

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

Doktorský studijní program  
**Vnitřní nemoci**

**Změny metabolismu lipidů u akutních stavů**

**Changes in lipid metabolism in acute diseases**

**MUDr. Vladimír Hrabovský**

Titul: Prof. MUDr. Vladimír Bláha CSc.  
Titul konzultant: Prof. MUDr. Zdeněk Zadák, CSc.

Hradec Králové, 2014

Obhajoba dne: .....

**Prohlášení:**

Prohláuji 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 odbornou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

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

**Hradec Králové, ..... 2014**

---

## Obsah

1. Poufíté zkratky	str. 4
2. Úvod do problematiky	str. 6
2.1 Cholesterol	str. 8
2.2 Triacylglyceroly a mastné kyseliny	str. 16
2.3 Necholesterolové steroly	str. 19
2.4 Lipidy a jejich metabolismus u kriticky nemocného	str. 23
3. Cíle diserta ní práce	str. 27
4. Soubor nemocných, statistická analýza	str. 28
4.1 Charakteristiky výzkumného projektu	str. 28
4.2 Analytická ást	str. 32
4.4 Statistické zpracování dat	str. 38
5. Vlastní výsledky	str. 40
6. Diskuse	str. 49
7. Záv ry	str. 60
8. Poufítá literatura	str. 63
9. P ílohy	str. 78

## 1. Používané zkratky

ABC	ATP-binding cassette
ACAT	cholesterolacyltransferáza
ACC	acetyl-CoA-karboxyláza
ADP	adenosindifosfát
AMPK	aktivovaná proteinová kináza
AP1	aktivní protein 1
ATP	adenosintrifosfát
BMI	body mass index
CAM	kampesterol
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	Crohnova choroba
CDAI	Crohn's disease activity index
CETP	cholesterol ester transport protein
CRP	C reaktivní protein
CoA	koenzym A
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
DMPP	diamethylalyl pyrofosfát
eNOS	endoteliální NO-syntáza
FPP	farnesyl pyrofosfát
FXR	farnesoid X receptor
GIT	gastrointestinální trakt
GPP	geranyl pyrofosfát
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HDL-CH	HDL-cholesterol
HMG- CoA	hydroxymethylglutaryl-koenzym A
HSL	hormon-senzitivní lipáza
ChREBP	carbohydrate-responsive element-binding proteinem
IDL	lipoproteiny o střední hustotě
IL-6	interleukin 6
IPP	isopentenyl pyrofosfát
LBP	lipopolysacharid binding protein
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě

LDL-CH	LDL- cholesterol
LPC	lyzofosfatidylcholin
LPL	lipoproteinová lipáza
LPS	lipopolysacharid
LTH	latosterol
LXR	liver X receptor
MK	mastné kyseliny
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF- B	nukleární faktor B
NPC1L1	Niemann-Pick C1 like 1 protein
PAF-AH	desti ky-aktivující faktor acetyl-hydroláza
PAP1	fosfatidát fosfatáza typ 1
PGC-1	peroxisome proliferator-activated receptor coactivator -1
PLTP	fosfolipid-transfer protein
PON1	paraaxonáza
S1P	sfingosin-1-fosfát
SCAP	cleavage-activating protein
SIRS	systemová zán tlivá reakce
SIT	sitosterol
SQ	skvalen
SR-BI	scavenger receptor class B typ I
SREBP	sterol regulated element binding protein
t-CH	celkový cholesterol
TAG	triacylglycerol
TNF-	tumor necrosis factor alfa
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustot

## 2. Úvod do problematiky

Tuky představují základní metabolický substrát lidského organismu. Jedná se o skupinu heterogenních látek, jejichž základní vlastností je nerozpustnost ve vodě. Tuková tkáň, která je hlavní zásobárnou lipidů, představuje nejvýznamnější zdroj energetických zásob a je důležitou strukturou tepelné, elektrické a mechanické izolace organismu. Jako tak zvanou šekretní funkci tukové tkáně označujeme procesy regulace a uvolňování látek z tohoto depotu, jako jsou mastné kyseliny, cytokiny (tumor necrosis factor TNF- $\alpha$ , interleukinu IL-6) nebo leptin, adiponectin, rezistin, adiponektin, a visfatin [1,2]. Součástí nelze opomenout také ochranný faktor tukové tkáně, která působí jako hlavní místo depozice tuku v lidském organismu. V případě, kdyby se tukové částice ukládaly jinde, docházelo by k závažným negativním změnám ve funkcích jednotlivých tkání a orgánů. Proto má tuková tkáň v lidském těle nezastupitelnou úlohu.

Metabolismus lipidů v sobě skrývá nepřeberné množství biochemických reakcí a souvisejících patofyziologických procesů. V naší oblasti, zabývající se studiem biochemických drah lipidů v biologických systémech, se nazývá lipidomika. Jedná se o nový obor, jehož název je odvozen od pojmu lipidom, který označuje soubor všech lipidů v buňkách, tkáních i celém organismu v určitém definovaném okamžiku. Studuje strukturu a funkci látek tukové povahy ať na molekulární úrovni i v etně dynamiky jejich změny. Následně je interpoluje do klinické praxe. Jejím vznik je tedy logickým vyústěním významného pokroku klinického výzkumu v oblasti lipidového metabolismu. Součástí je to také výsledkem kontinuální snahy o využití výsledků odborných pozorování k pozitivnímu ovlivnění vzniku i průběhu rozmanitých onemocnění a patologických stavů.

Oblast aterosklerózy, kardiovaskulárních chorob, obezity i diabetu jsou pouze jedním z mála příkladů, kde snaha o maximální optimalizaci plasmatických koncentrací lipidů představuje neodmítlou součástí léčby, včetně primární i sekundární prevence. Klinické studie opakovaně prokázaly nepříznivý vliv hyperlipidémie na orgánové funkce, které pak v mnoha případech rezultují do závažných ať fatálních komplikací. V duchu medicíny založené na důkazech je následné snižování plasmatických hladin lipidů nezbytným opatřením s cílem snížit další morbiditu i mortalitu těchto pacientů.

Hypolipidémii je z hlediska klinické praxe v naší době pozornost daleko méně. Je vnímána nejčastěji jako typický příznak poruchy syntetických funkcí jater, onemocnění žlázy s vnitřní sekrecí, malnutrice nebo některých geneticky podmíněných metabolických chorob.

Přítomnost snížené plasmatické hladiny lipidů byly v posledních dekádách opakovaně popsány u nemocných v závažném stavu. Tento fenomén doprovází nejenom kritické stavy, vyžadující pobyt na pracovišti intenzivní péče, ale také akutní vzplanutí chronických chorob a navíc úzce souvisí s jejich prognózou. Zejména cholesterol představuje důležitý reaktant akutní fáze. Ve světle jeho významu pro (nejen) syntézu steroidních hormonů, které jsou pro přežití lidského organismu v závažné situaci zcela zásadní, je jeho role neustále studována. Alterace jeho metabolismu se totiž jeví jako jeden z významných faktorů, vstupujících do patogeneze kritických onemocnění a cholesterol se během nich stává potenciálně esenciálním substrátem. K bližšímu pochopení těchto souvislostí je však nutno prozkoumat a co nejdříve prostudovat celý složitý labyrint metabolických drah lipidového metabolismu.

#### Jednoduché lipidy

- a) tuky (estery mastných kyselin s glycerolem)
- b) vosky (estery mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy)

#### Složené lipidy

- a) fosfolipidy (obsahují navíc zbytek kyseliny fosforečné)
- b) glykolipidy (obsahují navíc sacharidovou složku)
- c) ostatní - sulfolipidy, aminolipidy

#### Prekurzory a odvozené lipidy

mastné kyseliny, glycerol, steroidy, alkoholy, vitamíny, hormony

Tabulka 1. základní rozdělení tuků.

## 2.1 Cholesterol

Cholesterol je amfipatický lipid (molekula je částečně hydrofilní a částečně hydrofobní), který má nezastupitelné místo v základní struktuře buněčných membrán a vnější vrstvy plasmatických lipoproteinů. Součástí je prekurzorem syntézy steroidních hormonů, vitamínu D a fluorových kyselin.

Cholesterol se v lidském organismu nachází ve formě volné nebo vázané jako ester. Volný cholesterol je především součástí buněčných membrán, estery tvoří hlavní zásoby cholesterolu ve tkáních, tedy v intracelulárním prostředí. V plazmě nacházíme obě formy: volný (asi 10%) a vázaný na mastné kyseliny. Jak již bylo uvedeno v úvodu, z důvodu nerozpustnosti lipidů ve vodném prostředí je jejich transport, včetně cholesterolu uskutečňován prostřednictvím lipoproteinů. Nepolární částice (triacylglyceroly a estery cholesterolu) se vážou na polární (fosfolipidy a cholesterol) a proteiny za vzniku struktur mísitelných s vodou. V současné době se rozlišuje šest hlavních skupin lipoproteinů: chylomikrony, chylomikronové remnanty, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), nízké hustotě (LDL), střední hustotě (IDL) a vysoké hustotě (HDL). V každém lipoproteinu se vyskytuje minimálně jeden apoprotein (protein nebo polypeptid). Ty působí zejména jako kofaktory enzymů, ligandy pro interakce s lipoproteinovými receptory a mohou fungovat jako transportní struktury. Lipoproteiny jsou také důležitými transportéry jiných látek nerozpustných ve vodě, jako jsou některé vitamíny nebo léky.

Cholesterol z potravy je vázán v chylomikronech, které reagují s lipoproteinovou lipázou (LPL) s následným uvolněním asi 90% triacylglycerolů (TAG) a apoproteinu ApoC. Reakce probíhá za přítomnosti fosfolipidů a apoproteinu C-II. Zbytkové chylomikrony jsou menší, po ztrátě triacylglycerolů procentuálně bohatší na cholesterol i jeho estery a jsou nakonec zachycovány játry prostřednictvím receptoru Apo-E. Cholesterol, který játra nevyužijí a/nebo syntetizují je transportován především v LDL. Játra také syntetizují VLDL, které se konvertují působením LPL na LDL lipoproteiny. LDL tak představují hlavní zdroj cholesterolu pro cílové tkáně. Některé buňky dokážou získávat cholesterol také z HDL s využitím specifického receptoru: scavenger receptor class B type I (SR-BI) [3]. Transport cholesterolu z extrahepatálních tkání do jater se nazývá reverzním transportem a je představován tvorbou tzv. pre-β-HDL lipoproteinů z cholesterolu, fosfolipidů a apoproteinů prostřednictvím difuze, aktivitou receptoru SR-BI a/nebo ATP-binding cassette transportérem A1 (ABC A1) [4]. Maturace pre-β-HDL na sférický HDL probíhá esterifikací cholesterolu lecitin cholesterol acyl transferázou (LCAT). Během transportu může být cholesterol přenesen do jiných



lipoprotein prost ednictvím cholesterol ester transport proteinu (CETP). Finální degradace HDL pak probíhá zejména v játrech a ledvinách.

