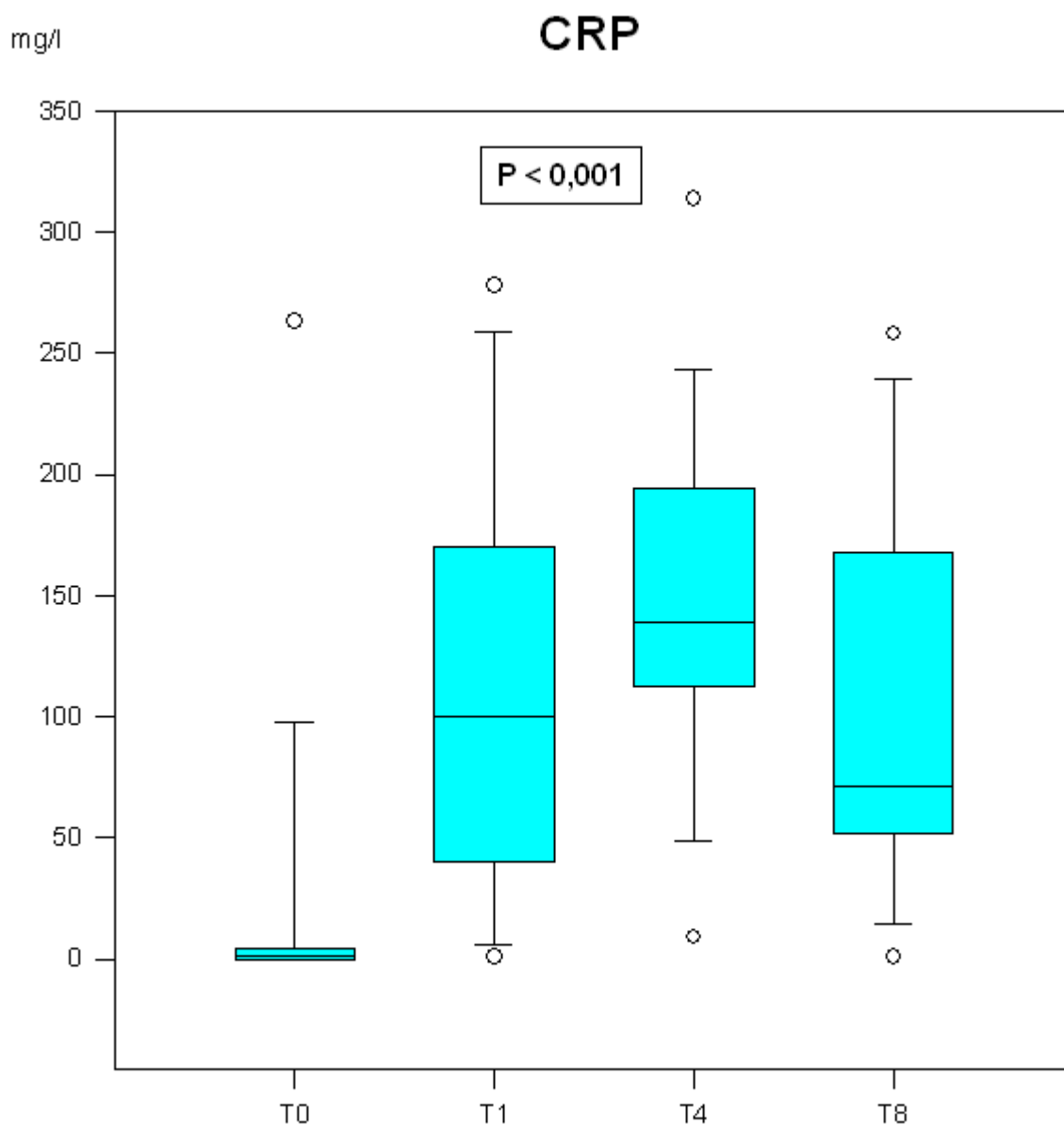
*TP – celkový protein, CRP – C reaktivní protein*

Také u skupiny nemocných s polytraumatem došlo k vzestupu plasmatických koncentrací IL-6 s dosaženým maximem první potraumatický den s postupným poklesem během sledovaného období. Statisticky významných změn bylo dosaženo mezi D1 vs D4, D1 vs D8 a D4 vs D8. Trendové změny ukazuje graf č. 29.



Graf č.29. Změny v koncentraci IL-6 v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat ( $T$  = trauma), den 0,1,4,8

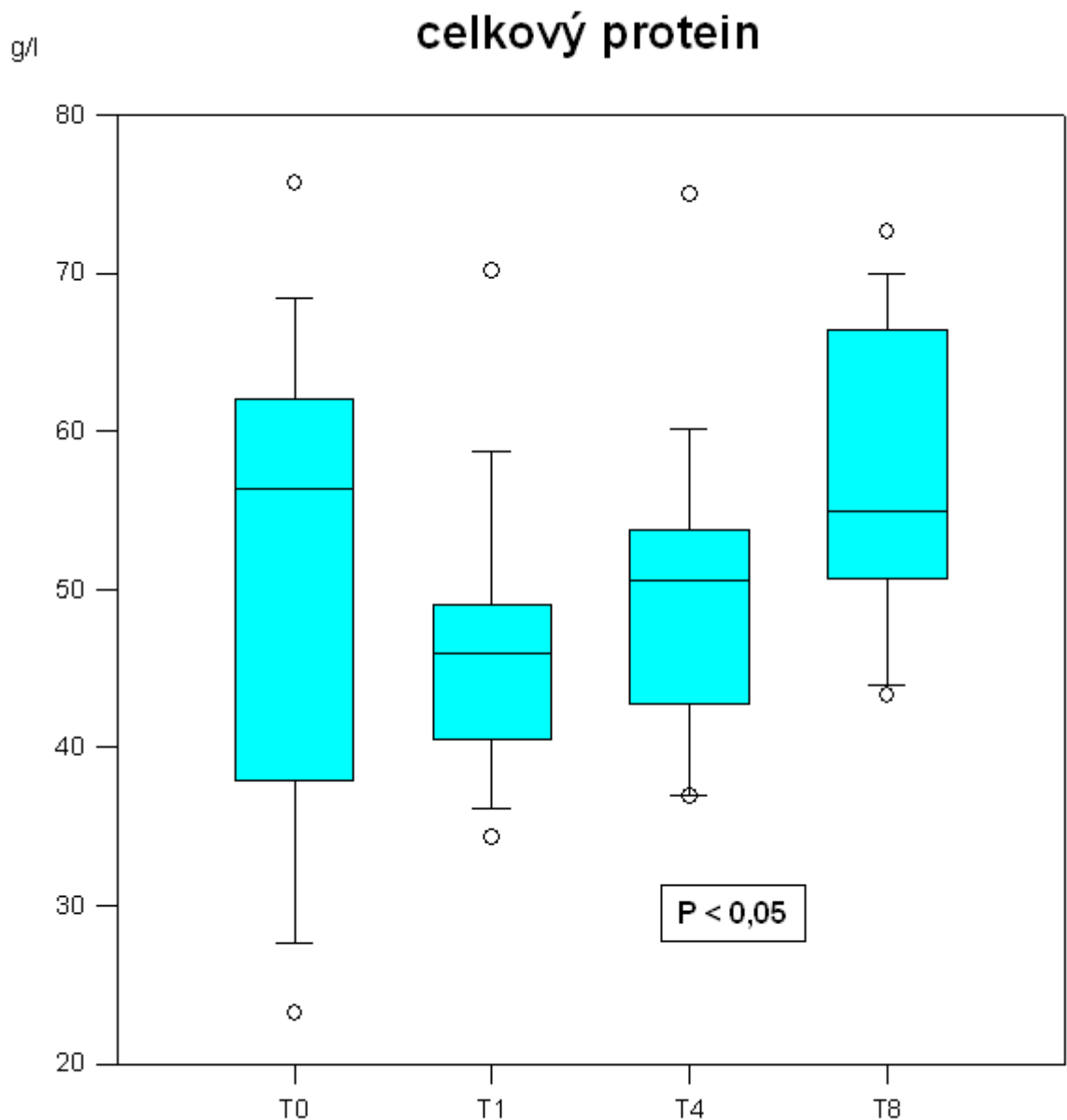
Pozitivní reaktant akutní fáze, ve studii sledované CRP, zaznamenalo vzestup plasmatických koncentrací v první polovině sledovaného období s kulminací hladiny 4 den sledování s následným poklesem. Statistické významnosti bylo dosaženo mezi D0 vs D1, D4, D8. Trendové změny ukazuje graf č. 30.



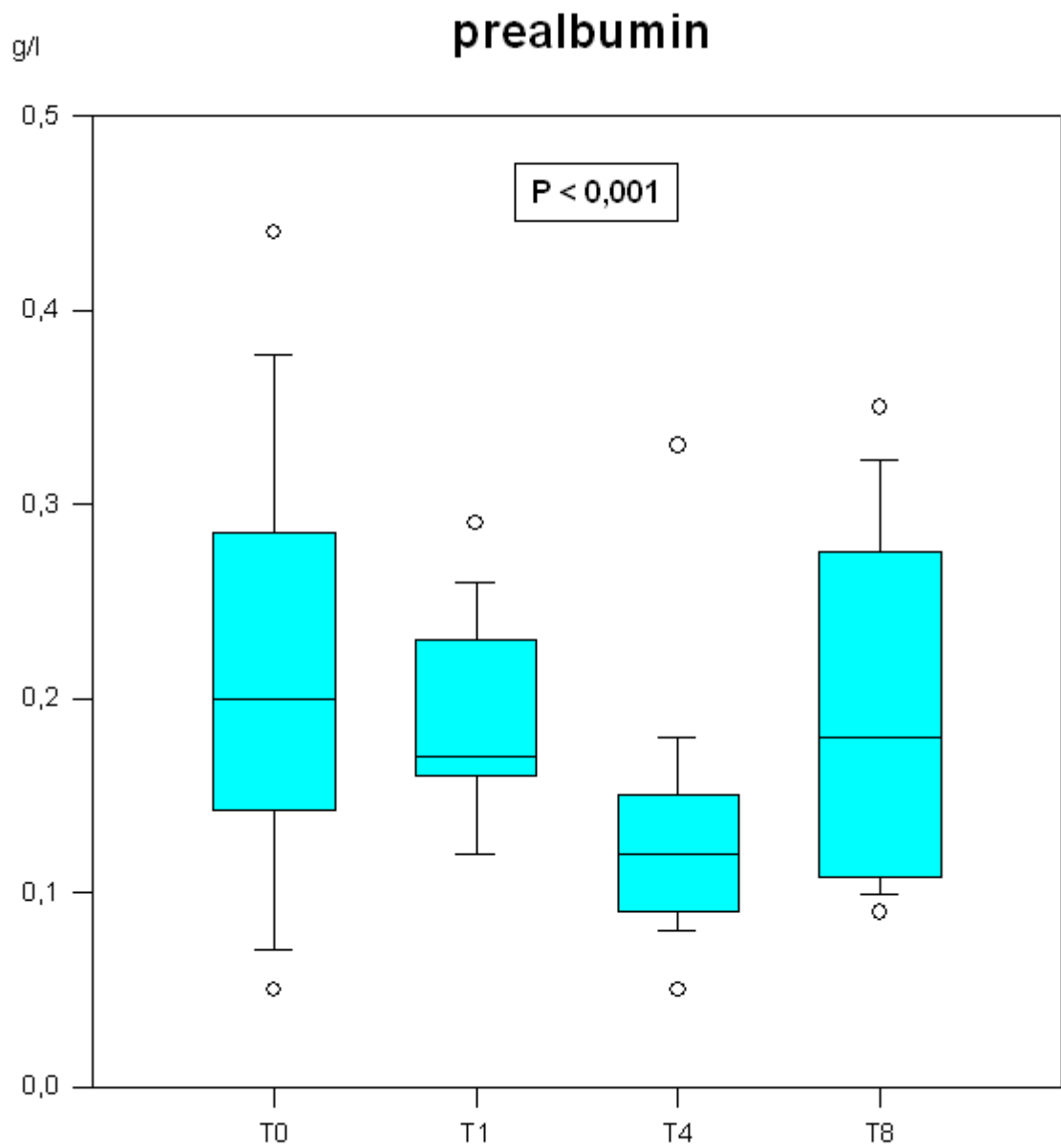
Graf č.30. Změny v koncentraci CRP v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat ( $T = \text{trauma}$ ), den 0,1,4,8



V negativních reaktantech akutní fáze došlo k obdobným změnám jako v kardiochirurgické skupině. U celkové bílkoviny (TP) došlo k poklesu plasmatické koncentrace první potraumatický den s následným vzestupem během sledovaného období. Statistické významnosti změn bylo dosaženo mezi D1 vs D8. Obdobný trend byl zaznamenán i v koncentracích albuminu, zde však nebyly změny statisticky významné. Naproti tomu v bílkovině s velmi krátkým poločasem, prealbuminu, byla nalezena statisticky významná změna mezi D0 vs D4, D1 vs D4 a D4 vs D8. Trendové změny ukazují grafy č. 31 a 32.

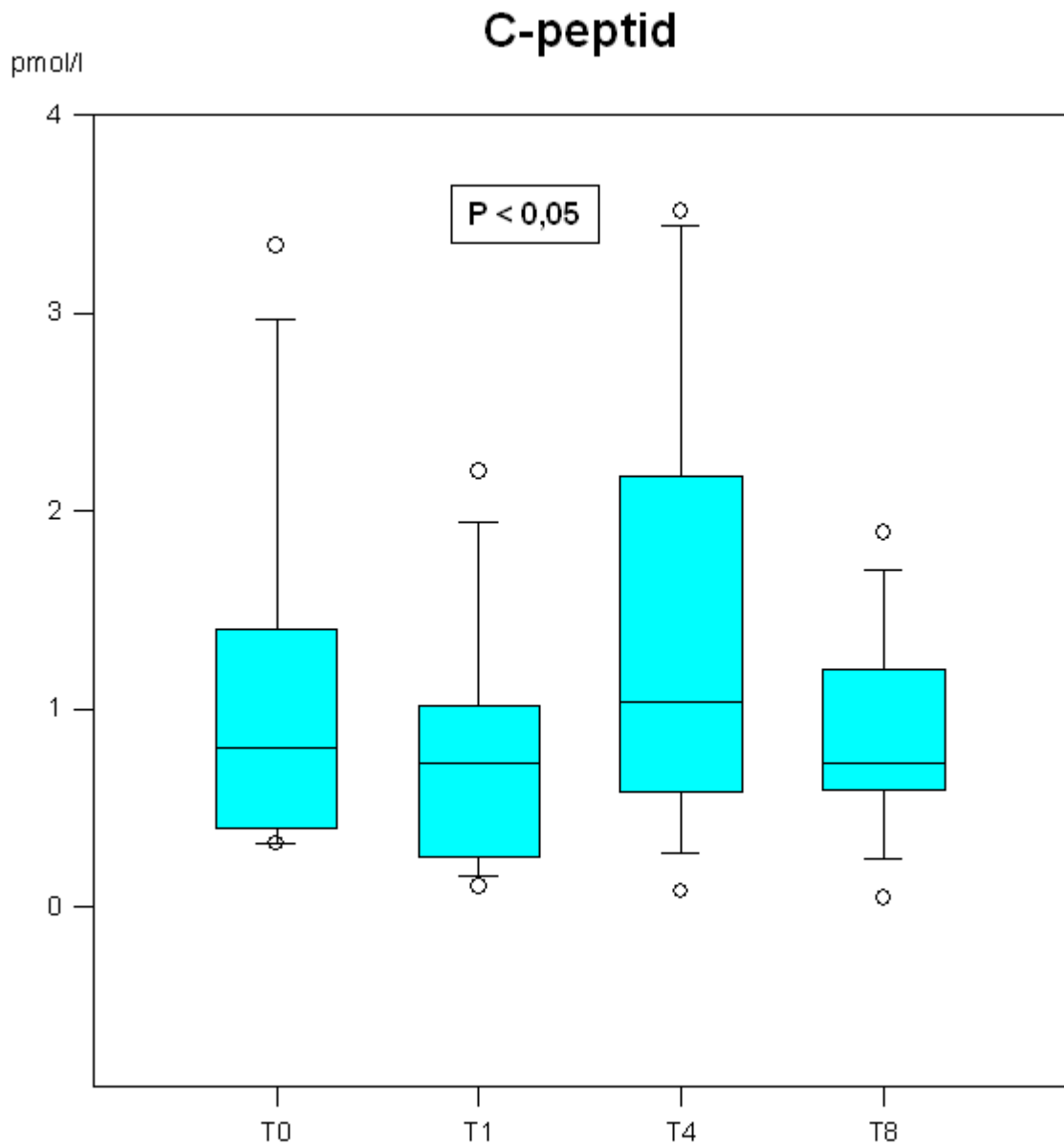


Graf č.31. Změny v koncentraci TP (celkový protein) v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8



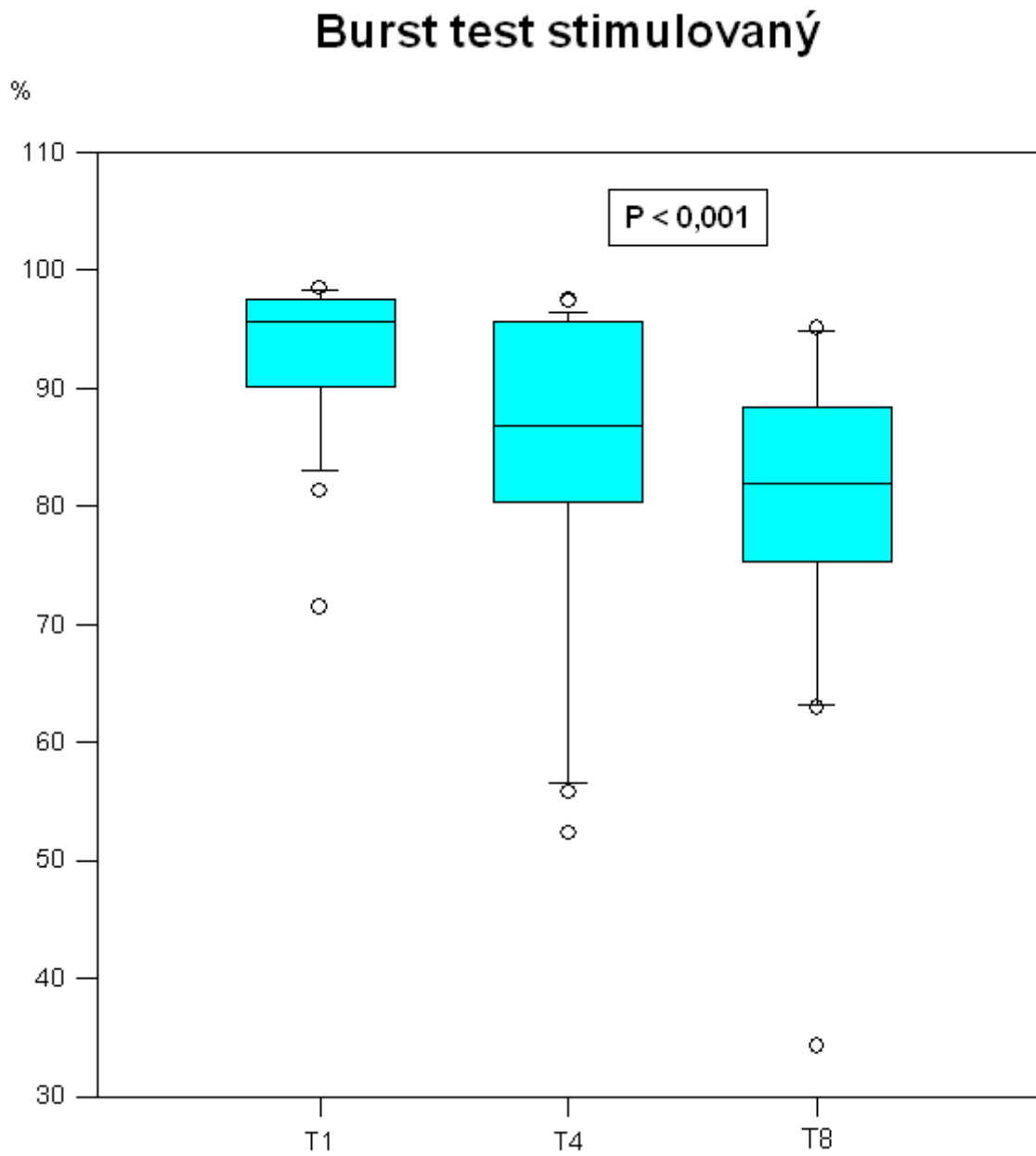
*Graf č.32. Změny v koncentraci prealbuminu v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8*

V plasmatických koncentracích imunoreaktivního inzulínu a C peptidu došlo během sledovaného období k vzestupu s maximem naměřených hodnot 4 potraumatický den. V koncentraci inzulínu nebyly zaznamenány statisticky významné změny. V koncentraci C peptidu byla zaznamenána statisticky významná změna mezi D1 vs D4 a D4 vs D8. Trendové změny ukazuje graf č. 33.



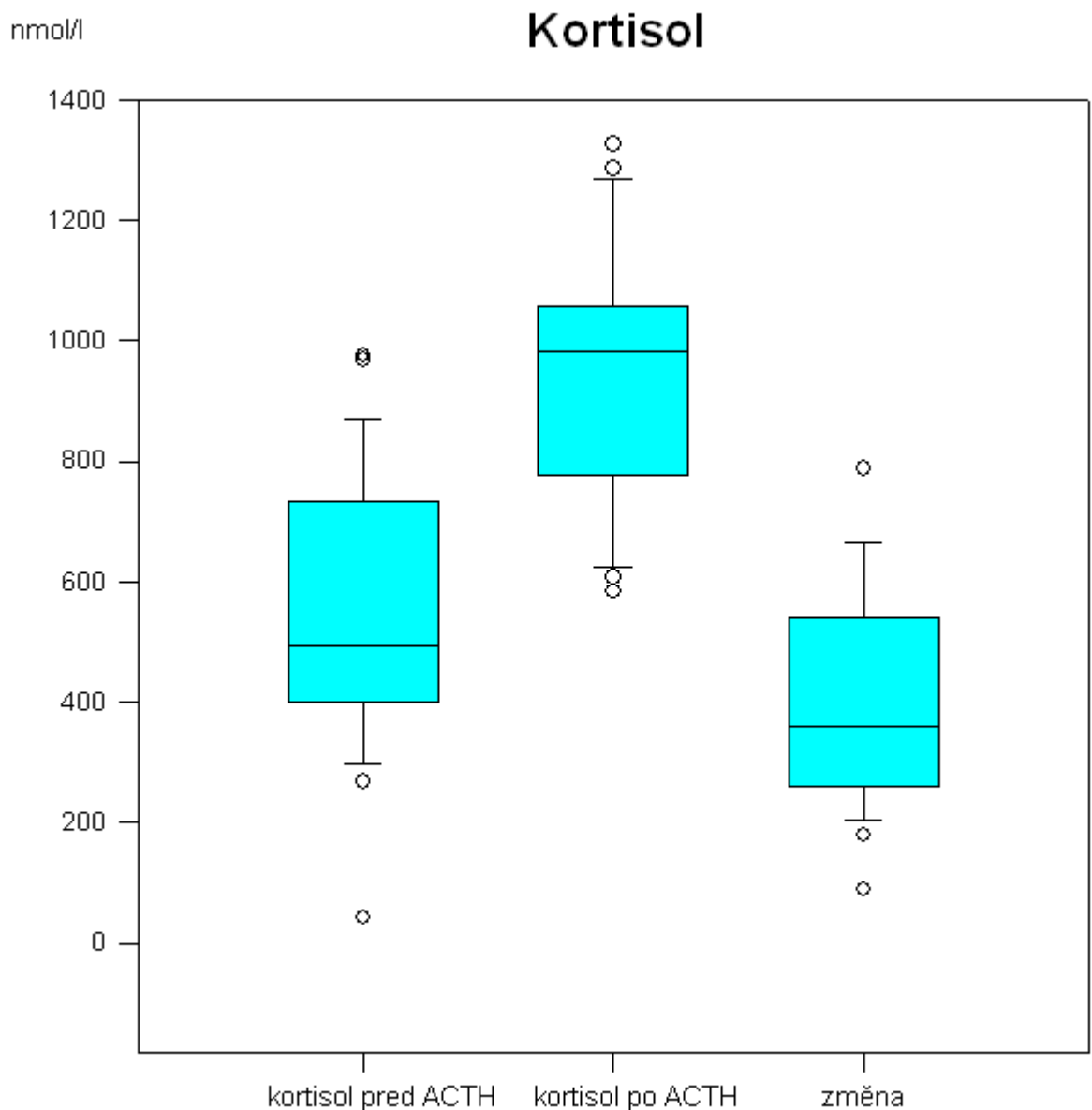
*Graf č.33. Změny v koncentraci C peptidu v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8*

Baktericidní schopnost leukocytů tvořit kyslíkové radikály, podléjící se na nespecifické obranyschopnosti organismu, statisticky významně poklesla v průběhu sledovaného období mezi D1 vs D4 a D1 vs D8. Trendový vývoj ukazuje graf č.34.



Graf č.34. Změny v burst stimulovaném testu v průběhu 8 sledovaných dnů ve skupině polytraumat (T = trauma), den 0,1,4,8