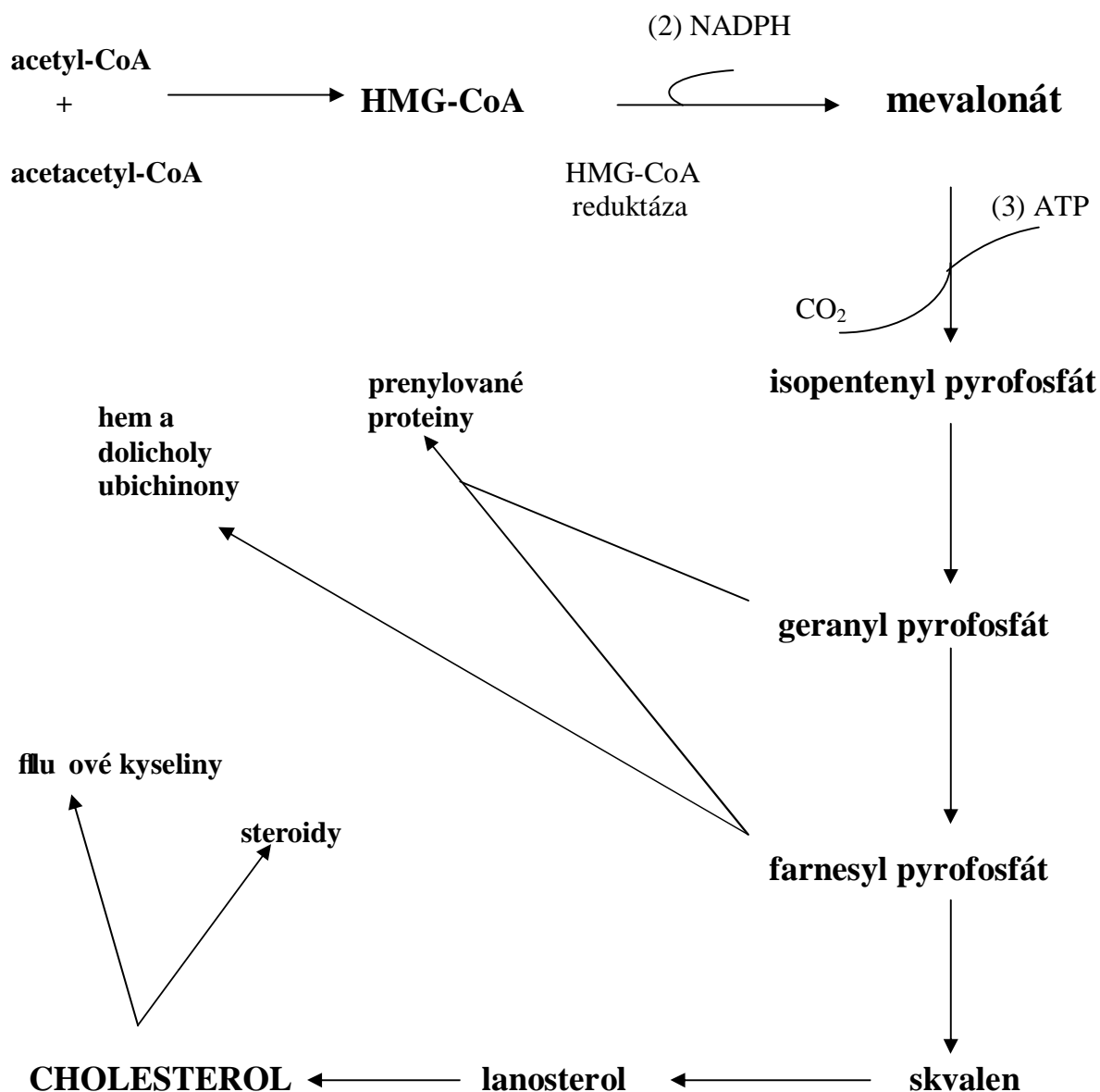
Cholesterol získává lidský organismus jednak absorpcí z potravy, jednak jeho syntézou *de novo*. Eliminace cholesterolu je prezentována jeho exkrecí ve formě finálních produktů: kyseliny a malého množství neutrálních steroidů. Absorpce probíhá v tenkém střevě a její efektivita závisí především na jeho obsahu v přijímané potravě. Z ní se cholesterol uvolňuje ve formě volné i vázané, která se ale záhy hydrolyzuje. Následně se mísí s ostatními lipidy potravy, kyselinou cholesterolovou a tím, které syntetizovalo střevní. Proces vstupování končí esterifikací a vstupem do chylomikronů. Absorpce cholesterolu je komplexní, složitý proces, který probíhá díky specifickým proteinům v kardiálním lemu enterocytů [5] a je z populačního hlediska doprovázen značným polymorfismem [6]. Jedním z hlavních regulačních elementů je Niemann-Pick C1 like 1 protein (NPC1L1) [7,8], který je mimo jiné cílovou strukturou působení hypolipidemika ezetimibu (inhibitor cholesterolové absorpce). Regulace transkripce genu, které zasahují do regulace cholesterolové homeostázy v enterocytech, je trvale studována a princip exprese NPC1L1 zatím není zcela jasný. Signifikantní snížení exprese tohoto proteinu bylo popsáno například u myšičích flivených dietou obohacenou o cholesterol [9]. Na myšičím modelu bylo také popsáno snížení cholesterolové absorpce po podání fenofibrátu a to rovněž prostřednictvím inhibice exprese NPC1L1 [10]. Fenofibrát působí jako agonista peroxisome proliferator-activated receptoru (PPAR $\alpha$ ). Jaderné receptory PPAR regulují transkripci genu po aktivaci hlavních lipofilních ligandů. PPAR $\alpha$  aktivuje  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v játrech i svalu a zvyšuje expresi apoproteinů; PPAR $\alpha$  stimuluje lipogenezi, zrání adipocytů a zvyšuje aktivitu lipoproteinové lipázy (LPL) a PPAR $\alpha$  zejména reguluje ostatní PPARs [11]. S aktivitou PPARs je spojena iinnost dalších proteinů, jako například skupiny ATP-binding cassette (ABC) zejména formy G5 a G8, membránové molekuly SR-BI, CD-36 a/nebo aminopeptidáza N [12-15]. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že dominantní postavení NPC1L1 je modulováno jak samotným cholesterolovým metabolismem, tak regulačními úinky dalších faktorů [16].

Druhým zdrojem cholesterolu je syntéza *de novo*. Probíhá prakticky ve všech tkáních a akcelerovaná ve tkáních, které nejsou fyziologicky schopny přijímat LDL lipoproteiny. Nejvýznamnějšími syntetizátory jsou játra (asi 10%) a buňky střeva (asi 15%). Biosyntéza cholesterolu je proces velmi složitý a energeticky náročný. Probíhá mimo mitochondrie, čímž se odlišuje od syntézy ketolátků, která je v pozdější fázi syntézy cholesterolu velmi podobná.

Celá syntéza může být zjednodušen rozdělena do pěti kroků (obrázek 1):

1. vznik 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A (HMG-CoA)
2. konverze na mevalonát
3. konverze na izoprenové molekuly (isopentenyl pyrofosfát)
4. vznik skvalenu
5. konverze na cholesterol

Prekurzorem cholesterolové syntézy je hydroxymethylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA), který se formuje kondenzací acetyl-CoA a acetacetyl-CoA. Reakce je katalyzována HMG-CoA syntázou. Následně působením HMG-CoA reduktázy vzniká mevalonát. Jako kofaktor v této fázi slouží nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (NADPH). Oddělený karboxyl z HMG se váže na CoA thiol a je redukován na aldehyd a následně alkohol. Mevalonát je následně trojstupňově fosforylován za vzniku 5-pyrofosfomevalonátu a ten je za trvalé přítomnosti ATP dekarboxylován na isopentenyl pyrofosfát (IPP). Ten představuje první látku ze skupiny meziproduct, které nazýváme isopreny. IPP je v rovnováze se svým izomerem, dimethylallyl pyrofosfátem (DMPP). Tato přeměna je katalyzována IPP isomerázou. Jedna molekule IPP a jedna molekula DMPP pak generují vznik geranyl pyrofosfátu (GPP). GPP dále kondensuje s další molekulou IPP na farnesyl pyrofosfát (FPP). Nakonec za přítomnosti NADPH skvalen syntáza katalyzuje kondenzační reakci dvou molekul FPP za vzniku skvalenu. Skvalen podstupuje cyklizaci přes 2,3-oxidoskvalen na sterol lanosterol. Reakce vyžaduje přítomnost enzymů skvalin epoxidázy a skvalen oxidocyklázy, redukčního NADPH a oxidace  $O_2$  do molekulárního kyslíku. Konverze lanosterolu na cholesterol zahrnuje 9 reakcí, katalyzovaných enzymy membrány endoplasmatického retikula. Mnohé z nich jsou katalyzovány prostřednictvím systému cytochromu  $P_{450}$ .



Obrázek 1. Syntéza cholesterolu

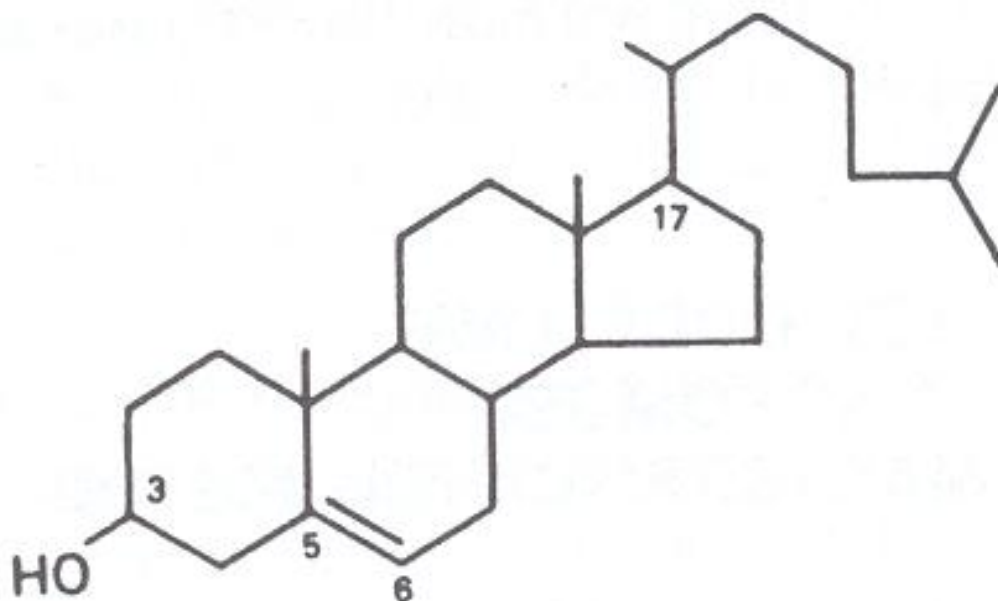
Primárním zdrojem cholesterolu je acetyl- koenzym A (acetyl-CoA), který se transportuje z mitochondrií do cytosolu. Molekuly acetyl-CoA se kondenzují za vzniku hydroxymethylglutaryl-koenzymu A (HMG-CoA), který se postupně mění na mevalonát. Mevalonát je fosforylován za vzniku několika fosforylovaných meziproductů a po dekarboxylaci vzniká aktivní jednotka isoprenu isopentenylpyrofosfát. 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. Obrázek rovněž zahrnuje přidružené metabolické dráhy z meziproductů syntézy cholesterolu.

V procesu cholesterolové syntézy vznikají další produkty, tak zvané ne-steroidní isoprenoidy (obrázek 1). Následující pohled je charakterizuje a souasně prezentuje možná propojivou propojenost metabolismu lipidů se zcela odlišnými metabolickými drahami a systémy:

1. Prenylované proteiny jsou vyuffívány na kterými signálními proteiny k ukotvení na buných membránách. Prenylace umožní například zakotvení glutamyl-transpeptidáz do membrány osteoklastů a tím zajišťuje normální funkci těchto kostních buněk. Naopak nedostatek prenylovaných proteinů způsobuje jejich zrychlenou apoptózu. Tímto mechanismem tedy lze dosáhnout snížení osteoresorpce (úinek léku bifosfonátů) a deklaruje se tak propojení s kostním metabolismem.
2. Dolichol (dolichol pyrofosfát) má významnou roli v syntéze oligosacharidových a glykoproteinů. V současné době je také intenzivně studován jeho vliv na problematiku stárnutí a involučních změn v oblasti nervového systému [17].
3. Ubichinon (koenzym Q10) obsahuje isoprenoidní postranní řetězec. Je součástí mitochondriálních lipidů a má nezastupitelné místo v respiračním řetězci. Díky své schopnosti přenášet elektrony působí jako antioxidant.
4. Součástí respiračního řetězce je rovněž Hem a, který obsahuje farnesylový postranní řetězec.

Normální zdravý jedinec syntetizuje průměrně 1g cholesterolu denně. Relativně stabilní plasmatická koncentrace cholesterolu v lidském těle (cca 3–5 mmol/l) je udržována několika regulačními mechanismy. Asi nejznámějším je rychlá regulace aktivity HMG-CoA reduktázy procesem fosforylace (inhibice) a defosforylace (aktivace) prostřednictvím enzymu AMP-aktivované proteinové kinázy (AMPK). Aktivita kinázy je ovlivňována signálním systémem cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Zvýšená koncentrace cAMP v buňkách vede k aktivaci inhibičního procesu (cAMP-dependentní proteinová kináza, fosfoprotein fosfatáza inhibitor 1, HMG-CoA reduktáza fosfatáza) s výsledným snížením aktivní defosforylované formy HMG-CoA reduktázy. Pokles cAMP má úinky opačné. Vzhledem k tomu, že aktivita cAMP je hormonálně ovlivnitelná, do regulace cholesterolové syntézy vstupují prostředkován také hormony, zejména inzulin (aktivace syntézy), glukagon a adrenalin (inhibice). Druhým regulačním procesem je proteolytická regulace HMG-CoA reduktázy, prostředkovaná nitrobuňkovou doménou v endoplasmatickém retikulu sterol-sensing domain. V případě intracelulárního nárůstu koncentrace sterolů dochází paralelně k tvé degradaci HMG-CoA reduktázy a naopak.

Intracelulární obsah sterol je základem také této, tak zvané transkripční regulace. Zásadní postavení v tomto procesu má sterol regulated element binding protein (SREBP), lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu [18]. Jsou známy dva geny pro SREBP : SREBP-1 a SREBP-2. První jmenovaný protein kóduje dva proteiny: SREBP-1a a SREBP-1c/ADD1 (adipocyte differentiation-1). SREBP-1a reguluje všechny geny závislé na SREBP. SREBP-1c/ADD-1 reguluje expresi genů, zapojených do biosyntézy mastných kyselin. SREBP-2 reguluje expresi genu LDL receptoru a kontroluje expresi genu cholesterolového metabolismu, včetně participujících enzymů. Odhaduje se, že metabolismus sterolů ovlivňuje více jak 30 genů. Při nedostatku sterolů migruje SREBP navázaný na SREBP cleavage-activating protein (SCAP) přes C-terminální doménu do Golgiho aparátu. Tam se SREBP postupně uvolní s uvolněním N-terminální domény a následnou indukcí cholesterolové syntézy [19]. Kromě výše uvedeného je rovnováha cholesterolu na úrovni tkání ovlivňována dalšími faktory, které zvyšují a/nebo snižují jeho koncentraci. Ke zvýšení dochází působením lipoproteinů obsahujících cholesterol cestou LDL receptor (receptory ApoB-100,E) nebo reverzní drahou, která receptory není zprostředkována. Dále působením cholesterolu z lipoproteinů do buněčné membrány, samotnou jeho syntézou a hydrolýzou cholesterolových esterů působením hydrolázy esterů cholesterolu. Ke snížení dochází výdejem cholesterolu z buněčných membrán do lipoproteinů, esterifikací cholesterolu působením acyl-CoA cholesterolacyltransferázy (ACAT) a využitím cholesterolu k syntéze dalších steroidů.



Obrázek 2. molekula cholesterolu

Za den je z těla odstraněn asi 1g cholesterolu. Kromě neutrálních steroidů jsou nejvýznamnější finálním produktem žlučové kyseliny, které jsou syntetizovány v játrech a vyloučeny ve stolici. Primární žlučové kyseliny cholová a chenodeoxycholová se ve střevě vlivem bakterií mění na sekundární: litholovou a deoxycholovou. Všechny žlučové kyseliny se v terminálním ileu vstřebávají, vracejí do jater a ukončují tímto tzv. enterohepatální oběh. V játrech jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem a opět secernovány do žluče.

Žlučové kyseliny mají nezastupitelné místo v procesu trávení díky své schopnosti emulzifikovat tuk ve střevě a usnadnit jeho vstřebávání v tenké střevo. Obsah žlučových kyselin a fosfolipidů ve žluči zabraňuje precipitaci cholesterolu a tvorbě litiasy. Z hlediska regulace dokážou zpětně regulovat expresi genů, které zasahují do jejich metabolismu. Významnou roli v této regulaci hrají zejména farnesoid X receptory (FXR) ze skupiny nukleárních receptorů [20]. FXR mají bezprostřední vztah k expresi genu pro cholesterol-7-hydroxylasu, která hraje zásadní roli v syntéze žlučových kyselin. Jako alternativní pak nazýváme syntézu, která je modifikována enzymem cholesterol-27-hydroxyláza. Regulace jejich vliv je však daleko více [21], nicméně tato problematika není hlavní náplní tohoto sdělení.

Oba procesy získávání cholesterolu se dají blíže kvantifikovat následně uvedenými laboratorními metodami

1) výpočet rozdílu mezi přijatým a vyloučeným cholesterolem [22]

Měření rychlosti syntézy cholesterolu vyjádřením rozdílu mezi příjmem cholesterolu a exkrecí sterolů ve stolici. Nevýhodou je potřeba dlouhodobě vyrovnaného metabolického stavu, zejména v zásobách a velká časová náročnost. Metoda není vhodná u nestabilních, kriticky nemocných pacientů.

2) inkorporace značených látek do sterolu

Jednou z možností je stanovení *ex vivo* aktivity  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA reductázy po inkorporaci  $^{13}\text{C}$  nebo  $^{14}\text{C}$  značeného acetátu do sterolů nebo jejich lipofilních prekurzorů. Jinou metodou je aplikace  $^{13}\text{C}$  nebo  $^{14}\text{C}$  značeného cholesterolu a sledování jeho pohybu v lipoproteinech a tkáních. Získávají se tak detailní informace o velikosti zásob, distribuci i rychlosti syntézy cholesterolu. Mezi moderní metody založené na inkorporaci značených látek do sledovaného substrátu jsou MIDA (mass isotopomer distribution analysis) a techniky využívané inkorporaci deuteria [23]. První technika je založena na zanesení  $^{13}\text{C}$  značeného acetátu do nově vznikajícího cholesterolu, druhá sleduje aktivitu cholesterolové syntézy prostřednictvím rychlosti inkorporace deuteria do volného cholesterolu erytrocytárních

membrán. Nevýhodou obou metod je potřeba homogenního stabilního zdroje prekursorů v případě konstantního systému syntézy a vysoká cena pro vysoké spotřební množství kovacích látek.

3) stanovení hladiny prekursorů cholesterolové syntézy

a) stanovení kyseliny mevalonové v séru a ve 24-hodinovém sběru moči [24]

b) stanovení isoprenu ve vydechovaném vzduchu [25]

c) stanovení koncentrací prekursorů syntézy cholesterolu v krevním séru [26]

Plasmatické koncentrace prekursorů cholesterolové syntézy poměrně přesně odpovídají relativní rychlosti syntézy cholesterolu, a to i během krátkých časových období [27]. Bohužel některé z vyšetřovaných substrátů vykazují cirkadiální kolísání, což se stává pro hodnocení výsledků nevýhodným [28].

Ke stanovení cholesterolové absorpce lze v současné době použít dvě metody. První metodou je finančně náročné použití značkovacích látek, která navázáním na konkrétní metabolit umožní sledování absorpce látky v lidském těle [29,30]. Druhým způsobem je stanovení plasmatických hladin fytoosterolů (rostlinné steroly), jejichž koncentrace v plasmu odráží stupeň absorpce z potravy [26,31].

## 2.2 Triacylglyceroly a mastné kyseliny

Triacylglyceroly (TAG) patří do skupiny acylglycerolů a představují hlavní lipidy potravy a tukových zásob. Jsou to estery alkoholu glycerolu a mastných kyselin (MK).