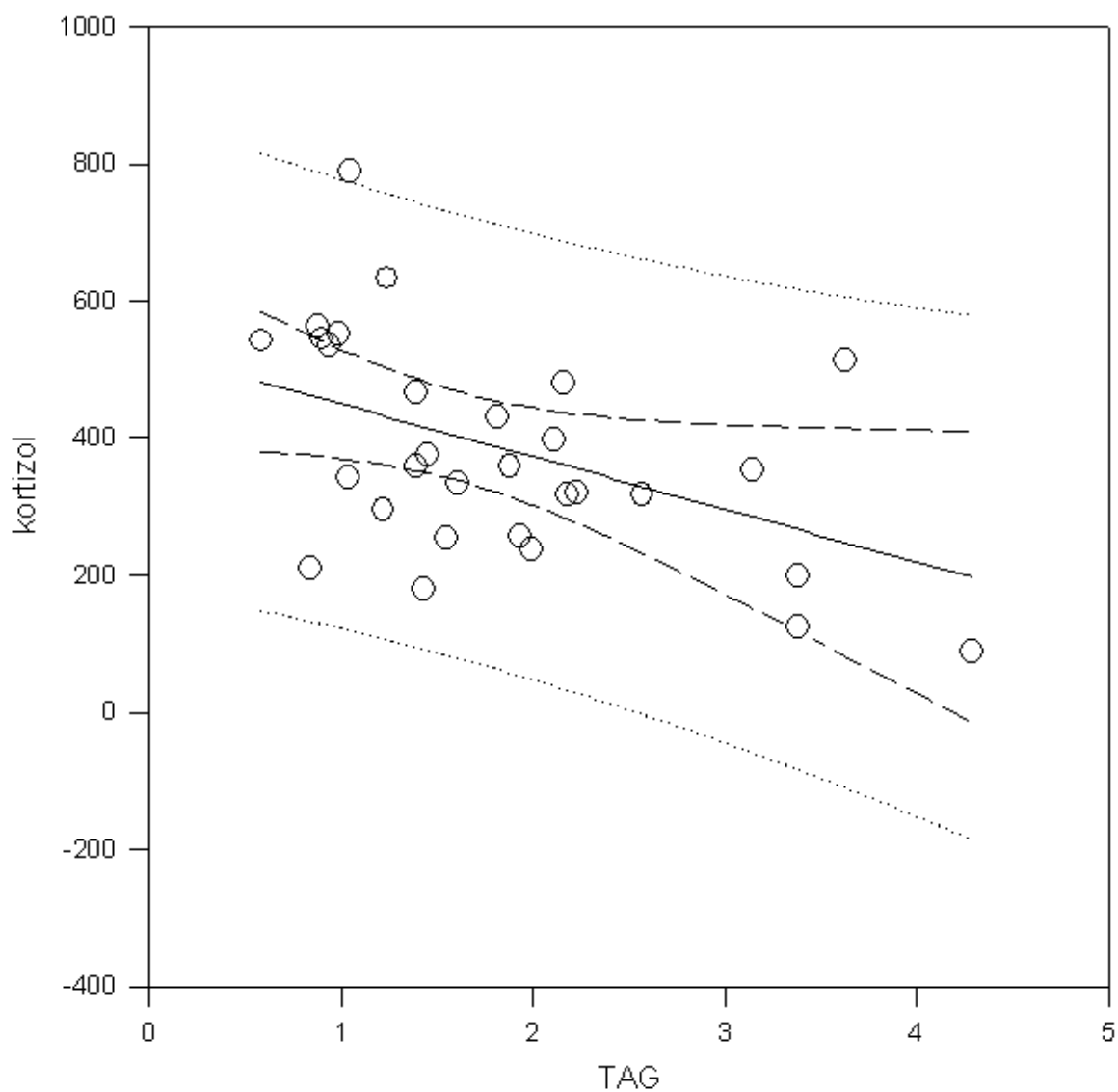
V plasmatických koncentracích kortizolu byla zaznamenána statisticky významná změna mezi nestimulovanou a ACTH stimulovanou koncentrací kortizolu. Absolutní hodnoty kortizolu (a to jak bez stimulace, tak po stimulaci) vysoce přesahovaly arbitrálně stanovené koncentrace kortizolu, které by měly prokazovat nadledvinkovou insuficienci. Trendový vývoj ukazuje graf č. 35.



*Graf č.35. Změny v koncentraci kortizolu před a po stimulaci ACTH ve skupině polytraumat (T = trauma), den 4*

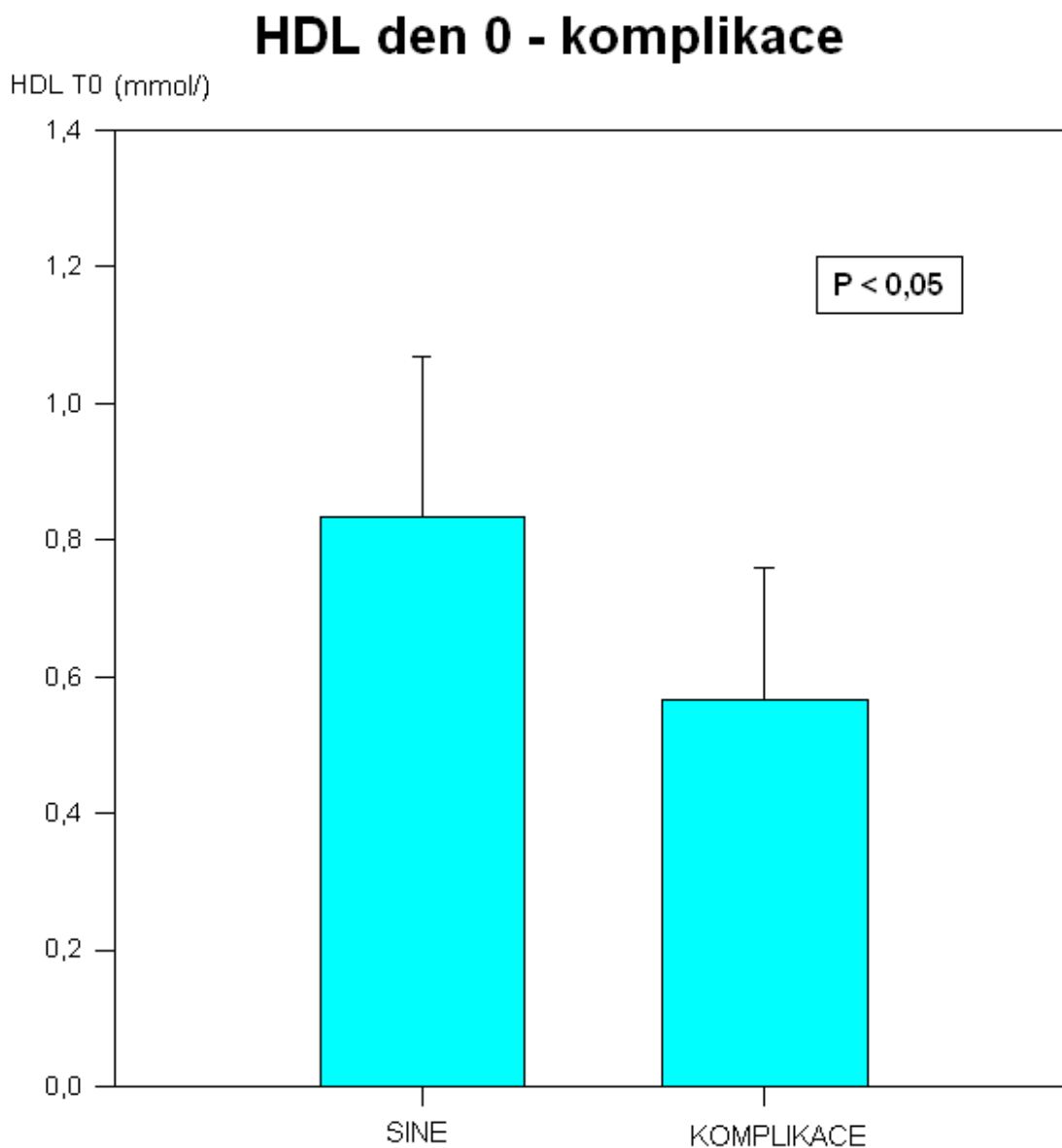
Také ve skupině polytraumat byla nalezena statisticky významná korelace ( $P = 0,048$  a  $R_{sq} 0,167$ ) mezi změnou koncentrace kortizolu po stimulaci ACTH a hladinou TAG, kterou dokládá graf č.36

### Regrese - TAG vs. změna kortizolu



*Graf č. 36 Regresní porovnání mezi změnou koncentrace kortizolu po stimulaci ACTH a koncentrací TAG ve skupině polytraumat*

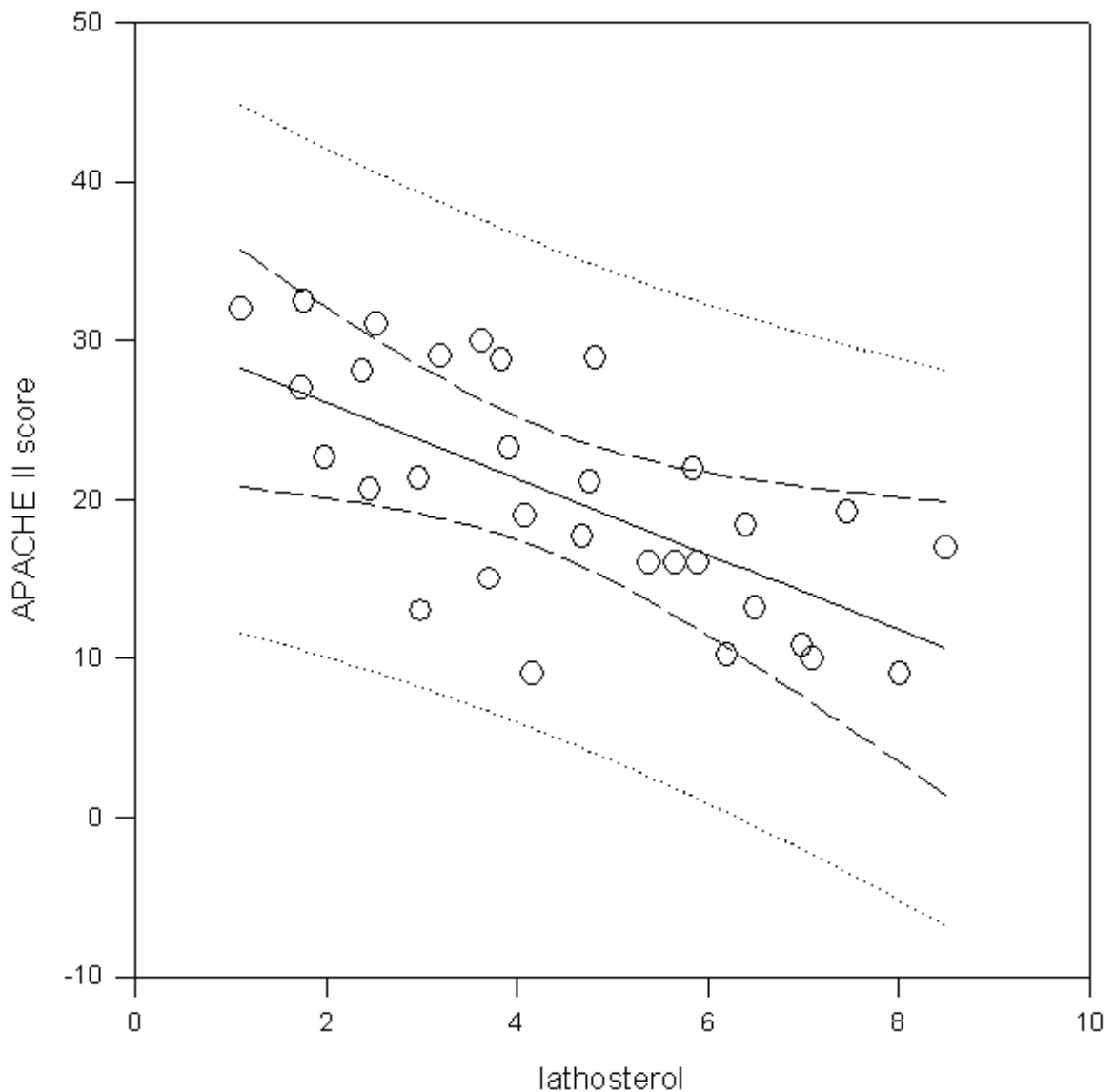
Ve skupině polytraumat byla nalezena statisticky významně ( $P = 0,045$ ) nižší vstupní hladina HDL cholesterolu ve skupině s infekčními komplikacemi než ve skupině bez infekčních komplikací. Tento vztah ukazuje graf. č. 37.



*Graf č. 37. Koncentrace HDL cholesterolu v závislosti na přítomnosti infekčních komplikací ve skupině polytraumat (den 0)*

Při korelaci markeru endogenní syntézy cholesterolu (lathosterolu) s závažností zdravotního stavu při přijetí polytraumatizovaných nemocných (vyjádřeno jako APACHE II score) byla nalezena statisticky významná ( $P = 0,023$  a  $R_{sq} 0,337$ ) negativní korelace. Graf č. 38 ukazuje tuto závislost.

### Regrese - lathosterol vs. APACHE II



*Graf č. 38. Regresní porovnání plasmatických koncentrací lathosterolu a APACHE II score ve skupině polytraumat (den 0)*



Přehled statistických významností změn měřených parametrů je uveden v tab.č. 9

| <b>P</b>                                  | den 0<br>vs.<br>den 1 | den 0<br>vs.<br>den 4 | den 0<br>vs.<br>den 8 | den 1<br>vs.<br>den 4 | den 1<br>vs.<br>den 8 | den 4<br>vs.<br>den 8 |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| TC (mmol/l)                               | < 0,001               | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               |
| HDL (mmol/l)                              | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | ns                    |
| LDL (mmol/l)                              | < 0,001               | ns                    | ns                    | ns                    | < 0,001               | < 0,001               |
| TAG (mmol/l)                              | ns                    | ns                    | < 0,05                | ns                    | < 0,05                | ns                    |
| Skvalen (μmol/l)                          | ns                    | ns                    | < 0,05                | ns                    | ns                    | ns                    |
| lathosterol (μmol/l)                      | ns                    | ns                    | Ns                    | ns                    | < 0,05                | ns                    |
| campesterol (μmol/l)                      | ns                    | ns                    | < 0,05                | ns                    | < 0,05                | ns                    |
| β-sitosterol (μmol/l)                     | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | ns                    |
| poměr skvalen/TC ( $\cdot 10^{-3}$ )      | ns                    | < 0,05                | < 0,05                | ns                    | < 0,05                | ns                    |
| poměr lathosterol/TC ( $\cdot 10^{-3}$ )  | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| poměr campesterol/TC ( $\cdot 10^{-3}$ )  | ns                    | < 0,05                | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| poměr β-sitosterol/TC ( $\cdot 10^{-3}$ ) | ns                    | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | ns                    |
| IL-6 (ng/l)                               |                       |                       |                       | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               |
| CRP (mg/l)                                | < 0,001               | < 0,001               | < 0,001               | ns                    | ns                    | ns                    |
| TP (g/l)                                  | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | < 0,05                | ns                    |
| Albumin (g/l)                             | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| prealbumin (g/l)                          | ns                    | < 0,05                | ns                    | < 0,05                | ns                    | < 0,05                |
| inzulin (pmol/l)                          | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    | ns                    |
| C-peptid (pmol/l)                         | ns                    | ns                    | ns                    | < 0,05                | ns                    | < 0,05                |
| bazální burst test                        |                       |                       |                       | ns                    | ns                    | ns                    |
| stimulovaný burst test (%)                |                       |                       |                       | < 0,001               | < 0,001               | ns                    |

Tab. č. 9. Statistické signifikance ve skupině *polytraumat*

TC – celkový cholesterol, TP – celkový protein, TAG – triacylglyceroly, ns – nesignifikantní ( $p > 0,05$ )

## 6. Diskuse

Medicína dnešních dnů je obor, který se velice dynamicky rozvíjí. Zcela charakteristické pro medicínu 21. století je snaha o co nejdětalnější zkoumání podstaty nemocí, čemuž velice přispívá také rozvoj ostatních oborů, jako je biologie, biochemie a samozřejmě i rozvoj medicínských technologií. Z tohoto pohledu se jeví práce zabývající se zkoumáním vztahu nemoci a cholesterolu, které pocházejí ze začátku minulého století, jako velice vizionářské. V průběhu 20 století se výzkum v medicíně soustředil především na vztah cholesterolu a akcelerované aterosklerozy a jednoznačně prokázal, že vysoké sérové koncentrace cholesterolu jsou škodlivé. Řada epidemiologických studií potvrdila nastolený trend snahy snižovat hladinu plasmatického cholesterolu v rámci snížení rizika rozvoje kardiovaskulárních chorob.