Tuky přijaté v potravě jsou ve střevě emulzifikovány fluorovými kyselinami, a poté peny pankreatickou lipázou a fosfolipázou A2 na směs volných MK a mono- a di-acylglycerolů. Po vstřebání do enterocytů dochází zpět k re-esterifikaci na TAG, které jsou transportovány do chylomikronů. Triacylglyceroly, které jsou syntetizované v játrech, se dostávají do oběhu ve VLDL. Z lipoproteinů se TAG uvolní prostřednictvím působení lipoproteinové lipázy (LPL). Volné mastné kyseliny jsou absorbovány do tkání a glycerol se vrací do jater a ledvin k finálnímu zpracování na dihydroxyaceton fosfát (DHAP).

Mastné kyseliny získává lidský organismus z potravy a dále syntézou. Syntéza probíhá v mnoha tkáních včetně jater, střeva, ledvin, mozku nebo plic. Je lokalizována do cytosolu a všechny potřebné uhlíky pocházejí z acetyl-CoA. Současně je nutná dostatečná koncentrace redukovaného NADPH, který je generován do cytosolu z pentosafosfátové metabolické dráhy a z pyruvátu na pyruvát. Zdrojem acetyl-CoA je především glykolýzou vznikající pyruvát, který je karboxylován na oxalacetát a následně konvertován na citrát. ATP-citrát lyáza pak v cytosolu přeměňuje citrát na acetyl-CoA. Druhým zdrojem acetyl-CoA může být oxidace mastných kyselin, která generuje tento metabolit v mitochondriích. Ten se pak může v cytosolu přeměnit na citrát opět na acetyl-CoA.

Proces syntézy MK začíná karboxylací acetyl-CoA na malonyl-CoA za účasti adenosintrifosfátu (ATP) a acetyl-CoA-karboxylázy (ACC), která vyžaduje vitamín biotin. ACC představuje klíčové místo regulace syntézy MK. Má charakter vláknitého polymeru. Každý jeho protomer obsahuje protein přenášeč karboxybiotinu (biotin carboxyl carrier protein), karboxylázu, transkarboxylační doménu a alosterické regulační místo. Základem regulace je rovnováha mezi monomerní inaktivní formou ACC a polymerickou aktivní formou. Přítomnost finálního produktu syntézy: palmitoyl-CoA vychyluje rovnováhu k inaktivní formě. Citrát, prekurzor acetyl-CoA slouží jako primární. Syntéza MK z acetyl-CoA a malonyl-CoA se uskutečňuje prostřednictvím syntházy mastných kyselin (fatty acid synthase či FAS). Je to multienzymový komplex skládající se ze dvou polypeptidových jednotek. Tyto podjednotky obsahují domény pro jednotlivé enzymy, které se podílejí na syntéze (syntázy, reduktázy, hydrogenázy a transferázy). Reakce vyžadují přítomnost NADPH. Primárním produktem FAS je palmitát, který je z enzymu uvolněn a podstupuje následné elongační a/nebo desaturační reakce.



Biodegradace mastných kyselin se uskutečňuje především (nikoliv pouze) procesem tzv.  $\beta$ -oxidace v mitochondriích. MK jsou nejprve aktivovány acyl-CoA ligázou (též zvaná syntetáza nebo thiokináza). Transport do mitochondrií je uskutečňován pomocí vazby na karnitin, a to enzymem karnitin palmitoyltransferáza I. Uvolnění se pak děje uvnitř mitochondrie karnitin palmitoyltransferázou II. Název  $\beta$ -oxidace je odvozen od následných reakcí, při kterých je odštěpen z MK dvouuhlíkatý zbytek, tedy na  $\beta$  pozici. Tyto jednotky vytvářejí molekuly acetyl-CoA, které mohou vstupovat do citrátového cyklu za vzniku ATP. Získání energie z MK je hlavním cílem celého procesu.

Mastné kyseliny jsou ukládány do zásob jako triacylglyceroly ve všech buňkách, primárně ale v tukové tkáni. Hlavním zdrojem syntézy TAG je glycerol. V tukové tkáni je ale nedostatek potřebného enzymu glycerol kinázy, proto je hlavním prekurzorem dihydroxyaceton fosfát (DHAP), uvolňovaný z glykolýzy. Biosyntéza TAG začíná aktivací glycerolu prostřednictvím glycerol kinázy a ATP na glycerol-3-fosfát. Na ten se váží dvě molekuly acyl-CoA a vzniká fosfatidát. Ten je prostřednictvím fosfatidátfosfatázy přeměněn na 1,2-diacylglycerol. Poslední acyl-CoA je esterifikován diacylglycerolem na závěr a vzniká triacylglycerol. Je-li základním prekurzorem syntézy DHAP, pak je nutná jeho přeměna na glycerol-3-fosfát dehydrogenázou za přítomnosti NADH na glycerol-3-fosfát.

Klíčové postavení v regulaci syntézy MK má enzym acetyl-CoA-karboxyláza (ACC), který se nachází ve dvou isoformách: ACC1 a ACC2 [32]. Obě formy jsou alostericky aktivovány citrátem a inhibovány palmitoyl-CoA, jak bylo uvedeno dříve.

Další možností regulace je fosforylace (inhibice) a defosforylace (aktivace) ACC prostřednictvím aktivity enzymu proteinové kinázy A (PKA), AMK aktivované proteinové kinázy (AMPK) a proteinové fosfatázy. Role jednotlivých enzymů je nadále intenzivně sledována a zatím není stále jednoznačně postulována [33,34].

Transkripční regulace je zprostředkovávána carbohydrate-responsive element-binding proteinem (ChREBP), který synergicky se SREBP (viz regulace metabolismu cholesterolu) ovlivňuje syntézu mastných kyselin prostřednictvím indukce transkripce genů pro lipogenezi [35,36]. Podléhají regulaci i prostřednictvím liver X receptoru (LXR), který patří do skupiny nukleárních receptorů [37].

Z dalších regulačních mechanismů je možno uvést vliv hormon-senzitivní lipázy (HSL), která řídí uvolnění MK z tukové tkáně do krevního oběhu [38], nutriční stav a hormonální vlivy zejména inzulínu a glukagonu. Pro syntézu TAG se podle nejnovějších poznatků jeví jako velmi významný také enzym PAP1 (fosfatidát fosfatáza 1), respektive jeho kódovací protein Lipin-1 [39]. Tento protein má nejen význam pro regulaci syntézy, ale také pro zránění

adipocyt , koordinaci ukládání a utilizace MK i glukózy v periferních tkáních a slouží jako transkripční koaktivátor [40]. Zdá se, že Lipin-1 je schopen ovlivňovat aktivitu PPAR receptoru , a také koaktivátoru druhého ze jmenovaných (PGC-1 ) [41].

Mastné kyseliny jsou z biomedicínského hlediska především významným energetickým substrátem. Sledování změny v kompozici MK však pomáhá pochopit a pozitivně ovlivnit průběh rozmanitých onemocnění [42,43]. Studium metabolismu MK se také soustředí dokonce na rané perinatální období [44] a potenciální vlivy MK na genovou expresi [45,46]. Problematika mastných kyselin však není ústřední náplní této práce.

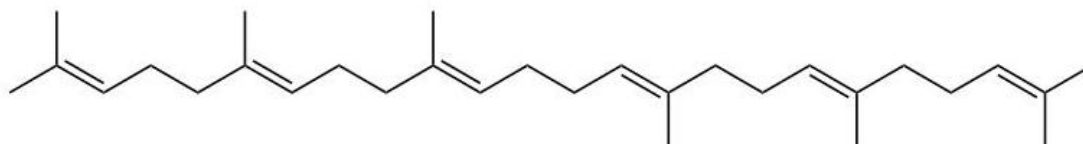
Z pohledu stresového metabolismu je také významná tvorba ketolátek (acetacetát, -hydroxybutyrát, aceton) z mastných kyselin v játrech. Probíhá v mitochondriích a na začátku se podobá syntéze cholesterolu. HMG-CoA je ale konvertován na acetacetát působením HMG-CoA lyázy s následnou spontánní dekarboxylací na aceton, nebo přímo -hydroxybutyrát dehydrogenázou na -hydroxybutyrát. Z biomedicínského pohledu ketolátky představují významný, alternativní, ve vodě rozpustný zdroj energie pro extrahepatické tkáně .

## 2.3 Necholesterolové steroly

Historie cholesterolu sahá do roku 1760, kdy ho Francois Poullétier de la Salle objevil ve fluvních kamenech. Od té doby byly izolovány stovky dalších steroidních látek v etnosterol, které jsou biochemicky charakterizované přítomností hydroxylové skupiny na 3. uhlíku steroidního jádra. Do této skupiny tedy patří prekurzory cholesterolové syntézy a rostlinné steroly (tzv. fytosteroly). Společně je nazýváme necholesterolovými steroly [47,48].

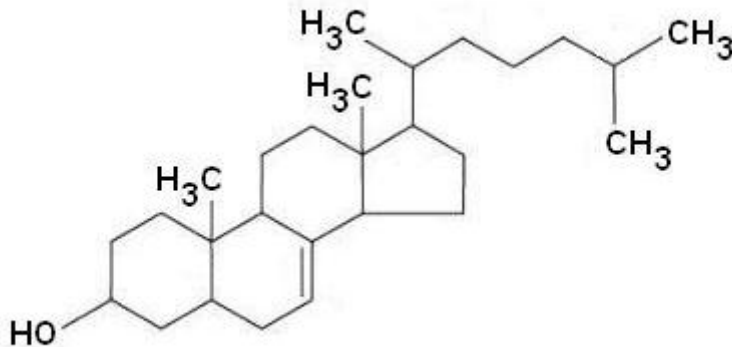
Prekurzory cholesterolu lze využít k bližší charakteristice cholesterolové syntézy, například stanovením hladin mevalonátu, methylsterol, skvalenu i lanosterolu, jak bylo uvedeno v kapitole cholesterol. Jejich regulace je zejména multifaktoriální a podléhá vlastním, specifickým regulačním mechanismům. Tento předpoklad je založen na zjištění, že nejvýznamnější transkripční regulátor SREBP je schopen ovlivňovat jen jeden z devíti stupňů lanosterolu na cholesterol [49,50].

Asi nejznámějším prekurzorem cholesterolové syntézy je skvalen, který byl objeven jako hlavní složka jaterního tuku pacifických řalok. Tento metabolit nemá steroidní jádro, a proto jeho zařazení do uvedené skupiny může být právem zpochybněno. Nicméně jeho uvedení je zřejmě naopak, že stanovování plasmatických koncentrací skvalenu bylo součástí našeho výzkumu. Skvalen je polynenasycený 30-ti uhlíkatý uhlovodík, který je v lidském organismu významnou složkou koflního a ušního mazu, kde má významnou antioxidační úlohu. Dále se vyskytuje v lipoproteinech krevní plazmy: asi polovina ve VLDL, 25% v LDL a 25% v HDL [51,52]. Koncentrace skvalenu v plazmě vykazuje cirkadiální kolísání s maximální koncentrací kolem této hodiny ranní a drobným poledním píkem [28]. Skvalen je obsažen v produktech rostlinného původu a jeho výskyt v olivovém oleji se dává do pozitivní souvislosti s nižším výskytem nádorových a kardiovaskulárních chorob [53,55].