U řady akutních klinicky závažných stavů ale dochází k významným změnám vnitřního prostředí a metabolismu. Jednou z pozorovaných změn je změna v sérových koncentracích cholesterolu a jeho prekurzorů. Ukázalo se, že také pokles koncentrace sérového cholesterolu v období akutního onemocnění má své nežádoucí efekty, že nízká koncentrace cholesterolu může predikovat nepříznivý osud nemocného [7,10,12,76,77,79,99,113].

Ve studii došlo u všech nemocných k poklesu plasmatických koncentrací celkového cholesterolu v prvních 24 hodinách s postupnou úpravou hladin v průběhu 8 denního sledování. Koncentrace LDL cholesterolu trendově kopírovaly vývoj celkového cholesterolu. Tento nálezn potvrzuje a zvláště pak rozšiřuje nálezy dříve referovaných hypocholesterolemií u klinicky závažných stavů [3-12,93,94]. Přestože se obě sledované skupiny zásadně lišily věkovou strukturou, byl zaznamenán stejný výše zmíněný trend ve vývoji jednotlivých parametrů. Tento fakt dokládá univerzálnost této reakce bez ohledu na úroveň vstupních hodnot a s tím spojených věkově závislých rozdílů v metabolismu cholesterolu. Studie ukázala, že příčinou prudkého propadu v koncentracích celkového a LDL cholesterolu byla mimo jiné nízká resp. snížená endogenní syntéza cholesterolu, která byla vyjádřena v hladinách lathosterolu a poměru lathosterol/cholesterol. Tak jak docházelo ke stabilizaci nemocných, docházelo i k urychlení endogenní syntézy cholesterolu.

Při testování vztahu hladiny cholesterolu s tíží onemocnění (vyjádřeno jako APACHE II) nebyla nalezena statisticky signifikantní závislost. Nicméně byla-li srovnána tíže onemocnění (vyjádřena jako APACHE II) s markery endogenní syntézy cholesterolu (vyjádřeno jako lathosterol), byla nalezena statisticky signifikantní závislost. Můžeme proto

konstatovat, že čím těžší vstupní klinický stav, tím pomalejší syntéza cholesterolu a opačně, z úrovně endogenní syntézy cholesterolu lze předpovědět závažnost klinického stavu. Tento pohled se zdá být novým, neboť dosud byla srovnávána pouze hladina celkového cholesterolu k pozitivní nebo negativní prognóze nemocného.

Vstupní plasmatické koncentrace celkového cholesterolu (TC), LDL cholesterolu a HDL cholesterolu byly v obou sledovaných skupinách nízké ve srovnání s běžnými plasmatickými hladinami v české populaci i ve srovnání s kontrolní skupinou (k tomuto účelu byly pro srovnání stanoveny koncentrace cholesterolu a prekurzorů cholesterolu u 100 zdravých dárců krve). Ve skupině kardiochirurgických nemocných může být vysvětlením nízkých vstupních hladin současná terapie hypolipidemiky - statiny (100% konsekutivně přijatých nemocných bylo léčeno hypolipidemikem). Ve srovnání s daty sledování kardiovaskulární farmakoterapie v České republice lze odvodit, že došlo k zlepšení adherence k hypolipidemické terapii jak nemocných, tak spádových internistů nebo kardiologů [140]. Jedním z možných faktorů ovlivňujících nízké vstupní plasmatické koncentrace celkového, LDL a HDL cholesterolu ve skupině polytraumatizovaných, může být hemodiluce, vznikající v důsledku volumexpanze náhradními roztoky u hemodynamicky nestabilních nemocných v přednemocniční péči, a také posthemoragická anemie. V literatuře již byla popisována hypocholesterolemie u nemocných s anemií [74,76,107]. Ukazuje se, že kromě zvýšené potřeby cholesterolu jako stavebního kamene buněčné (a tedy i erytrocytární) stěny v době vystupňované produkce v kostní dřeni, může v souvislosti s anemií docházet také k výměně cholesterolu mezi plasmou a membránou červených krvinek nebo mezi extravaskulárním a intravaskulárním prostorem. Tímto způsobem může docházet ke změnám v plasmatických koncentracích cholesterolu. Hodnoty hematokritu (HKT) v den přijetí ve skupině polytraumat byly u mužů v průměru 0,315 ( $\pm$ SD 0,08), což představovalo 67% fyziologických hodnot HKT (tj. průměr 0,47) a u žen byl hematokrit v průměru 0,254 ( $\pm$ SD 0,07), což představovalo 60,4 % z fyziologického rozmezí (tj. 0,42). Při kompenzaci cholesterolémie na normální hodnoty hematokritu (tj. celkový cholesterol by byl ve skupině polytraumat u mužů 4,8 mmol/l a žen 3,8 mmol/l) lze konstatovat, že na vstupní hypocholesterolémii ve skupině polytraumat se spolupodílela hemodiluce. Nicméně při objasnění příčin prudkého poklesu hladiny celkového cholesterolu první den po operaci nebo úrazu jsme testovali závislost na množství podaných tekutin a nebyla nalezena statisticky významná závislost v plasmatických koncentracích cholesterolu a jeho prekurzorů na kumulativní dávce podaných tekutin. Vysvětlení rozvoje hypocholesterolemie se tedy jeví jako multifaktoriální.

Ve skupině kardiochirurgických nemocných jistě bylo jednou z možných příčin poklesu koncentrace cholesterolu na začátku sledovaného období přerušení p.o.příjmu stravy a tím také dodávky exogenního cholesterolu (toto bylo v den operace a jeden den následující bezprostředně po operaci). Tomuto vysvětlení by odpovídaly i nálezy v oblasti markerů absorpce sterolů, kde v plasmatických koncentracích campesterolu a  $\beta$ -sitosterolu došlo první den po operaci k poklesu hladin s následným zvyšováním hladin v průběhu celého sledovaného období až na původní (výchozí) hodnoty. Skupina polytraumatizovaných nemocných již nebyla tak homogenní a kromě přerušení p.o. příjmu na více jak 4 dny mohla sehrát svoji roli také aplikace parenterální výživy s nízkým obsahem cholesterolu (0,1 %) [141]. Na rozdíl od chylomikronů nejsou v tukové emulzi parenterální výživy, kromě zanedbatelného množství cholesterolu, také žádné estery cholesterolu a navíc je v tukové emulzi signifikantní příměs fytoosterolů (především sitosterolu). A právě mezi tukovými částicemi parenterální výživy a lipoproteiny dochází záhy po aplikaci (řádově v desítkách minut) k řadě metabolických pochodů (přechod apoproteinů z lipoproteinových částic do lipidových částic parenterální výživy, přechod esterů cholesterolu z HDL částic do tukových částic parenterální výživy atp), které zásadním způsobem mění charakter částic, ale i lipoproteinů. Z tohoto pohledu vnímáme myšlenku dodání cholesterolu v obohacených tukových emulzích jako možné řešení korekce hypocholesterolemie u kriticky nemocných. A skutečně v tomto směru také byla provedena experimentální práce, kde byla podávána parenterální výživa s tukovou emulzí obohacenou o volných cholesterol (4g/L) [142]. Přestože nedošlo ke vzestupu v plasmatických hladinách celkového cholesterolu, měly obohacené tukové emulze příznivý vliv na celkovou clearance triacylglyceridů, umělé částice tukové emulze byly více podobny nativním chylomikronům a tyto částice byly rychleji odstraňovány z plasmy. Zároveň došlo ke zvýšení oxidace mastných kyselin a zvýšené tvorbě ketolátů.

Ve skupině polytraumat byl zaznamenán silný vzestup v plasmatických hladinách  $\beta$ -sitosterolu, což lze vysvětlit právě výše zmíněným mechanismem arteficiální dodávky tukových emulzí v parenterální výživě. Tento nálezy nelze hodnotit jako vystupňování absorpce cholesterolu. Nicméně i při respektování výše zmíněného faktu ve skupině polytraumatizovaných nemocných došlo po přechodném poklesu plasmatických koncentrací campesterolu v období vystavení akutnímu stresu k jeho postupnému zvýšení, což lze hodnotit jako urychlení absorpce cholesterolu v období zlepšování celkového stavu.

V době působení infekce, velkého traumatu nebo operace dochází k vyplavení celé kaskády zánětlivých působků, které jsou obecně nazývány jako systémová zánětlivá odpověď organismu. Ve studii byl pozorován statisticky významný vzestup koncentrace interleukinu 6

(IL-6), a to bezprostředně po vzniku úrazového nebo operačního inzultu. U nekomplikovaných stavů vrcholila tato cytokinová aktivita 1 den sledování s postupným poklesem směrem k normálním hladinám na konci sledovaného období. Bylo prokázáno, že na poklesu hladin celkového a LDL cholesterolu se podílel právě efekt těchto zánětlivých cytokinů. Zároveň byla snížena endogenní syntéza cholesterolu, která byla vyjádřena v plasmatických koncentracích lathosterolu a poměru lathosterol/cholesterol. Ve skupině polytraumatizovaných nemocných byla nalezena statisticky významná závislost hladin IL-6 a poměru lathosterol/TC. Později, tak jak docházelo ke stabilizaci nemocných, docházelo k poklesu IL-6 a zároveň k urychlení endogenní syntézy cholesterolu. Tyto nálezy korespondují s literárními údaji. Při porovnání plasmatických hladin IL – 6 s hladinami celkového cholesterolu byla nalezena statisticky významná negativní korelace. Čím byla cytokinová reakce organismu bouřlivější, tím byla hladina celkového cholesterolu nižší. Zánětlivé cytokiny jsou schopny up-regulace aktivity LDL receptorů na hepatocytech, což vede ke snížení koncentrace LDL lipoproteinů v důsledku zvýšeného katabolismu LDL částic [86,87]. IL-6 stimuluje in vivo jaterní lipogenezi [88,89,143], a to cestou vzestupu aktivity lipogenetického enzymu acetyl-CoA karboxylasy a syntetasy mastných kyselin. Existují literární údaje, které dokládají, že v počátečních fázích kritického stavu je syntéza prekurzorů cholesterolu zřejmě zvýšena, a to až po úroveň farnesyly nebo skvalenu. Tyto prekurzory jsou ale v kritickém stavu zvýšeně spotřebovávány. Navíc dochází pravděpodobně k blokadě enzymů podílejících se na dalším kroku přeměny isoprenoidů na cholesterol, a to buď v oblasti skvalen syntetázy, nebo v počátečních krocích syntézy steroidního nukleu ze skvalenu, případně v prvních enzymatických procesech přeměny steroidního nukleolu –cyklo pentano perhydro fenantrenového jádra cestou přes lathosterol a lanosterol na cholesterol [84,85]. Nicméně efekt cytokinů na lipoproteinový metabolismus je komplexní a mechanismy vedoucí k poklesu koncentrace cholesterolu a jeho dostupnosti v plasmě nejsou stále do detailu prostudovány.

Ve studii byl také sledován vývoj markerů syntézy cholesterolu (skvalen, lathosterol). U skvalenu nebyla v obou skupinách nalezena statisticky významná změna. Ukazuje se, že interpretace výsledků hladin skvalenu, jako markeru endogenní syntézy cholesterolu, je velice obtížná. Skvalen se totiž nachází v různých poolech v organismu (játra, tuková tkáň, lipoproteiny), odkud může být v případě potřeby uvolňován. K uvolnění ze zásob dochází v případě zvýšené zátěže organismu (například při stresu), kdy se skvalen stává rychle dostupným prekurzorem syntézy cholesterolu [32,40]. Z tohoto pohledu je jeho hodnocení jako markeru syntézy cholesterolu problematické. Nicméně v hladinách lathosterolu (jako

druhého testovaného markeru syntézy cholesterolu) došlo již první den k poklesu s následným postupným vzestupem během sledovaného období. Lze tedy konstatovat, že k přechodnému poklesu v syntéze cholesterolu krátce po zátěžovém stavu došlo, a že s postupnou stabilizací a úpravou stavu došlo ke zvýšení endogenní syntézy. Vysvětlením rozdílných vstupních hladin lathosterolu (u kardiologické skupiny byla o 30% nižší hladina) se zdá být konkomitantní hypolipidemická terapie kardiologické skupiny.

Jednou z významných patofyziologických cest rozvoje hypocholesterolemie u akutně nemocných může být snížení proteosyntézy bílkovin, resp. proteosyntézy apoproteinů, neboli stavebních kamenů lipoproteinů. Pokles syntézy apoproteinů byl prokázán na populaci jaterních buněk, které byly vystaveny působení TNF- $\alpha$ , IL-1 a IL-6 [144]. V klinické studii byla prokázána, u kriticky nemocných na chirurgické JIP, nepřímá korelace mezi IL-6 a apolipoproteinem A1 (APO-A1) [12,111].

Ukazuje se, že hypocholesterolemie může být součástí negativní odpovědi akutní fáze onemocnění. Ve studii byly pozorovány významné změny v plasmatických koncentracích C reaktivního proteinu (CRP), celkového proteinu (TP – total protein), albuminu a prealbuminu. Vzestup zánětlivých markerů (CRP) a naopak pokles negativních markerů zánětu (TP, albumin, prealbumin) jsou vysvětlovány poklesem syntézy jaterních a plasmatických bílkovin a přesmykem proteosyntetické aktivity ve prospěch zánětlivých bílkovin v důsledku cytokiny zprostředkované zánětlivé odpovědi organismu [76,79,113]. Při porovnání plasmatických koncentrací IL-6 a bílkoviny s dlouhým, středním a krátkým biologickým poločasem (TP, albumin, prealbumin), byla nalezena statisticky významná korelace v den 8 u obou sledovaných skupin. Z tohoto nálezu lze vyvozovat, že efekt cytokinů na tvorbu bílkovin má jisté zpoždění vzhledem k nutnosti kalkulace biologického poločasu bílkovin.

Jedním z předpokládaných jevů ve studii bylo, že vstupní koncentrace lipidů budou v kardiologické skupině ovlivněny současnou terapií hypolipidemiky. Z tohoto pohledu se nám zdálo jako velice zajímavé srovnání dvou odlišných skupin, srovnání trendového vývoje lipidového spektra a prekurzorů lipidů v odlišných podmínkách. Hypolipidemika užívalo 100% kardiologických nemocných a to do posledního dne před prvním měřením v D0 a podle protokolu se tato terapie vracela 2 pooperační den. Pacienti užívali bez výjimky statiny, z toho 82% byl atorvastatin v průměrné dávce 20 mg/den a 18% byl simvastatin v průměrné dávce 25 mg/den. Nicméně z pohledu dynamiky změn v koncentracích cholesterolu, HDL cholesterolu, LDL cholesterolu a v markerech endogenní syntézy cholesterolu nebyl statisticky významný rozdíl v jednotlivých dnech mezi kardiologickou skupinou a skupinou s polytraumaty. Prudký pokles první den s postupným vzestupem k výchozím hodnotám byl zaznamenán bez

výjimky u všech nemocných bez ohledu na užívání hypolipidemické terapie. Vzhledem ke krátké době vysazení hypolipidemika (podle protokolu nemocní užívali hypolipidemikum do posledního dne před operací a medikace byla vrácena druhý pooperační den) a biologickému poločasům statinů (biologický poločas atorvastatinu je přibližně 14 hod, biologický poločas simvastatinu jsou přibližně 3,0 hod) [179] není pravděpodobné, že by tento fakt zásadně ovlivnil metabolismus cholesterolu. Navíc, pokud by se mělo vysazení hypolipidemické terapie projevit na plasmatických koncentracích sterolů, potom přesně opačným trendem, než bylo nalezeno. Tedy vzestupem syntézy cholesterolu a jeho prekurzorů. Poměrně překvapivým nálezem byla skutečnost, že dynamika a trendový průběh v hladinách lipidů se prakticky nelišily mezi oběma skupinami. Z uvedeného vyplývá, že je-li narušena syntéza cholesterolu, pak se pravděpodobně jedná o víceúrovňovou blokádu ve velice složité cestě jeho syntézy [84,85]. Dostupná literární data naznačují, že pacienti užívající statiny (inhibitory hydroxymethyl glutaryl CoA-reduktázy) mohou z této terapie v době zánětu profitovat. Vzhledem k tomu, že velké operační trauma, stejně tak jako úrazové trauma, navozují podobnou cytokinovou reakci s SIRS, dal by se očekávat příznivý vliv na obě skupiny nemocných. Za tzv. pleiotropní efekt statinů je považován jejich protizánětlivý, antioxidační, imunomodulační, antiapoptotický, antiproliferativní, antitrombotický a konečně i endotel protektivní efekt [145, 146]. Literárně se uvádí, že přestože pacienti se sepsí vstupující do studie se statinem měli více komorbidit, měla skupina léčená statinem menší stupeň závažnosti sepse než ti, kteří statin neužívali [147].

Ve studii byla ve skupině kardiochirurgických nemocných, vedle hypolipidemik, užitá ještě konkomitantní terapie antikoagulancii (nízkomolekulární heparin – low molecular weight heparin LMWH), a to v jednotné preventivní dávce 0,4 – 0,6 mg enoxaparínu 1x denně od prvního pooperačního dne po dobu 3 dnů od operace, během výkonu 200 j/kg hmotnosti nefrakcionovaného heparínu. Přestože je literárně popisována interference metabolismu lipidů s terapií antikoagulancii [108] (může docházet ke vzestupu internalizace LDL a VLDL lipoproteinů, který je následován poklesem v hladině sérového cholesterolu, dochází k mobilizaci jaterní lipázy a lipoproteinové lipázy s jejich uvolněním z cévního endotelu do plasy), domníváme se, že dávka podaná periprocedurálně byla natolik nízká, že je nepravděpodobné, aby zásadním způsobem ovlivnila metabolismus cholesterolu. K podpoře tohoto tvrzení je potřeba uvést, že trendový vývoj hladin lipidů byl v obou sledovaných skupinách identický, byť jedna ze skupin nedostávala v úvodu sledování antikoagulační terapii.

Simultánně s poklesem celkového cholesterolu došlo ve studii k poklesu HDL cholesterolu a LDL cholesterolu. Zatím co LDL cholesterol se reparaoval v čase symetricky

s celkovým cholesterolem, reparace HDL cholesterolu nebyla v období měření zaznamenána, respektive trendově spíše klesala. Nízká koncentrace HDL cholesterolu je považována za jeden z důležitých rizikových faktorů rozvoje infekčních komplikací chirurgických nemocných [148]. Pokles koncentrace HDL cholesterolu může souviset s vysokou koncentrací fosfolipázy A2 [149] nebo snížením exprese genu pro ATP-binding cassette transporter 1 [88]. Lipoproteiny, zejména HDL cholesterol, váží a neutralizují lipopolysacharidy. Zásadní roli v patogenezi sepse sehrávají lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, které se váží na řadu vazebných proteinů a receptorů a spouští komplexní imunitní odpověď [127]. Jednou z takovýchto bílkovin je lipopolysacharidový vazebný protein (LBP - lipopolysacharid binding protein), na který se naváže uvolněný lipopolysacharid a tento komplex posléze vazbou na buněčný receptor – CD14 monocytomakrofágového systému spustí tvorbu a výdej celé kaskády zánětlivých cytokinů [125]. V experimentu na zdravých dobrovolnících došlo po aplikaci jedné intravenózní dávky endotoxinu k vyplavení cytokinů a stresových hormonů, zároveň byly pozorovány změny v metabolismu lipidů včetně poklesu koncentrace HDL [116]. A právě endotoxin se může vázat s lipoproteinem HDL a je potom při vstupu do buňky neutralizován [125,126,128,129], čímž dochází k redukci intenzity uvolňovaných zánětlivých mediátorů [130,131].

Hypocholesterolemie navozená z jiného důvodu poté snižuje vazebnou kapacitu pro LBP - lipopolysacharid binding protein. Ve sledovaném souboru polytraumatizovaných nemocných bylo zaznamenáno 7 infekčních komplikací (z toho bylo 5 nemocných s bronchopneumonií, 1 nemocný s nitrobríšní infekcí a 1 nemocný s neuroinfekcí). Při porovnání vstupních plasmatických koncentrací HDL cholesterolu měla skupina bez infekčních komplikací o 33% vyšší průměrnou hladinu než skupina s pozdějšími infekčními komplikacemi (vstupní HDL průměr 0,833 mmol/L  $\pm$  0,236 ve skupině bez infekčních komplikací, vstupní HDL průměr 0,566 mmol/L  $\pm$  0,195 ve skupině s infekčními komplikacemi, P 0,045). Tento nálezní plně potvrzuje důležitou úlohu HDL v neutralizaci bakteriálních lipopolysacharidů. Na vazbě a neutralizaci lipopolysacharidů bakteriálních buněk se pravděpodobně spolupodílí ještě další látky. Důkazem byla experimentální práce, při níž odstraněním 99% LBP z plasmy došlo jen k 50% snížení transportu LPS do HDL [150]. Všechny tyto poznatky by mohly mít své klinické důsledky. Aplikace rekonstituovaného HDL v experimentu na zvířecím modelu snížila produkci TNF- $\alpha$  po podání LPS [132]. Podobné výsledky byly i na prasečím modelu se směsí lipoproteinových fosfolipidů včetně zlepšení vybraných hemodynamických parametrů [133] a stejně tak v humánních experimentech sledujících protizánětlivý efekt a vybrané koagulační parametry [134]. Navíc se ukazuje, že HDL má i jiné imunomodulační a



antioxidační funkce, které jsou zprostředkovány cestou inhibice aktivace a translokace nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) a aktivačního proteinu 1 (AP1) [151]. HDL je schopno ovlivňovat i expresi endoteliálních adhesivních molekul [152]. Není však doposud známo, zda výše zmíněné pozitivní efekty rekonstituovaného HDL povedou ke zlepšení prognózy nemocných a snížení mortality.

Vedle výše zmíněné vazby lipopolysacharidů by se hypocholesterolemie mohla uplatňovat také ve vztahu k nespecifickým obranným mechanismům proti bakteriím. Jednou z hypotéz studie byl předpoklad, že v průběhu velké stresové zátěže organismu dochází ke změně schopnosti tvorby superoxidových iontů fagocytárních buněk, jejichž konečné produkty jsou vysoce toxické pro mikroorganismy a jsou podstatou baktericidie. Polymorfonukleáry jsou v první linii obrany lidského organismu před infekčním agens a jejich účinek je dán uvolňováním reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) a proteolytických enzymů. Jedním z klíčových enzymů v tvorbě reaktivních forem kyslíku je NADPH oxidáza [153]. Tento enzym je inaktivován v nestimulovaných leukocytech, po stimulaci infekčním agens dochází k jeho aktivaci a mohutné produkci superoxidových aniontů. Z literatury je známo, že partikule bohaté na triacylglyceridy, jako jsou VLDL a LDL, jsou in vitro schopny modifikovat spontánní a chemotaktickou migraci polymorfonukleárů a uvolňování ROS [154-158] a to v tom smyslu, že VLDL a v menší míře i LDL stimulují produkci reaktivních forem kyslíku. Navíc další studie ukázaly, že cholesterol samotný představuje jeden z důležitých stimulů uvolňování ROS [159-161]. HDL je pak schopno napomáhat uvolňování proteolytických enzymů z polymorfonukleárů [154 – 156, 162]. Na základě výše zmíněných souvislostí jsme postulovali hypotézu, že v případě snížené hladiny cholesterolu lze předpokládat i sníženou schopnost uvolňování reaktivních forem kyslíku a tím i snížení nespecifické imunitní odpovědi. V práci prezentované výsledky ukázaly signifikantně nižší schopnost oxidativního vzplanutí, tj. sníženou baktericidii fagocytárních buněk. Snížení oxidativního vzplanutí bylo pozorováno u obou sledovaných skupin nemocných. Tento nálezný způsobem rozšiřuje poznání vztahu hypocholesterolemie a snížené obranyschopnosti organismu. Velice zajímavým v souvislosti se sledovanými skupinami je fakt, že ke snížení schopnosti oxidativního vzplanutí došlo i ve skupině léčené statiny, kde by se dalo očekávat ovlivnění způsobené extralipidovými efekty těchto léčiv. V souvislosti s terapií statiny nebyla v experimentu na zvířecím modelu prokázána schopnost statinu (simvastatinu) přímo ovlivnit produkci superoxidových aniontů [153]. Jiná práce však prokázala efekt snížení aktivity NADPH oxidázy a z toho plynoucího snížení oxidativního vzplanutí po aplikaci fluvastatinu, nikoliv však po aplikaci pravastatinu

[163,164]. Navíc se ukázalo, že tento efekt je závislý na koncentraci statinu tj. na velikosti podané dávky. Zdá se, že vliv statinů na tvorbu volných kyslíkových radikálů nemá jednotný „class effect“. Ve studii byl u nemocných léčených statiny (82% nemocných bylo léčeno atorvastatinem v průměrné dávce 20 mg/den a 18% nemocných bylo léčeno simvastatinem v průměrné dávce 25 mg/den) prokázán stejný výsledek snížení oxidativního vzplanutí po stimulaci jako u nemocných, kteří žádnou terapii statinem neměli.

Hypocholesterolemie v kritickém stavu bývá spojena dle některých literárních pramenů [114,115] s hypertriacylglycerolemií. Tento jev je vysvětlován jednak vzestupem VLDL v důsledku vzestupu jaterní lipogeneze, a také snížením clearance triacylglycerolů. Příčinou vzestupu jaterní lipogeneze je působení cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-6 [89], při kterém dochází k přeměření metabolismu mastných kyselin, vzestupu malonyl CoA a inhibici karnitin-acyltransferázy I, která je nezbytná pro vstup vyšších mastných kyselin do mitochondrií [118]. Část mastných kyselin je reesterifikována za vzniku TAG, které jsou uvolňovány do krevního oběhu ve formě lipoproteinů, především VLDL [119]. Na vzestupu TAG v plasmě se může navíc spolupodílet inhibiční vliv prozánětlivých cytokinů na lipoproteinovou lipázu (LPL) [120] a aktivace hormon senzitivní lipázy (HSL), jejímž působením dochází k mobilizaci volných mastných kyselin z tukové tkáně do krevního oběhu. Ve studii byl zaznamenán statisticky významný pokles plasmatických koncentrací TAG první den po operaci v kardiochirurgické skupině s postupnou normalizací bez toho, aby koncentrace TAG přesáhla předepsanou normu. TAG ve skupině polytraumat měly trendově vzestupnou tendenci a na konci sledovaného období dosáhly horní hranice normy. Nicméně zde je potřeba podotknout, že koncentrace TAG v této skupině mohly být do jisté míry modifikovány aplikací parenterální výživy s tukovými emulzemi. Vzhledem k předpokladu tohoto fenoménu jsme se snažili předejít tomuto zkreslení tím, že jsme v odběrovém protokolu studie u těchto nemocných ponechali 60 min „vyčechovací wash out“ (přerušení aplikace parenterální výživy) před vlastním odběrem krve. Ve studii nebyla používána žádná liposolubilní konkomitantní terapie, která by ovlivnila konečné koncentrace TAG. Význam literárně popisované hypertriacylglycerolemie není znám, nicméně v současnosti se doporučuje přísná monitorace TAG a v případě vzestupu jejich koncentrací snížení dávky tukových emulzí v parenterální výživě nebo liposolubilních medikamentů.