Obrázek 3. Molekula skvalenu

Latosterol (5 $\alpha$ -3 $\beta$ -cholest-7-en-3-ol) je v současné době nejastji užívaným markerem cholesterolové syntézy, stejně jako poměr latosterol/cholesterol. Má relativně vysokou koncentraci v plazmě a nejvýznamnější koreluje s aktivitou klíčového regulačního enzymu: HMG-CoA reductázy [56].

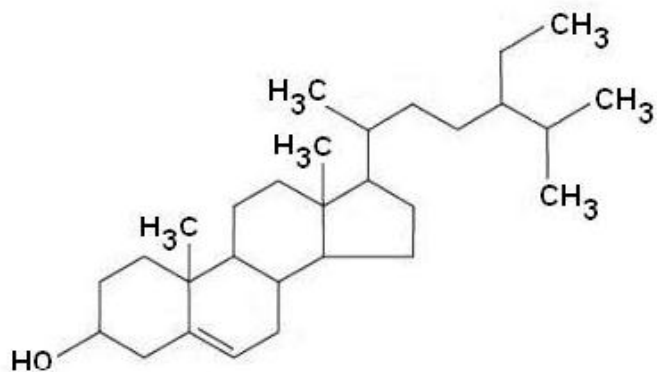


Obrázek 4. Molekula latosterolu

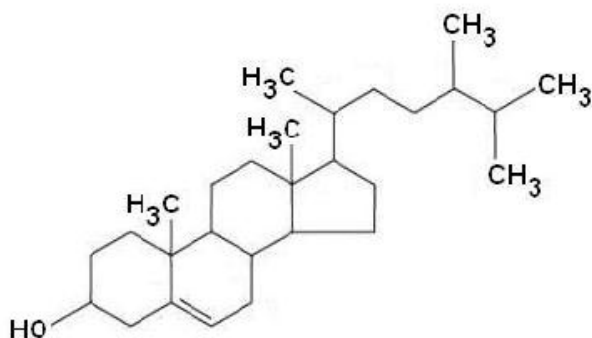
Z dalších významných sterolů je možno zmínit například sterol 7-dehydrocholesterol, který lze rovněž použít jako ukazatel cholesterolové syntézy [57]. V plazmě se však objevuje v submikromolárních koncentracích. V gonádách se koncentrují steroly 4,4-dimetyl-5 $\alpha$ -cholest-8,14,24-trien-3-ol a 4,4-dimetyl-5 $\alpha$ -cholest-8,24-dien-3-ol, které ovlivňují zrání oocytů a spermií [58]. Ve spermiích, mateřském mléku a mozkové tkáni byl detekován ve vyšších hladinách sterol desmosterol [59]. U sterolu 5 $\alpha$ -cholestanolu se zdá souvislost s absorpcí fytosterolů [60]. Jejich zvýšená hladina v buněčných membránách (cerebrotendinitis xantomatosa, sitosterolemie) vede totiž k poruše membranární fluidity s negativním dopadem na iontové kanály [61].

Fytosteroly představují skupinu více jak 250 steroidních alkoholů, pocházejících zejména z rostlinných tkání [62]. Jsou totiž základními stavebními jednotkami rostlinných buněčných membrán [63]. Pankreatické enzymy nejsou schopny *in vitro* tyto látky štěpit, a proto je jejich bioaktivita a význam pro klinické využití trvale zkoumána [64]. Dělí se na dvě základní skupiny: 5 $\alpha$ -steroly a 5 $\beta$ -redukované stanoly. Jejich chemická struktura je podobná cholesterolu, ale mají odlišnou strukturu postranního řetězce. Například sitosterol a

stigmasterol se li-í etylovou skupinou na uhlíku 24, kampesterol metylovou skupinou na stejném míst nebo fitné a p-eni né fytosteroly sitostanol a kampestanol jsou saturevané v 5. pozici.



Obrázek 5. Molekula -sitosterolu



Obrázek 6. Molekula kampesterolu

Obvyklý lidský denní příjem fytoosterolů se pohybuje v rozsahu 200-300mg denně. Jejich absorpce ve střevě je poměrně nízká, okolo 0,1 - 5% [65]. Nehydrolyzované estery fytoosterolů jsou hydrofobní a vytvářejí se v jádru micely vazba s cholesterolem, jsou pak špatně vstřebatelné. Navíc hydrolyzované formy vytvářejí z obvyklé vazby cholesterolu a absorbovatelné micely jsou tak o cholesterolu chudší [66]. Proto biomedicínský význam fytoosterolů spoívá zejména v jejich schopnosti snižovat absorpci cholesterolu z potravy a snižovat reabsorpci zbytkového cholesterolu prostřednictvím kompetice s cholesterolem o

vazbu v micelách [67], Snížení sérové hladiny cholesterolu je souasn uskute ováno prost ednictvím zvý-ené exprese LDL receptor ve tkáních, které je d sledkem právmír ované snížené st evní cholesterolové absorpce [68]. Tento mechanismus se od poloviny minulého století vyuffívá k p íznivému ovlivn ní hypercholesterolemie [69-71], ale s nutností sledovat metabolismus v tukách rozpustných vitamín [72]. P ísun fytosterol v dávce 2-3g/den je schopen snížit hladinu LDL-cholesterolu o 7-10% a v kombinaci s dal-ími dietními opat eními afl o 20% [73]. Jejich pozitivní vliv na snížení LDL cholesterolu p í srovnání s prostou úpravou diety [74] je navíc umocn n schopností potencovat ú inkyn statin [75]. P íznivý vliv kombinace statin , fytosterol a diety s nízkým obsahem tuk byl dokonce popsán u pacient s familiární hypercholesterolemií [76]. Nicmén význam fytosterol je studován v daleko ír-ích souvislostech a samoz ejm zejména u onemocn ní spjatých s lipidovým metabolismem [77,78], v etn detekce efektu jejich lé by [79]. Nicmén tato problematika se p estává jevit jako dominantní jen pro stavy spojené s hypercholesterolemií, ale vhodnou také pro obecnou detekci zm n v cholesterolovém metabolismu. Stanovení koncentrací fytosterol v plasm totifl umofl uje jednodu-e charakterizovat intenzitu absorpce cholesterolu v organismu [31].

V záv ru kapitoly je nutno zmínit také nefládnoucí ú inkyn fytosterol , které vznikají p í jejich zvý-eném p ísunu. Ten vzniká zejména p í zvý-ené i opakované aplikaci p ípravk um lé výffivy, postavené na p ítomnosti tukových emulzí. Tato p ípravky jsou totifl vyráb ny standardn z rostlinných olej . Vy-í koncentrace fytosterol v plasm zvy-ují fragilitu membrán ervených krvinek, p sobí nep ízniv na jaterní bu ky s indukcí syntézy atypických fllových kyselin, ímf se zvy-uje riziko cholelithiasy [80-82]. Fytosteroly jsou totifl následn vylu ovány z lidského organismu flloví. Tento transport je uskute ován procesem LXR regulované aktivity membranózních ABC transportér typu A1, G5/G8 a B4 [83].

## 2.4 Lipidy a jejich metabolismus u kriticky nemocného

Akutní onemocnění je často spojeno s mnohačetným orgánovým poškozením a tudíž s pr vodními metabolickými dysbalancemi. Mezi n patří také změny v lipidovém metabolismu, opakovaně popsané v posledních dekádách [84-93]. V případě cholesterolového metabolismu je typickým nálezem hypocholesterolemie, její závažnost přímo koreluje s prognózou pacienta [94-100], stejně jako dynamika úpravy této metabolické odchylky po odeznění vyvolávajícího inzultu [84,101].

Triacylglyceroly (TAG) se na rozdíl od cholesterolu v průběhu kritického stavu chovají nestandardně. Během stresového hladovění dochází vlivem aktivace neurohumorální osy a cytokinové bouře k neschopnosti využít MK a ketolátky k pokrytí energetických potřeb. Hlavním substrátem se stává glukóza a dominuje glukoneogeneza, zejména z glukoplastických aminokyselin. Oxidace MK je z tohoto pohledu procesem méně významným. Navíc nezanedbatelná část MK je zpětně re-esterifikována na TAG a ty se vlivem zvýšené hladiny inzulínu ukládají ve tkáních, jako jsou játra a/nebo svaly. Také ová hypoxie, zátlivé cytokiny a endotoxin přitom suprimují aktivitu LPL [102], která je nezbytná pro normální metabolismus lipidů v lipoproteinech. U pacientů v intenzivní péči je nutno také počítat s možným vlivem parenterální nutriční podpory, respektive tukových emulzí a jejich rozdílnou metabolickou tolerancí [103-105]. Výše uvedené faktory tedy způsobují, že plasmatické koncentrace TAG mohou být velmi variabilní a není překvapením, že byly detekovány koncentrace jak zvýšené [106,107], tak i snížené [91,108]. Nicméně je pravdou, že plasmatické hladiny TAG obvykle kopírují změny v koncentracích cholesterolu. Na druhé straně rozvíjející se hypertriglyceridémie a přetrvávající hypocholesterolemie představuje znepokojující ukazatel prohlubující se metabolické deteriorace, nástupu preterminálního stádia onemocnění a tudíž špatné prognózy a zvýšené mortality [86,109-111].

Hypocholesterolemie je považována za typický nález u kritických stavů a cholesterol se za těchto podmínek stává potenciálně esenciální substancí [112]. Cholesterol je navíc nezbytný pro syntézu steroidních hormonů, jejichž význam pro přežití v kritickém stavu je zcela zásadní. Porucha syntézy byla přitom popsána opakovaně, včetně snížené nadledvinkové odpovědi na synaktenový test v přítomnosti souvislosti s nízkými hladinami HDL-cholesterolu [113,114].

První zmínky o snížených hladinách cholesterolu se objevují již na počátku minulého století [115] a postupně byla hypocholesterolemie postulována jako stav, kdy sérová koncentrace klesá pod 3,5 mmol/l (135mg/dl). Neméně důležitá je rovněž sledování dynamiky změny. Jak

bylo uvedeno v úvodu kapitoly, pokles cholesterolu a p etrvávající nízká hladina koreluje s prognózou t chto pacient [94-100]. Sou asn je ale nutno po ítat také se situací, kdy jsou syntetické procesy v organismu primárn alterované, například u pacient s jaterním onemocněním. P esto a sou asn práv proto je d ležit sledovat vývoj plasmatických koncentrací cholesterolu v ase. Po odezn ní primárního infarktu a stabilizaci klinického stavu totiž dochází op t k jeho vzestupu, i když nedosahuje hodnot, které jsou obvyklé v pr m rné *apriori* zdravé populaci [84,86].