Cholesterol je základním stavebním kamenem v tvorbě stresových hormonů (kortizolu). Tyto jsou tvořeny v nadledvinkách, které však nemohou ve větší míře skladovat kortizol. Proto při zvýšené potřebě nadledvinkových hormonů při zátěži organismu dochází ke stimulaci kůry nadledvin vyplaveným ACTH (adrenokortikotropní hormon). Během stresu je cholesterol z

80% dominantním donorem substrátu pro tvorbu kortizolu, zbývajících 20% je syntetizováno in situ z acetátu a ostatních prekurzorů [135]. Navíc se na základě výsledků experimentálních studií zdá, že HDL je preferovaným cholesterolovým zdrojem steroidogenního substrátu v nadledvinkách [138, 139]. Předpokládá se, že pokles substrátu pro syntézu kortizolu v době zvýšené poptávky vede k rozvoji nadledvinkové insuficience [165]. Ve studii nebyla nalezena ani absolutní, ani relativní nadledvinková insuficience. K rozvoji nadledvinkové insuficience bude pravděpodobně zapotřebí hlubšího poklesu v plasmatických koncentracích celkového a HDL cholesterolu, jak naznačují práce některých autorů [139]. Jako diskriminační hladinu celkového plasmatického cholesterolu pro rozvoj nadledvinkové insuficience lze považovat hodnotu kolem 2,5 mmol/l. Nicméně může existovat ještě další vysvětlení toho, proč nebyla nadledvinková insuficience prokázána. Ve studii byl použit běžně užívaný zkrácený ACTH test s aplikací 250 ug Synactenu, kde jako diagnostické kritérium pro nadledvinkovou insuficienci je buď hodnota kortizolu po stimulaci nižší než 180 µg/L, nebo vzestup hladiny kortizolu (tzv. delta kortizol) po stimulaci o méně než 90 µg/L. Tato kritéria jsou však původně určena pro nestresované nemocné. Ukazuje se, že běžné hladiny kortizolu u kriticky nemocných jsou kolem 250 µg/L. Navíc je dávka 250µg ACTH supranormální (přesahuje 100 násobně maximální stresovou hladinu ACTH) [136] a může převyšovat nadledvinkovou rezistenci k ACTH. To znamená, že nemocný s normální odpovědí na supranormální dávku ACTH může po normální stresové dávce ACTH mít projev nadledvinkové insuficience [137]. Z tohoto důvodu někteří autoři používají k diagnostice nadledvinkové insuficience nízkodávkované ACTH testy, kde se podává dávka 1 nebo 2 µg ACTH [137, 166,167]. Tyto studie dokazují, že senzitivita nízkodávkovaného ACTH testu je vyšší než vysokodávkovaného. Navíc někteří autoři zpochybňují užitečnost kritéria delta kortizolu k stanovení nadledvinkové insuficience s odkazem na to, že nemocný ve stresu má maximálně vystimulovanou produkci kortizolu a supranormální stimulace ACTH tedy nemění funkci nadledvinek, ale nadledvinkovou rezervu [136]. Z uvedeného vyplývá, že nelze vyloučit, že při použití nízkodávkovaného ACTH testu by bylo možné prokázat nadledvinkovou insuficienci také u prezentovaného souboru nemocných.

Zcela nový a zajímavý se jeví vztah produkce kortikoidů ve stresu a hladiny TAG. V tomto smyslu byla ve studii nalezena statisticky významná korelace v obou sledovaných skupinách. Zdá se, že vysvětlení tohoto nálezu lze najít přes Lipin 1. Tento sehrává klíčovou roli v metabolismu lipidů v tukové tkáni, příčně pruhovaných svalech a játrech. Jeho fyziologickou úlohu zahrnují dvě buněčné funkce: regulace aktivity fosfatidát fosfatázy a

regulace oxidace mastných kyselin. Exprese lipin 1 genu (LPIN1) je řízena buněčnými steroly [168]. Lipin 1 má důležité jaderné a nejaderné funkce, které vedou k regulaci lipidů a energetického metabolismu. V cytosolu Lipin 1 sehrává roli jako  $Mg^{2+}$ -dependentní PAP1 (phosphatidate phosphatase type 1), který katalyzuje klíčový krok v syntéze triacylglycerolů [170-172]. PAP1 přeměňuje fosfatidát na diacylglycerol, který je přímým prekurzorem triacylglyceridů a fosfolipidů. V buněčném jádře sehrává Lipin 1 roli coby koaktivátor transkripce jeho přímou interakcí s peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) koaktivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). Lipin 1 také zvyšuje mitochondriální oxidaci mastných kyselin cestou zvýšení exprese PPAR  $\alpha$  [173]. Glukokortikoidy stimulují indukci exprese Lipin 1 v adipocytech a současně glucocorticoid response element (GRE) v LPIN1 promotoru se váže na glukokortikoidní receptor a vede k transkripční aktivaci v adipocytech a hepatocytech. Navíc na biosyntéze mastných kyselin a cholesterolu se současně podílí jako regulační prvky sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) [25-26,174-176]. Dva rozdílné geny SREBP-1 a SREBP-2, kódují tři SREBP isoformy (SREBP- 1a, SREBP-1c a SREBP-2) [25-26, 177]. Všechny SREBPs jsou syntetizovány jako transkripčně inaktivní prekurzory [174]. SREBP-1a a SREBP-1c jsou převážně zapojeny do lipogeneze, zatímco SREBP-2 je převážně zapojen do syntézy cholesterolu.[25, 178].

## 7. Závěry

Závěrem lze říci, že cholesterol se jeví v klinicky závažných stavech jako podmíněně esenciální nutrient. V rámci řešeného projektu byl nalezen v obou testovaných skupinách statisticky významný pokles celkového, LDL i HDL cholesterolu, a to bez výjimky.

Byla potvrzena kauzální souvislost prozánětlivého cytokinu typu IL-6 na plasmatické hladiny celkového, LDL a HDL cholesterolu. Vysvětlením prudkého poklesu v plasmatických hladinách celkového cholesterolu může být mimo jiné suprese endogenní syntézy cholesterolu. Intenzita endogenní syntézy cholesterolu je závislá na tíži onemocnění. Nižší hladiny lathosterolu a poměru lathosterol/cholesterol (jako markeru endogenní syntézy cholesterolu) byly spojeny s vyšším APACHE II. Ačkoliv v práci nebyla prokázána porucha syntézy stresových nadledvinkových hormonů (kortizolu), lze na základě nalezených výsledků vyvozovat souvislost mezi mírou endogenní syntézy cholesterolu a syntézou nadledvinkových hormonů.

Za jeden z velmi cenných výsledků studie lze považovat nález suprese baktericidní schopnosti granulocytů. Současně byla prokázána závislost této baktericidní schopnosti granulocytů na míře endogenní syntézy cholesterolu. Tento nález plně zapadá a rozšiřuje koncept vztahu hypocholesterolemie se zvýšenou incidencí infekčních komplikací u nemocných v akutním stavu, což bylo mimo jiné prokázáno taktéž v souvislosti s vyšším výskytem infekčních komplikací ve skupině polytraumatizovaných nemocných.

Cholesterol lze považovat za podmíněně nepostradatelnou složku výživy pro nemocné vystavené mimořádnému stresovému zatížení. Z hlediska terapeutického je hypocholesterolemie předmětem výzkumu. Doposud lze klinicky závažnou hypocholesterolemii u akutních stavů ovlivnit těsnou kontrolou glykemie, která byla prokázána jako jeden z faktorů vedoucích ke zvýšení hladin HDL a LDL cholesterolu. Další běžně dostupnou léčebnou alternativou ovlivnění hypocholesterolemie představuje časná enterální výživa, která příznivě ovlivňuje hladiny HDL cholesterolu. Včasné enterální podávání cholesterolu nebylo zatím realizováno, i když tento typ nutriční podpory v akutních stavech je v současné době předmětem výzkumu. Jinou formou suplementace cholesterolu u nemocných v akutních stavech by mohlo být obohacení tukových emulzí pro parenterální výživu. Přestože bylo experimentálně v této oblasti dosaženo některých pozoruhodných výsledků, zůstává tato možnost zatím v rovině experimentální terapie.

## 8. Seznam literatury

### Učební texty:

(údaje učebnicového charakteru nejsou v textu citovány)

- I) Blau N, Duran N, Blaskovics ME, Gibson KM. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. Berlin, Heidelberg. In Springer Verlag 2003 ISBN 3-540-42542-x
- II) Češka R, et al. Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií. In Triton 2005 ; ISBN 80-7254-738-0
- III) Ganong WF. Přehled lékařské fyziologie (20 vydání). In Galén 2005; ISBN80-7262-311-7
- IV) Holeček M. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. In Grada Publishing a.s. 2006 ; ISBN 80-247-1562-7
- V) Jabor A, et al. Vnitřní prostředí. In Grada Publishing a.s. 2008; ISBN 978-80-247-1221-5
- VI) Masopust J. Klinická biochemie, požadování a hodnocení biochemických vyšetření, část I. Nakladatelství Kaloninum, Praha 1998; ISBN 80-7184-648-1 (svazek 1)
- VII) Racek J et al. Klinická biochemie, 2.vydání. In Galén Praha 2006; ISBN 80-7262-324-9
- VIII) Silbernagl S, Despopoulos A. Atlas fyziologie člověka (6 vydání). In Grada Publishing a.s. 2004 ; ISBN 80-247-0630-X
- IX) Sobotka L, et al. Basics in clinical nutrition. Third Edition, In Galen 2004 ; ISBN 80-7262-292-7
- X) Zadák Z. Výživa v intenzivní péči. In Grada Publishing a.s.2002 ; ISBN 80-247-0320-3

## Literatura:

- 1) Vaverková H, Soška V, Rosolová H, et al. Doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií v dospělosti. *Cor et vasa* 2007; 49 (3): K73-K86
- 2) Goichot B, Schlienger JL, Grunenberger F, et al. Low cholesterol concentrations in free-living elderly subjects: Relations with dietary intake and nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1995; 62 (3): 547
- 3) Alvarez C, Ramos A. Lipids, lipoproteins and apoproteins in serum during infection. *Clin Chem* 1986; 32: 142-5
- 4) Elliot DC, Wiles SE. Low lipid concentrations in critical illness: hypocholesterolemia among trauma patients. *Crit Care Med* 1997; 25: 1437-39
- 5) Gui D, Spada PL, De Gaetano A, et al. Hypocholesterolemie and risk of death in the critically ill surgical patient. *Intensive Care Med* 1996; 2: 790-94
- 6) Wolfram G, Eckard J, Zollner N. Disturbances of lipoprotein and fatty acid metabolism in patients with heavy injuries. *Wien Klin Wochenschr* 1980; 58: 1327-37
- 7) Dunham CM, Fealk MH et al. Following severe injury, hypocholesterolemia improves with convalescence but persists with organ failure or onset of infection. *Crit Care* 2003; 7: 145-153
- 8) Bakalář B, Hyšpler R, Pachel J, et al. Changes in cholesterol and its precursors during the first days after major trauma. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115(21-22): 775-9
- 9) Windler E, Ewers-Grabow U, Thiery J, et al. The prognostic value of hypocholesterolemia in hospitalized patients. *Clin Invest* 1994; 72: 939-43
- 10) Bonville DA, Parker TS, Levine DM, et al. The relationships of hypocholesterolemia to cytokine concentrations and mortality in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Surg Infect* 2004; 5: 39-49
- 11) Fraunberger P, Nagel D, Walli AK, et al. Serum cholesterol and mortality in patients with multiple organ failure. *Crit Care Med* 2000; 28: 3574-5
- 12) Gordon BR, Parker TS, Levine DM, et al. Relationship of hypolipidemia to cytokine concentrations and outcomes in critically ill patients. *Crit Care Med* 2001; 29:1563-8
- 13) Murray RK. et al: *Harper's Biochemistry*, 23. ed, Appleton and Lange, a Publishing Division of Prentice-Hall International, Connecticut, 1993
- 14) Altmann SW, Davis HR, Zhu I, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303: 1201-4

- 15) Stein O, Thiery J, Stein Y. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? *Atheroscler* 2002; 160:1-10
- 16) Bietrix F, Yan D, Nauze M, et al. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* 2006; 281: 7214-9
- 17) Davis HR, Zhu I, Hoos LM, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2004; 279: 33586-92
- 18) Valasek MA, Clarke SL, Repa JJ. Fenofibrate reduces intestinal cholesterol absorption via PPARalpha -dependent modulation of NPC1L1 expression in mouse. *J Lipid Res* 2007; 48 (12): 2725-35
- 19) Levy E, Schohraya S, Sinnott D, et al. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipid* 2007; 18: 310-8
- 20) Nauli AM, Nassir F, Zheng, et al. CD 36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterol* 2006; 131: 1197-207
- 21) Kramer W, Girbig F, Corsiero D, et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem* 2005; 280: 1306-20
- 22) Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high-density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271: 518-20
- 23) Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lip Res* 2001; 42: 1717-26
- 24) Gibbons GF, Mitropoulos KA, Myant NB: *Biochemistry of cholesterol*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford, 1982
- 25) Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109: 1125-31
- 26) Rawson RB. The SREBP pathway - insight from insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 631-40
- 27) Lo Sasso G, Petruzelli M, Moschetta A, et al. A traslational view on the biliary lipid secretory network. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781(3): 79-96
- 28) Avigan J, Steinberg D. Sterol and bile acid excretion in man and the effects of dietary fat. *J Clin Invest* 1965; 44: 1845-56