P íina hypocholesterolemie by se mohla obecn formulovat jako nerovnováha mezi nabídkou a poptávkou po tomto metabolitu, respektive neschopnost zvý-it syntézu cholesterolu v souladu s pot ebami akutního stavu. Ve sv tle sou asných znalostí se jedná o složitý, multifaktoriální proces. Cholesterol je pot ebný ke stavb a následn také reparaci a obnov po-kožených tkání. Jeho syntéza je energeticky velmi náročná, a tudíž v závažné situaci klesá [116]. P íinou hypocholesterolemie m fe být hemodiluce, zejména když je krevní ztráta spojena s objemovou resuscitací velkou náloží tekutin [84,85]. V této situaci je v-ak nutné zohled ovat možnost vým ny cholesterolu mezi plasmou a membránou ervených krvinek a/nebo mezi extra- a intra-vaskulárním prost edím [117]. Dalšími faktory jsou malnutrice [118] a porucha funkce jater [84,93,119], které prost ednictvím metabolických zm n a asto vy erpaných energetických zásob predisponují k existenci hypocholesterolemie i p íspívají k jejímu rychlejšímu rozvoji. V p ípad popálených pacient se uplat uje kombinace hemodiluce, cytokinové bou e, poruchy syntetických funkcí jater a ztráty apoproteinu ranými plachami [120]. A koliv se to m fe na první pohled zdát u látky tukové povahy nepravd podobné, cholesterol je také úzce spjat s metabolismem aminokyselin a protein [93,121-123]. Byl popsán p íznivý vliv na plasmatické hladiny cholesterolu prost ednictvím parenterální dodávky roztok aminokyselin, zejména v tvených [124,125]. U kriticky nemocných, závislých na p ísunu umělé nutri ní podpory m fe být hypocholesterolemie zp sobena rovn í nep ítomností cholesterolu v t chto p ípravcích. Existují ale práce, které dokumentují zvý-ení hladin cholesterolu po jejich podání. Jako vysv tlení nabízejí teorii vým ny cholesterolu z membrán ervených krvinek a sou asn indukce syntézy adekvátním p ísunkem energetického substrátu [126,127]. Experimentální použití lipidové emulze obohacené o cholesterol [128] sice zlep-ilo clearance triglycerid , akcelerovalo utilizaci tukových partikulí z plasmu a zvý-ilo tvorbu ketolátek, ale hladina cholesterolu se bohužel nezm nila. ástice umělého tuku v podávané emulsi se v-ak více p íblížily nativním chylomikron m. Enterální nutri ní podpora m fe z ejm také p ízniv



ovlivnit cholesterolový metabolismus. Po jejím podání byl popsán pozitivní efekt, který se projevil zvýšením hladiny HDL-cholesterolu a apolipoproteinu A-1 [129].

Jednou z nejvýznamnějších příčin hypocholesterolemie je vliv systémové zánětlivé reakce (SIRS) a proudující cytokinová bouře [97,109,130-137]. Po podání jednorázové dávky endotoxinu u zdravých dobrovolníků byl dokumentován rychlý rozvoj SIRS a významné změny v lipoproteinovém spektru [91]. Bezprostřední a rychlý vzestup VLDL byl následován depresí lipidového metabolismu s poklesem VLDL, LDL, HDL i celkového cholesterolu. Lipoproteiny jsou přitom důležitým transportním médiem pro přenos a neutralizaci endotoxinu a bakteriálních lipopolysacharidů [138,139]. Komplex lipopolysacharid (LPS) - lipopolysacharid binding protein (LBP) se totiž váže na CD14 receptor povrchu buněk monocyt-makrofágového systému a spouští produkci a uvolnění zánětlivých mediátorů [140,141]. Naopak vazba na HDL redukuje intenzitu uvolňovaných mediátorů [142,143]. Lipoproteiny tak mají významný imunomodulační a ochranný vliv na lipopolysacharidem indukovanou aktivaci monocytů, respektive zánětlivé reakce. Naopak sérum zbavené lipoproteinem není schopno uvolnění cytokinů efektivně suprimovat [144]. HDL lipoproteiny jsou přitom schopny odstranit více jak 70% LPS z povrchu monocytárních buněk [145]. Navíc mají antioxidantní a endotel protektivní účinky [143]. Kritický stav doprovázený SIRS tedy indukuje pokles sérových hladin lipoproteinů a tím stoupá vnímavost na lipopolysacharidový antigen. I když podobné účinky jako HDL mají také jiné lipoproteiny [146], výše uvedené skutečnosti se stávají rizikovým faktorem z hlediska obranných imunitních funkcí. To potvrzuje zjištění zvýšeného výskytu nosokomiálních infekcí u nemocných s hypocholesterolemií [147].

Na druhou stranu je nutno zmínit, že odstranění 99% LBP z plasmy imunoabsorbencí vede jen k 50%-nímu snížení transportu LPS do HDL [151]. Vazba LPS na lipoprotein je totiž ovlivňována i dalšími složkami, jako jsou LPS-binding protein (LBP), cholesteryl-ester-transfer protein nebo fosfolipid-transfer protein (PLTP) [146].

Pozitivní vliv HDL byl popsán také v případě hemoragického šoku, ischemické kolitidy nebo poškození ledvin v rámci ischemické/reperfúzní reakce. Proto jsou HDL v problematice SIRS považovány nejen za šprostě vyčytávací LPS, ale jsou zjevně schopny také tlumit aktivaci a translokaci nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), aktivního proteinu 1 (AP1) v etně ovlivnit exprese endoteliálních adhesivních molekul a endoteliální NO-syntázy (eNOS)

[149-151]. Stejně tak další složky spojené s aktivitou HDL: paraoxonáza (PON1), destičky-aktivující faktor acetyl-hydroláza (PAF-AH), sfingosin-1-fosfát (S1P), lyzofosfatidylcholin (LPC) nebo fosfolipidy obsažené v HDL mají pozitivní vliv na průběh SIRS [152-155].

Z hlediska příznivého vlivu látek lipidové povahy na průběh onemocnění je vhodné zmínit také roli vitamínu D. Ten lidský organismus získává jednak z potravy (vitamín D2-ergokalciferol) a/nebo syntézou z cholesterolu přes 7-dehydrocholesterol v kůži vlivem ultrafialového záření (vitamín D3-cholecalciferol). Aby oba vitamíny byly biologicky aktivní, musí se hydroxylovat na 1,25-dihydroxyvitamín D v játrech a ledvinách. Kromě jeho nezastupitelné role při zajištění normální density kostní tkáně je v poslední době intenzivně diskutován také jeho příznivý a/nebo preventivní vliv na průběh rozmanitých onemocnění včetně onkologických. V roce 2011 však byly tyto úvahy zádním způsobem zpochybněny [156]. Problematika vitamínu D není náplní této práce, nicméně rád bych zmínil, že hypovitaminóza tohoto mikronutrientu byla popsána u mnoha patologických stavů, včetně onemocnění akutních [157]. Z dostupných literárních zdrojů se mi však eventuelní souvislost se samotnou hypocholesterolemií dolofit nepodařilo.

### 3. Cíle diserta ní práce

Cílem této práce byly následující aspekty:

#### 1. zjistit změny v metabolismu lipidů u pacientů s akutním onemocněním v oblasti vnitřního lékařství

Poruchy metabolismu lipidů u nemocných v kritickém stavu byly opakovaně popsány především u pacientů v těžké sepsi, po operacích nebo traumatickém i popáleninovém poškození. Zajímalo nás proto, zda bude možno najít stejný fenomén také u pacientů s akutním onemocněním interního typu.

Navíc, zatímco hypocholesterolemie je v těchto případech považována za typický nálezný, u triglyceridů je obtížné odpovědět, jakým způsobem v akutním stádiu nemoci dojde.

#### 2. zhodnotit metabolismus lipidů u izolované skupiny nemocných s akutním interním onemocněním

Pacienti standardně hospitalizovaní na JIP interního typu představují velmi nehomogenní skupinu nemocných od typických interních diagnóz až po stavy po operacích nebo intoxikaci. Považovali jsme tedy za nutné vytvořit reprezentativní vzorek. Z tohoto důvodu byl metabolismus lipidů studován ve dvou samostatných projektech u pacientů: a) s akutní exacerbací Crohnovy choroby a b) s akutním krvácením do horního zažívacího traktu.

#### 3. posoudit změny v procesu získávání cholesterolu

Cholesterol je získáván v lidském organismu absorpcí a syntézou. Informací o rozvoji hypocholesterolemie v akutním stádiu onemocnění bylo v posledních dekádách publikováno mnoho. Studie, které by se soustředily na paralelní změny v průběhu jeho získávání, se však objevují spíše sporadicky. Proto jsme jako nedílnou součást výzkumných projektů hodnotili také změny v obou zmíněných procesech.

Cílem našeho výzkumu bylo tedy zhodnotit změny v metabolismu lipidů u pacientů s akutním interním onemocněním. V případě cholesterolu jsme chtěli popsat změny v procesu jeho získávání: absorpci a syntézu. Účelem bylo vytvořit ucelený obraz o jeho základním metabolismu. Cholesterol je totiž v kritickém stavu považován za potenciálně esenciální substrát a současně reaktant akutní fáze.

## 4. Soubor nemocných, statistická analýza

### 4.1 charakteristika výzkumného projektu

#### Výzkumný projekt . 1. : Změny metabolismu lipidů v interní intenzivní péči

Do studie bylo zařazeno celkem 60 dospělých pacientů s akutním interním onemocněním, hospitalizovaných na metabolické JIP Interní kliniky Fakultní nemocnice Ostrava (FNO). Pokud byli pacienti v domě, dali písemný souhlas se zařazením do studie.

Tabulka číslo 2 shrnuje základní přijímací diagnózy. Mužů bylo 28 a žen 32. Průměrný věk sledovaného souboru byl 45 let.

diagnóza	počet	diagnóza	počet
Ak. pankreatitida	11	Septický stav	4
Aktivní ulcerózní kolitida	5	Akutní kardiopulmonální selhání	6
Aktivní Crohnova choroba	24	Akutní selhání ledvin	5
Akutní infarkt myokardu	2	Akutní jaterní selhání	1
Akutní embolie do plic	2		

Tabulka 2. Zastoupení diagnóz ve vyšetřovaném souboru (přijímací diagnózy)

Zařazeni byli pacienti s akutním onemocněním, které primárně spadalo do oboru vnitřního lékařství a bylo možno předpokládat hospitalizaci delší než jeden týden s plnou závislostí na umělé výživě. Nemocní s jinou než interní diagnózou a tam, kde bylo zvýšené riziko akutní chirurgické intervence, zařazeni nebyli. Všichni byli živěni enterálně (Nutrison nebo Peptisorb, Nutricia). V případě potřeby parenterální nutriční podpory byly podávány přípravky bez tuku (Aminomix 1 1500ml, Fresenius) nebo s tukovou emulzí (OliClinomel, Baxter). Osm pacientů bylo během sledování napojeno na umělou plicní ventilaci, jedenáct dostávalo vazopresorickou farmakologickou podporu a deset podstoupilo akutní dialyzační léčbu. Zemřelo celkem 7 nemocných, ale až po ukončení týdenního sledování. Celkem 44 pacientů bylo polymorbidních a mělo i další onemocnění, která nesouvisela se základní chorobou. U deseti pacientů byl diagnostikován diabetes melitus, u devatenácti ateroskleróza (koronární i cerebrální). Dvacet dva pacientů mělo hypertenzi a v sedmi případech byla zjištěna pokročilá chronická renální insuficience (třetího a vyššího stupně, klasifikovaná dle klasifikace K/DOQI). Další dvacet jedna pacientů mělo ještě jiné (například hematologické, revmatologické, onkologické, gastroenterologické) onemocnění.

Hladiny celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerol byly stanovovány p í p íjetí, t etí a sedmý den enzymaticky automatickým analyzáto rem (Olympus AU 2700, Japonsko). Sou asn byly odebrány 3. a 7. den 2ml krve s ethylendiamintetracetátem (EDTA) ke stanovení hladin skvalenu, latosterolu, sitosterolu a kampesterolu. Po centrifugaci byly vzorky EDTA plasmy zmrafleny na -80°C, uskladn ny a po kompletaci transportovány do laborato í Fakultní nemocnice v Hradci Králové k finální analýze. Necholesterolové steroly byly extrahovány Abell-Kendalovou procedurou, derivatizací trimethylsilyletherem a analyzovány metodou plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (Turbo mass, Perkin-Elmer, Wellesley, USA).

## **Výzkumný projekt . 2: Zm ny metabolism lipid u pacient s Crohnovou chorobou**

Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice v Ostrav a v-ichni ú astníci dali p ed za azením sv j písemný souhlas s ú astí. Bylo za azeno celkem 24 dosp lých pacient s akutními projevy Crohnovy choroby. U jedenácti z nich se jednalo o recentní záchyt. V-ichni m li hodnotu CDAI (Crohn's disease activity index) více neff 150 a 19 pacient nad 250. Mufl bylo 12 a flen také 12. Pr m rný v k sledovaného souboru byl 28 let. Základní metabolické parametry souboru shrnuje tabulka 3.

pacienti s aktivní CD (n=24)	
CDAI	282.5 (222. 316)
CRP (mg/l)	48.5 (34. 95)
váhový úbytek* (kg)	5.5 (5. 8.5)
albumin (g/l)	30 (28.2. 36.2)
prealbumin (g/l)	0.15 (0.113. 0.19)

Tabulka 3. Základní charakteristika souboru pacient s aktivní Crohnovou chrobou (CD) p í p íjetí. CDAI: Crohn's disease activity index, CRP: C-reaktivní protein, \* váhový úbytek za 3 m síce. Presentováno jako medián (25-75%)

Nemocní byli lé eni podle stejného protokolu: dostávali peroráln mesalazin v dávce 4g/den a intravenosn kortikoidy. Úvodní vysoká dávka intravenosního methylprednisolonu 2mg/kg/den byla následována dávkou 1mg/kg/den a po sedmi dnech konvertována do perorální formy 32mg methylprednisolonu denn . Dále byl podáván vitamin E, antibiotika a dal-í symptomatická terapie. Nutri ní p íjem byl zaji- ován aplikací definované enterální výflivy (Peptisorb, Nutricia). U 15 pacient byl kalorický p íjem dopln n o parenterální nutri ní podporu bez p ítomnosti tuku (Aminomix 1 1500ml, Fresenius). Nutri ní podpora

byla průběh modifikována v závislosti na klinické a laboratorní odezvě. Pacienti nekonzumovali žádnou kuchyňskou stravu od chvíle přijetí po dobu 14 dní.

Přijetí byly provedeny standardní odběry v rámci lipidového spektra. Další vzorky se odebíraly 3., 14. a 28. den od přijetí. Jednalo se o stanovení sérových hladin celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerolů. Ve výše uvedených termínech byl dále odebrán vzorek krve s EDTA, který byl centrifugován a získaná EDTA plasma byla následně zmrazena a uskladněna při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . V případě, že pacient nebyl ze studie vyřazen, byly zmrazené vzorky transportovány do laboratoře Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde byly stanovovány hladiny skvalenu, latosterolu, sitosterolu a kampesterolu plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (Turbo mass, Perkin-Elmer, Wellesley, USA). Hladiny celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerolů byly stanovovány enzymaticky (Olympus AU 2700, Japonsko).

### **Výzkumný projekt . 3: Změny metabolismu lipidů u pacientů s akutním krvácením do GITu**

Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice v Ostravě a všichni účastníci dali před zájmem svůj písemný souhlas s účastí. Bylo zahrnuto celkem 24 dospělých pacientů s melénoú a hematemésou. Akutní krvácení do GITu bylo objektivizováno endoskopickým vyšetřením/operativním, provedeným do 24 hodin od přijetí. Mužů bylo 13 a žen 11. Průměrný věk sledovaného souboru byl 62 let. Základní charakteristiku souboru shrnuje tabulka 4.

Do studie nebyli zahrnuti pacienti s jaterní cirhózou v anamnéze. Pokud byla diagnostikována a před zájmem, pouze nemocní klasifikovaní jako Child Pough A pokračovali ve sledování. Pacienti s nevarikózním krvácením byli léčeni kontinuální aplikací blokátor protonové pumpy (PPI) v dávce 8mg omeprazolu za hodinu, pacienti s varikózním krvácením dostávali navíc 1mg terlipresinu každé 4 hodiny a 1g cefotaximu každé 8 hodin. Dále byly podávány krystaloidy (balancované roztoky) a symptomatická terapie. Perorální nutriční příjem byl zastaven po dobu prvních tří dnů, kdy pacienti dostávali pouze roztoky aminokyselin a glukózy.

	krvácení do GITu (n=24)	necirhotici (n=18)	cirhotici (n=6)
APACHE skóre	17 (12,5-18,5)	13 (11-18)	16,5 (13-17)
hemoglobin (g/l)	80,5 (69,5-88,5)	80 (75-88)	68,5 (61-74)
hematokrit	0,247 (0,21-0,286)	0,258 (0,213-0,306)	0,21 (0,198-0,215)
EBR (ml)	595 (514-1095)	579 (300-643)	1100,5 (600-1350)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,8 (22,8-31,2)	25,72 (24,05-30)	21,9 (19-23,1)
albumin (g/l)	30,95 (27-36,35)	32,15 (27,2-37,2)	28,05 (25,2-34,2)
prealbumin (g/l)	0,155 (0,12-0,225)	0,205 (0,2-0,27)	0,09 (0,06-0,13)
cholesterol (mmol/l)	2,79 (2,315-3,94)	3,355 (2,77-4,45)	2,5 (1,97-3,18)

Tabulka 4. Základní metabolické parametry pacientů s krvácením do GITu (n=24) a srovnání podskupiny cirhotiků (n=6) a necirhotiků (n=18) na začátku studie (vstupní hodnoty). EBR: spotřeba erytrocytárních mas (transfúze) během prvních 48 hodin, BMI: body mass index. Výsledky jsou prezentovány jako medián (25-75%).

První vzorek projektu se odebíral před vstupem do studie, včetně rutinních laboratorních testů, které byly opakovány dle potřeby. Dalšími termíny odběru byl den 3. a 6. Byly stanovovány plasmatické koncentrace celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerolů. Současně byly odebrány 2ml krve s ethylendiamintetracetátem (EDTA) ke stanovení hladin skvalenu, latosterolu, sitosterolu a kampesterolu. Po centrifugaci byly vzorky EDTA plasmy zmrazeny na -80°C, uskladněny a po kompletaci transportovány do laboratorní fakultní nemocnice v Hradci Králové k finální analýze. Hladiny celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerolů byly stanovovány enzymaticky automatickým analyzátozem (Olympus AU 2700, Japonsko). Necholesterolové steroly byly extrahovány Abell-Kendalovou procedurou, derivatizací trimethylsilyl etherem a analyzovány metodou plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (Turbo mass, Perkin-Elmer, Wellesley, USA).

## 4.2 analytická část

V rámci jednotlivých projektů byly hladiny celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerol stanovovány enzymaticky. Hladiny skvalenu, lathosterolu, sitosterolu a campesterolu byly stanovovány metodou plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

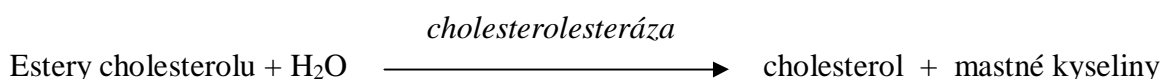
### a) Kvantitativní stanovení celkového cholesterolu

Metoda je založená na enzymatickém stanovení s fotometrickým měřením barevného reakčního produktu. Používala se firemní souprava Cholesterol OSR 6216 Olympus Diagnostica, která je určena pro rutinní stanovení cholesterolu v séru (plazm) pro biochemický fotometrický analyzátor Olympus AU 640 a AU 2700.

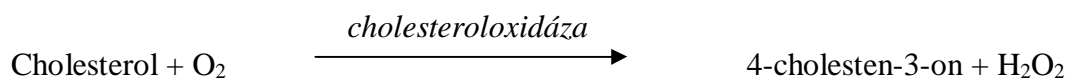
Po hydrolyze esterů cholesterolu je cholesterol oxidován a následně reaguje uvolněný peroxid vodíku s fenolem a 4-aminoantipyrinem. Vzniká tak červeně zabarvený chinonimin, jehož absorbance se měří při 540 nm.