- 29) Parker TS, McNamara DJ, Brown CD, et al. Plasma mevalonate as a measure of cholesterol synthesis in man. *J Clin Invest* 1984; 74: 795-804
- 30) Hyšpler R, Crhova S, Gasparič J, et al. Determination of isoprene in human expired breath using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 28: 183-90
- 31) Miettinen TA. Diurnal variation of cholesterol precursors squalene and methyl sterols in human plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1982; 23: 466-73
- 32) Bjorkhem I, Miettinen T, Reihner E, et al. Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMGCoA reductase in human liver. *J Lipid Res* 1987; 28: 1137-43
- 33) Jones PJH. Regulation of cholesterol biosynthesis by diet in humans. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 438-46
- 34) Taylor CB, Mikkelsen B, Anderson JA, et al. Human serum cholesterol synthesis measured with the deuterium label. *Arch Path* 1966; 81: 213-31
- 35) Di Buono M, Jones PHJ, Beaumier L, et al. Comparison of deuterium incorporation and mass isotopomer distribution analysis for measurement of human cholesterol biosynthesis. *J Lip Res* 2000; 41: 1516-23
- 36) Jones JP, Pappu AS, Illingworth DR, et al. Correspondence between plasma mevalonic acid levels and deuterium uptake in measuring human cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 609-20
- 37) Beylot M. Use of stable isotopes to evaluate the functional effects of nutrients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9(6): 734-9
- 38) Stellard F. Use of dual isotope tracer in biomedical research. *Isotopes Environ Health Stud* 2005; 41: 275-86
- 39) Kuksis A. Plasma non-cholesterol sterols. *J of Chromatogr A* 2001; 935: 203-36
- 40) Liu GCK, Ahrens EH, Schreibman PH, et al. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application. *J Lipid Res* 1976; 17: 38-45
- 41) Saudek ChD, Frier BM, Liu GCK. Plasma squalene: Lipoprotein distribution and kinetic analysis. *J Lipid Res* 1978;19: 827-35
- 42) Hashim YZ, Eng M, Gill CI, et al. Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutr Rev* 2005; 63(11): 374-86
- 43) Stark AH, Madar Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev* 2002; 60(6): 170–6

- 44) Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, et al. Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. *J Lipid Res* 1988; 29(9): 1149-55
- 45) Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, et al. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 939-66
- 46) Schrick L, Fujioka S, Takatsuto S, et al. A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and the cellulose in *Arabidopsis*. *Plant J* 2004; 38: 227-43
- 47) Wilund KR, Yu L, Xu F, et al. Plant sterol levels are not associated with atherosclerosis in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2326–32
- 48) Miettinen TA, Tilvis RS, Kesämiemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 1990; 13: 20–31
- 49) Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 1993; 40: 302-8
- 50) Normén L, Dutta P, Lia A, et al. Soy sitosterol esters and  $\beta$ -sitostanol ester as inhibitors of cholesterol in human small bowel. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 9008-13
- 51) Silbernagel G, Fauler G, Renner W, et al. The relationships of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with the severity of coronary artery disease. *J Lipid Res* 2009; 50(2): 334–41
- 52) Plat J, Mensink RP. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *FASEB J* 2002; 16(10): 1248-53
- 53) Skeaff CM, Thoma C, Mann J, et al. Isocaloric substitution of plant sterol-enriched fat spread for carbohydrate-rich foods in a low-fat, fibre-rich diet decreases plasma low-density lipoprotein cholesterol and increases high-density lipoprotein concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15: 337-44
- 54) Langheim S, Yu L, von Bergmann K, et al. ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J Lipid Res* 2005; 46: 1732-8
- 55) Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atheroscler* 2010; 211(2): 361-70
- 56) Miettinen TA, Kesaniemi YA, Jarvinen H, et al. Cholesterol precursor sterols, plant sterols, and cholestanol in human bile and gallstones. *Gastroenterol* 1986;90(4): 858–64

- 57) Koivusalo AI, Pakarinen MP, Sittiwet C, et al. Cholesterol, non-cholesterol sterols and bile acids in paediatric gallstones. *Dig Liver Dis* 2010; 42(1): 61–6
- 58) Llop JM, Virgili N, Moreno-Villares JM, et al. Phytosterolemia in parenteral nutrition patients: implications for liver disease development. *Nutrition* 2008; 24(11-12):1145–52
- 59) Clayton PT, Whitfield P, Iyer K. The role of phytosterols in the pathogenesis of liver complications of pediatric parenteral nutrition. *Nutrition* 1998; 14(1): 158–64
- 60) Kuksis A, Marai L, Myher JJ, et al. Identification of plant sterols in plasma and red blood cells of man and experimental animals. *Lipids* 1976; 11(8): 581–96
- 61) Rytnayake WM, L'Abbé MR, Mueller R, et al. Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2000; 130(5): 1166–78
- 62) Jones PJ, Raeini-Sarjaz M, Jenkins DJ, et al. Effects of a diet high in plant sterols, vegetable proteins, and viscous fibers (dietary portfolio) on circulating sterol levels and red cell fragility in hypercholesterolemic subjects. *Lipids* 2005; 40(2): 169–74
- 63) De Jong A, Plat J, Mensink RP. Plant sterol or stanol consumption does not affect erythrocyte osmotic fragility in patients on statin treatment. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60(8): 985–90
- 64) Yamagishi K, Iso H, Date C, et al. Fish, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and mortality from cardiovascular diseases in a nationwide community-based cohort of Japanese men and women the JACC (Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk) Study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 988-96
- 65) Singer P, Shapiro H, Theilla M, et al. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Int Care Med* 2008; 34: 1580-92
- 66) Schaffer JE. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol* 2002; 282: 239-46
- 67) Glatz JFC, Storch J. Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 267-74
- 68) Glatz JFC, Bonen A, Luiken JFP. Exercise and insulin increase muscle fatty acid uptake by recruiting putative fatty acid transporters to the sarcolemma. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 365-70
- 69) Alpers DH, Bass NM, Engle MJ, et al. Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1483: 352-62

- 70) Tong L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1784-803
- 71) Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Natur* 2004; 428: 569-74
- 72) Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res* 2002; 43: 1585-94
- 73) Thannhauser SJ, Schaber H. Über beziehungen des gleichgewichtes cholesterin und cholesterinester im blut und serum zur leberfunktion. *Klin Wochenschr* 1926; 7:252-3
- 74) Giovannini I, Chiarla C, Greco F, et al. Characterization of biochemical and clinical correlates of hypocholesterolemia after hepatectomy. *Clin Chemistry* 2003; 49: 317-20
- 75) Gordon BR, Parker TS, Levine DM, et al. Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia. *Crit Car Med* 1996; 24: 584-9
- 76) Giovannini I, Boldrini G, Chiarla C et al: Pathophysiologic correlates of hypocholesterolemia in critically ill surgical patients. *Int Care Med* 1999; 25: 748-51
- 77) Vyroubal P, Chiarla C, Giovannini I, et al. Hypocholesterolemia in clinically serious conditions – review. *Biochem Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008; 152(2): 181-9
- 78) Vyroubal P, Zadák Z, Hyspler R, et al. Syntéza sterolů v průběhu polytraumatu. *Voj Zdrav List* 2009; 4: 135-42
- 79) Marik PE. Dyslipidemia in the critically ill. *Crit Care Clin* 2006; 22: 151-9
- 80) Bakalar B, Zadak Z, Pachtl J. Severe hypocholesterolemia is associated with adrenal insufficiency in multiple trauma patients. *Intens Care Med* 2001; 27(S2): 253-9
- 81) Lopez-Martinez J, Sanchez-Castilla M, Garcia-de-Lorenzo A: Hypocholesterolemia in critically ill patients. *Intens Care Med* 2000; 26: 259-60
- 82) Giovannini I, Chiarla C, Giuliante F, et al. Hypocholesterolemia in surgical trauma, sepsis, other acute conditions and critical illness. in Kramer MA: Trends in cholesterol research, Nova Biomedical 2005, 137-61, ISBN 1-59454-378-X
- 83) Pandolfino J, Haakimian D, Rademaker AW, et al. Hypocholesterolemia in hairy cell leukemia: a marker for proliferative activity. *Am J Hematol* 1997; 55(3): 129-33
- 84) Murch O, Collin M, Hinds CJ, et al. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Int Care Med* 2007; 33: 13-24
- 85) Wendel M, Paul R, Heller A. Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Int Care Med* 2007; 33: 25-35

- 86) Harada K, Shimano H, Kawakami M, et al. Effect of tumor necrosis factor/cachectin on the activity of the low density lipoprotein receptor on human skin fibroblast. *Biochem Biophys Res Comm* 1990; 172: 1022-7
- 87) Moran CS, Campbell JH, Campbell GR. Human leukemia inhibitory factor upregulates LDL receptors on liver cells and decreases serum cholesterol in the cholesterol-fed rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1267-73
- 88) Panousis CG, Zuckerman SH. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter-1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1567-71
- 89) Feingold KR, Soued M, Adi S, et al. Tumor necrosis factor increased hepatic very-low-density lipoprotein production and increased serum triglyceride levels in diabetic rats. *Diabet* 1990; 39: 1569-74
- 90) Ney DM, Yang H, River J, Lasekan JB. Total parenteral nutrition containing medium vs. long chain triglyceride emulsions elevates plasma cholesterol concentrations in rats. *J Nutr* 1993; 123: 883-92
- 91) Havel E, Sobotka L, Bláha V, et al. Vliv zahájení enterální výživy na zvýšení hladin HDL. Abstract in: Zadák Z.: *Nutriční a metabolická podpora u kritických stavů a orgánového selhání*, Losenický, Nové Město nad Metují, 2001; 19-21
- 92) Havel E, Sobotka L, Maňák J, et al. Význam enterální výživy v léčbě kriticky nemocných. *Anest Intensiv Med* 2001; 12(1): 37-42
- 93) Coombes EJ, Shakespeare PG, Batstone GF. Lipoprotein changes after burn injury in man. *J Traum* 1980; 20: 971-5
- 94) Kamolz LP, Andel H, Mittlbock M, et al. Serum cholesterol and triglycerides: potential role in mortality prediction. *Burns* 2003; 29: 810-15
- 95) Hrnčiarikova D, Hyspler R, Vyroubal P, et al. Serum lipids and neopterin in urine as new biomarkers of malnutrition and inflammation in the elderly. *Nutrit* 2009; 25(3): 303-8
- 96) Chiarla C; Giovannini I, Siegel JH, et al. Relationship of plasma cholesterol to doses of branch-chain amino acids in sepsis. *Crit Care Med* 1990; 18: 32-6
- 97) Chiarla C; Giovannini I, Siegel JH, et al. The relationship between plasma taurine and other amino acid levels in human sepsis. *J Nutr* 2000; 130: 2222-7
- 98) Chiarla C; Giovannini I, Siegel JH. Hypotransferrinemia and changes in plasma lipid and metabolic patterns in sepsis. *Amino Acids* 2009; 36: 327-31

- 99) Memis D, Gursoy O, Tasdogan M, et al. High C-reactive protein and low cholesterol levels are prognostic markers of survival in severe sepsis. *J Clin Anesth* 2007; 19: 186-91
- 100) Sato M, Nagao K, Sakono M, et al. Low protein diets posttranscriptionally repress apolipoprotein B expression in rat liver. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 381-5
- 101) Chiarla C; Giovannini I, Boldrini G, et al. The influence of amino acid load and energy expenditure on plasma cholesterol levels in sepsis. *Acta Med Rom* 1989; 27: 166-70
- 102) Casiglia E; Mazza A, Tikhonoff W, et al. Total cholesterol and mortality in the elderly. *J Intern Med* 2003; 254: 353-62
- 103) Schalk BW; Visser M, Deeg DJ, et al. Lower levels of serum albumin and total cholesterol and future decline in functional performance in older persons: The Longitudinal Aging Study Amsterdam. *Age Ageing* 2004; 33: 266-72
- 104) Kritchevsky S.B.: Serum cholesterol and cancer risk. An epidemiologic prospective. *Ann Rev Nutr* 1992; 12: 391-416
- 105) Weverling-Rijnsburger AWE; Blau GJ, Lagaay AM, et al. Total cholesterol and risk of mortality in the oldest old. *Lancet* 1997; 350: 1119-23
- 106) Bakalár B, Zadák Z, Páchl J, et al. Hypocholesterolemie po polytraumatu není způsobena prostou hemodilucí. *Rozhl Chir* 2001; 80(2): 67-71
- 107) Atac B, Brahaj D, Frishman WH, et al. Anemia and hypocholesterolemia. *Heart Dis* 2003; 5: 65-71
- 108) Mulder M, Lombardi P, Jansen H, et al. Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulphate proteoglycans via lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1993; 268: 9369-75
- 109) Cailleux A, Cogny M, Allain P. Decrease of isoprene concentrations in blood during general anaesthesia. *Biochem Med Metabol Biol* 1992; 47: 157-60
- 110) Cooper AD, Akdeniz A, Hardy KJ. Effects of liver transplantation and resection on lipid parameters. A longitudinal study. *Aust N Z J Surg* 1996; 66: 743-6
- 111) Chiarla C; Giovannini I, Siegel JH, et al. The relationship between plasma cholesterol, amino acid and acute phase proteins in sepsis. *Amino Acids* 2004;27: 97-100
- 112) Giovannini I, Chiarla C, Giuliante F, et al. Biochemical and clinical correlates of hypouricemia in surgical and critically ill patients. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1207-10

- 113) Chiarla C, Giovannini I, Giuliante F, et al. Severe hypocholesterolemia in surgical patients, sepsis and critical illness. *J Crit Care* 2010; 25(2): 361-7
- 114) Chenaud C, Merlani PG, Roux-Lombard P, et al. Low apolipoprotein A-I level at intensive care unit admission and systemic inflammatory response syndrome exacerbation. *Crit Care Med* 2004; 32: 632-7
- 115) Feingold KRI, Staprans RA, Memon AH, et al. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J Lipid Res* 1992; 33: 1765-76
- 116) Hudgins LC, Parker TS, Levine DM, et al. A single intravenous dose of endotoxin rapidly alters serum lipoproteins and lipid transfer proteins in normal volunteers. *J Lipid Res* 2003; 44: 1489-98
- 117) Van Leeuwen HJ, Heezius ECJM, Dallinga GM, et al. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31: 1359-66
- 118) Beylot M, Vidal H, Mithieux G, et al. Inhibition of hepatic ketogenesis by tumor necrosis factor -  $\alpha$  in rats. *Am J Physiol* 1992; 263: E897-E902
- 119) Pailla K, El-Mir MY, Cynober L, et al. Cytokine – mediated inhibition of ketogenesis is unrelated to nitric oxide or protein synthesis. *Clin Nutr* 2001; 20: 313-7
- 120) Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 2003; 80: 753-69
- 121) Jacobs D., Blackburn H., Higgins M., et al: Report of the conference on low blood cholesterol: Mortality associations. *Circul* 1992; 86: 1046-60
- 122) Muldoon MF, Marsland A, Flory JD, et al: Immune system differences in men with hypo- or hypercholesterolemia. *Clin Immun Immunopathol* 1997; 84: 145-9
- 123) Roux C, Wolf C, Mulliez N, et al. Role of cholesterol in embryonic development. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(S): 1270-9
- 124) Gibbons GF, Mitropoulos KA, Myant NB: *Biochemistry of cholesterol*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford, 1982
- 125) Freudenberg MA, Bog-Hansen TC, Back U, et al. Interaction of lipopolysaccharides with plasma high density lipoprotein in rats. *Infect Immun* 1980; 28: 373-80
- 126) Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, et al: Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J Clin Invest* 1993; 97: 1028-34

- 127) Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3): 379-414
- 128) Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, et al: In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 12040-4
- 129) Ulevitch R.J., Johnson A.R., Weinstein D.B. New function for high density lipoproteins. Isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide- high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma. *J Clin Invest* 1981; 67(3): 827-37
- 130) McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression on a rodent model of endotoxic shock. *Shock* 2003; 20: 551-7
- 131) Von Erckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Cur Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8: 147-52
- 132) Hubsch AP, Casas AT, Doran JE. Protective effects of reconstituted high-density lipoprotein in rabbit gram-negative bacteremia models. *J Lab Clin Med* 1995; 126: 548-58
- 133) Goldfarb RD, Parker TS, Levine DM, et al. Protein-free phospholipid emulsion treatment improved cardiopulmonary function and survival in porcine sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: 550-7
- 134) Pakjrt D, Doran JE, Koster F, et al. Antiinflammatory effect of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med* 1996; 184: 1601-8
- 135) Borkowski AJ, Levin S, Delcroix C, et al. Blood cholesterol and hydrocortisone production in man: quantitative aspects of the utilization of circulating cholesterol by the adrenals at rest and under adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Invest* 1967; 46: 797-811
- 136) Marik PE, Zaloga GP. Adrenal insufficiency in the critically ill: a new look at an old problem. *Chest* 2002; 122:1784-96
- 137) Marik PE, Zaloga GP. Adrenal insufficiency during septic shock. *Crit Care Med* 2003; 31:141-5
- 138) Yaguchi H, Tsutsumi K, Shimono K, et al. Involvement of high-density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculoreticularis cells. *Life Sci* 1998; 62: 1387-95



- 139) Van der Voort PHJ, Gerritsen RT, Bakker AJ, et al. HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen in critically ill patients. *Int Car Med* 2003; 29: 2199-203
- 140) Widimský J, Jurán F, Vaněk P, et al. Výrazné zlepšení stavu kardiovaskulární farmakoterapie u nemocných po infarktu myokardu /a/nebo revaskularizaci myokardu v roce 1999/2000 v ČR oproti stavu v roce 1995. *Cor Vasa* 2001; 43: 34-40
- 141) Zadák Z. Výživa v intenzivní péči. 2002. In: Grada Publishing a.s. ISBN 80-247-0320-3
- 142) Druml W, Fischer M. Cholesterol improves the utilization of parenteral lipid emulsion. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115 (21-22): 767-74
- 143) Brass EP, Vetter HV. Interleukin-6, but not tumor necrosis factor -  $\alpha$ , increases lipogenesis in rat hepatocyte primary cultures. *Biochem J* 1994; 301: 193-7
- 144) Ettinger WH, Varma VK, Sorci-Thomas M, et al. Cytokines decrease apolipoprotein accumulation in medium from Hep G2 cells. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 8-13
- 145) Blanco-Colio LM, Tunon J, Martin-Ventura JL, et al. Antiinflammatory and immunomodulatory effect of statins. *Kidney Int* 2003; 63: 12-23
- 146) Novack V, Terblanche M, Almog Y. Do statins have a role in preventing or treating sepsis? *Crit Care* 2006; 10(1): 113
- 147) Among Y, Shefer A, Novack V, et al. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Circul* 2004; 110: 880-5
- 148) Delgado-Rodriques M, Medina-Cuadros M, Martinez-Gallego G, et al. Total cholesterol, HDL cholesterol and risk of nosocomial infection: a prospective study in surgical patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 9-18
- 149) Tietge UJ, Maugeais C, Cain W, et al. Overexpression of secretory phospholipase A2 caused rapid catabolism and altered tissue uptake of high-density lipoprotein cholesterol ester and lipoprotein A-1. *J Biol Chem* 2000; 275:10077-84
- 150) Vesly CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, et al. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from Gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun* 2000; 68: 2410-7
- 151) Park SH, Park JH, Kang JS, et al. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 168-82

- 152) Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, et al. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1987-94
- 153) Diebolt BA, Bhagavan NV, Guillory RJ. Influences of lovastatin administration on the respiratory burst of leukocytes and the phosphorylation potential of mitochondria in quinea pigs. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1200: 100–8
- 154) Polacek, D., Byme, RE, Burrous, M. et al. Factors controlling the release from human blood polymorphonuclear cells in vitro of a proteolytic activity directed against apolipoprotein AII. *J Biol Chem* 1984; 259: 14531-6
- 155) Bonneau C, Couderc R, Roch-Arveiller M, et al. Effects of human low-density lipoproteins on human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 1188-9
- 156) Idohou N, Roch-Arveiller M, Bonneau C, et al. In vitro modulating effect of human very-low-density lipoproteins on human polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism and migration. *J Leukocyte Biol* 1991; 50: 1-9
- 157) Fernanda B. Araujo, Décio S. Barbosa, Chang Y. Hsin, et al. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atheroscler* 1995; 117(1): 61-71
- 158) Couderc R, Bonneau C, Tissot M, et al. Effects of plasma lipoproteins on the production of superoxide anion by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Biofact* 1997; 6(2): 157-63
- 159) Ludwig PW, Hunninghake DB, Hoidal JR. Increased leukocyte oxidative metabolism in hyperlipoproteinemia. *Lancet* 1982; 2: 348-50
- 160) Krause S, Pohl C, Liebrez A, et al. Increased generation of reactive oxygen species in monuclear blood cells from hypercholesterolemic patients. *Thromb Res* 1993; 71: 237-40
- 161) Real JT, Martínez-Hervás S, Tormos MC, et al. Increased oxidative stress levels and normal antioxidant enzyme activity in circulating mononuclear cells from patients of familial hypercholesterolemia. *Metabol* 2010; 59(2): 293-8
- 162) Cogny A, Paul JL, Atger V, et al. Structural changes of high-density-lipoprotein apolipoproteins following incubation with human polymorphonuclear cells. *Eur J Biochem* 1994; 222(3): 965–73
- 163) Bandoh T, Sato EF, Mitani H, et al. Antioxidative potential of fluvastatin via the inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activity. *Biol Pharm Bull* 2003; 26(6): 818–22

- 164) Seres I, Foris G, Páll D, et al. Angiotensin II-induced oxidative burst is fluvastatin sensitive in neutrophils of patients with hypercholesterolemia. *Metabol* 2005; 54(9): 1147–54
- 165) Zaloga GP. Sepsis-induced adrenal deficiency syndrome. *Crit Care Med* 2001; 29: 688–90
- 166) Richards ML, Caplan RH, Wickus GG, et al. The rapid low-dose (1 microgram) cosyntropin test in the immediate postoperative period: results in elderly subjects after major abdominal surgery. *Surg* 1999; 125: 431–40
- 167) Mayenknecht J, Diederich S, Bahr V, et al. Comparison of low and high dose corticotropin stimulation tests in patients with pituitary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1558–62
- 168) Ishimoto K, Nakamura H, Tachibana K, et al. Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells. *J Biol Chem* 2009; 284(33): 22195–205
- 169) Reue, K., and Zhang, P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. *FEBS Lett* 2008; 582(1): 90–6
- 170) Han GS, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem* 2006; 281(14): 9210–8
- 171) Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, et al. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem* 2007; 282(6): 3450–7
- 172) Harris TE, Huffman TA, Chi A, et al. Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J Biol Chem* 2007; 282 (1): 277–86
- 173) Finck BN, Gropler MC, Chen Z, et al. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPAR alpha regulatory pathway. *Cell Metab* 2006; 4(3): 199–210
- 174) Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89(3): 331–40
- 175) Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96, 11041–8
- 176) Brown MS, Ye J, Rawson RB, et al. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 2000; 100 (4): 391–8

- 177) Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 1091–5
- 178) Horton JD, Shah NA, Warrington JA, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(21): 12027–32
- 179) Špínarová L, Vítovec J. Současné postavení pravastatinu v hypolipidemické léčbě. *Kardiol Rev* 2010; 12(3): 138-42

## 9. Publikační a přednášková aktivita

1. **Vyroubal P**, Chiarla C, Giovannini I, Hyšpler R, Tichá A, Hrnčiariková D, Zadák Z. Hypcholesterolemia in clinically serious conditions – review. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2008; 152(2): 181-9,
2. **Vyroubal P**, Zadák Z, Hyspler R, Tichá A, Cerman J, Bajnárek J, Hronek M, Havel E. Syntéza sterolů v průběhu polytraumatu. Voj Zdrav List 2009; 4: 135–42
3. **Vyroubal P**, Hyšpler R, Tichá A, Samek J, Cerman J, Havel E, Bajnárek J, Zadák Z. Porucha syntézy cholesterolu a jeho prekurzorů u klinicky závažných stavů. Odesláno a přijato k publikaci Vnitř Lék 2011; 57(5):
4. Hrnčiarikova D, Hyspler R, **Vyroubal P**, Klemera P, Hronek M, Zadák Z. Serum lipids and neopterin in urine as new biomarkers of malnutrition and inflammation in the elderly. Nutrit 2009; 25(3): 303-308 *IF 2009 2,604*
5. **Vyroubal P**, Zadák Z. Poruchy syntézy cholesterolu a jeho deplece – klinické důsledky a možnosti jeho léčebného ovlivnění v intenzivní péči. Závěrečná zpráva grantového projektu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR. Registrační číslo NR 8921-3
6. **Vyroubal P**, Zadák Z, Hyšpler R, Tichá A, Cerman J, Havel E, Samek J, Mottl R, Maňák J, Fric M. Poruchy syntézy cholesterolu a jeho deplece u klinicky závažných stavů – poster. Publikováno v Sborníku abstraktů a přednášek II. česko-slovenský kongres intenzivní medicíny 4.6.6.2008 Plzeň. ISBN 978-80-7177-004-6
7. Hyspler R, Tichá A, **Vyroubal P**, Zadák Z. The relationship of cholesterol metabolism and selected inflammatory parameters in critical care. Poster. 30th Congress of ESPEN, Florence, Italy 13-16 September 2008. Publikováno v Clin Nutr Suppl 2008; 3(1): 218-219. ISSN 1744-1161
8. **Vyroubal P**, Zadák Z, Hyšplar R, Tichá A, Havel E, Samek J. Disturbances of synthesis of cholesterol in intensive care. Abstract. Publikováno v Acta Med 2007; 50(1): 89-90. ISSN 1211-4286
9. **Vyroubal P**, Zadák Z, Hyšplar R, Tichá A, Havel E, Samek J. Disturbances of synthesis of cholesterol in intensive care. Abstract. Publikováno v Acta Med 2008; 51(1): 91. ISSN 1211-4286

10. **Vyroubal P**, Samek J, Hyšpler R, Tichá A, Zadák Z. Disturbances of synthesis of cholesterol and its depletion in cardiosurgical patients. Abstract. Publikováno v Acta Med 2009; 52(1): 53. ISSN 1211-4286
11. **Vyroubal P**. Poruchy syntézy cholesterolu a jeho deplece – klinické důsledky a možnosti jeho léčebného ovlivnění v intenzivní péči. Přednáška na XIII. Vědecké konferenci LF UK Hradec Králové a FN Hradec Králové dne 21.1.2009.
12. **Vyroubal P**. Dosavadní výsledky grantu metabolismu cholesterolu u polytraumat. Přednáška na Seminári odborné skupiny Centra pro výzkum a vývoj LF a FN Hradec Králové. 18.6.2008
13. **Vyroubal P**. Metabolismus cholesterolu u kriticky nemocných. Vyzvaná přednáška na V. Česko-Slovenském kongresu intenzivní medicíny, Praha 12.5.2011