Princip:

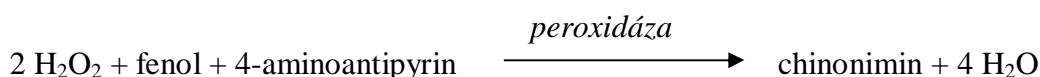
Protože v séru je asi 70 % cholesterolu esterifikováno, musí být při stanovení celkového cholesterolu nejprve estery cholesterolu hydrolyzovány pomocí enzymu cholesterolesterázy. Enzymatické stanovení probíhá ve třech fázích:



V další fázi je cholesterol oxidován za katalytického působení enzymu cholesteroxidázy:



V této indikační fázi reaguje peroxid vodíku vzniklý v předchozí reakci na principu oxidativní kopulace s fenolem a 4-aminoantipyrinem za katalytického působení enzymu peroxidázy. Vzniká červeně zabarvený chinonimin, jehož absorbance se měří při 540 nm.





## b) Kvantitativní stanovení LDL cholesterolu

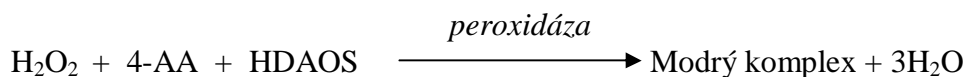
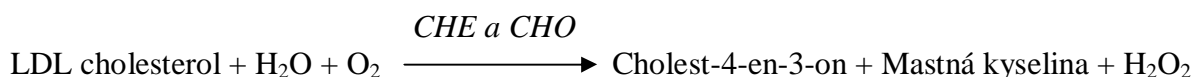
Metoda je postavena na principu enzymatického stanovení s fotometrickým měřením barevného reakčního produktu na analyzátoru Olympus AU 2700. Používá se firemní souprava LDL-Cholesterol OSR 6283 Olympus Diagnostica, která je určena pro rutinní stanovení LDL-cholesterolu v plazmě pro uvedený typ biochemického fotometrického analyzátoru firmy Olympus.

Princip:

Tak zvané ochranné činidlo (Protecting Agent) obsažené v reagentu R1 chrání LDL cholesterol před enzymatickými reakcemi s cholesterolesterázou (CHE) a cholesteroxidázou (CHO). Tyto reakce probíhají pouze s cholesterolem obsaženým v chylomikronech, HDL a VLDL lipoproteinech. Vznikající peroxid vodíku je odbouráván katalázou obsaženou v reagentu R1:



Po přidání reagentu R2 je ochranné činidlo uvolněno z LDL částic a kataláza je deaktivována azidem sodným. Enzymy CHE a CHO potom katalyzují klasické enzymatické reakce jen s LDL cholesterolem za tvorby peroxidu vodíku. Peroxid vodíku reaguje s N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilinem (HDAOS) a 4-aminoantipyrinem (4-AA) v přítomnosti peroxidázy za tvorby modře zbarveného komplexu:

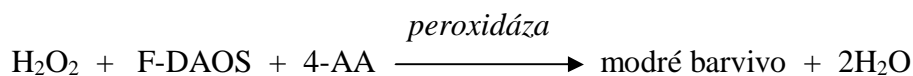
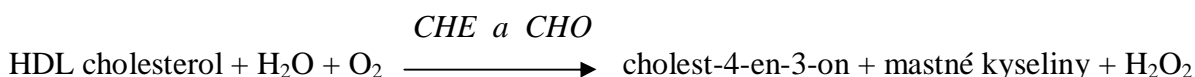
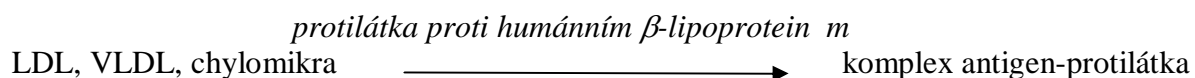


c) Kvantitativní stanovení koncentrace HDL cholesterolu

Metoda se provádí enzymatickou spektrofotometrickou metodou za pomoci firemní soupravy HDL-Cholesterol OSR 6287 Olympus Diagnostica na analyzátorech Olympus AU 640 a AU 2700.

Princip:

Protilátka proti humánním  $\beta$ -lipoproteinům (LDL, VLDL a chylomikrony) obsažená v reagentu R1 vytváří komplexy antigen-protilátka se všemi výše uvedenými lipoproteiny kromě HDL. Vzniklé imunokomplexy zabírají průběh enzymatických reakcí u těchto lipoproteinů. Volný HDL cholesterol se přidávkou činidla R2 enzymaticky stanoví za katalýzy cholesterolsterázy (CHE) a cholesteroloxidázy (CHO). Konečný peroxid vodíku vznikající enzymatickou reakcí s HDL cholesterolem je substrátem pro enzym peroxidázu katalyzující oxidaci kopulací F-DAOS, což je sodná sůl N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxy-4-fluoroanilinu a 4-AA, což je 4-aminoantipyrin. Produktem této reakce je modré barvivo (substituovaný chinondiimin), jehož absorpční lze měřit při optimální vlnové délce 600 nm.



d) Kvantitativní stanovení triacylglycerol

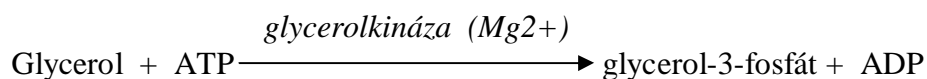
Metoda založená na enzymatickém testu pomocí firemní soupravy Triglyceride OSR 6133 Olympus Diagnostica na analyzátoch Olympus AU 640 a AU 2700.

Princip:

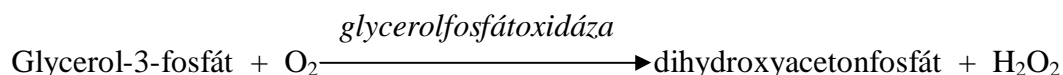
Koncentrace triacylglycerol v séru (plazm) se stanovuje enzymatickou metodou v několika fázích s konečnou indikací Trinderovou reakcí. V první fázi se triacylglyceroly hydrolyzují za katalytického působení lipoproteinové lipázy (LPL):



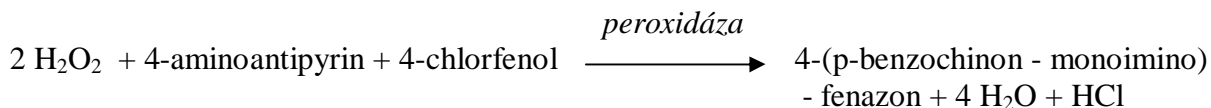
Uvolněný glycerol se působením glycerolkinázy (GK) za přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  iontů přeměňuje na glycerol-3-fosfát:



Glycerol-3-fosfát se katalyticky oxiduje enzymem glycerolfosfát oxidázou (GPO) na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku:



Vzniklý peroxid vodíku reaguje oxidací kopulací (za katalýzy peroxidázou) s 4-aminofenazonem a 4-chlorfenolem za vzniku barevného produktu, jehož absorbance se měří.

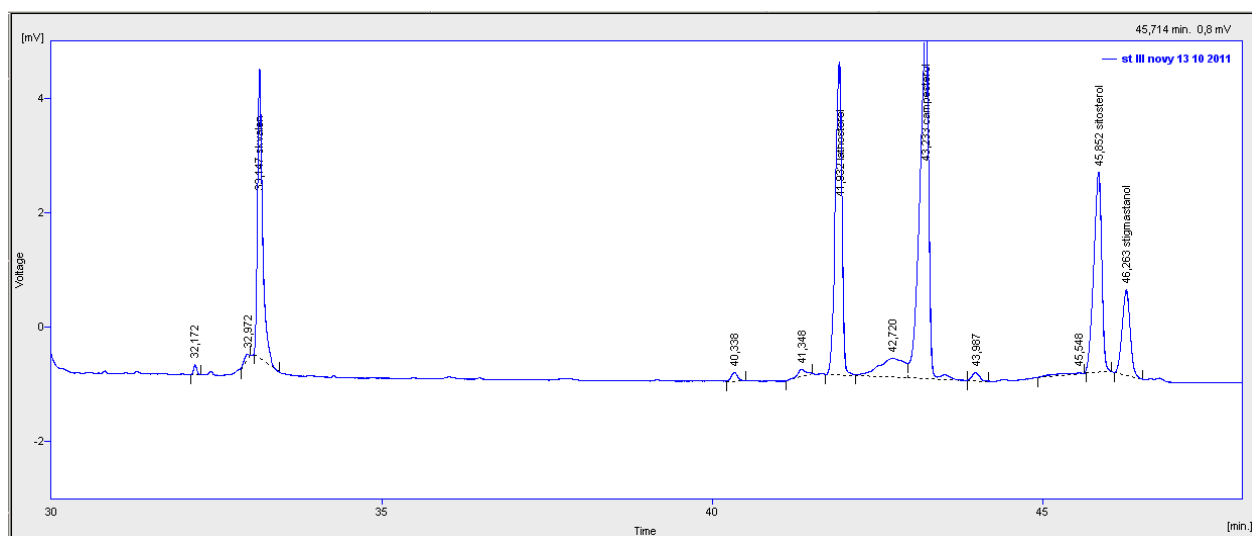


### e) Kvantitativní stanovení necholesterolových sterol

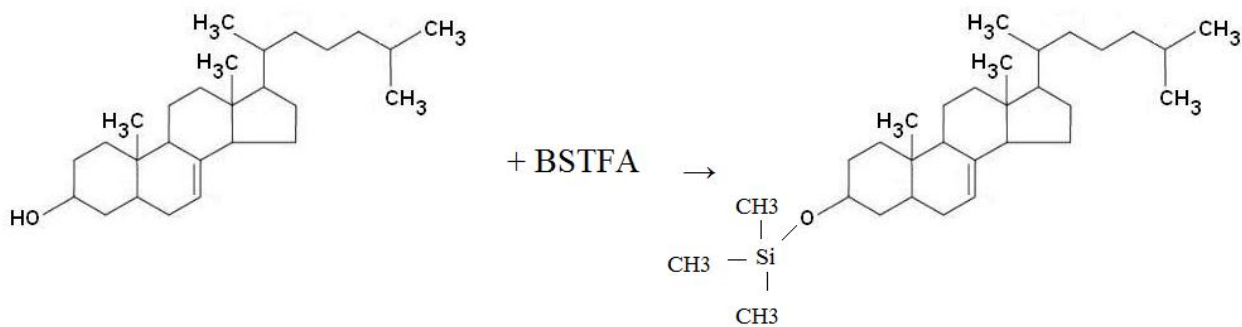
Metoda je založena na extrakci Abell-Kendallovou metodou saponifikací séra roztokem hydroxidu draselného v ethanolu. V průběhu saponifikace dochází k hydrolyze triacylglycerol a fosfolipid na polární látky a esterifikované steroly se uvolní z vazby na mastné kyseliny. Následným krokem je extrakce do nepolárního rozpouštědla n-hexanu. Vzhledem k polárnímu charakteru hydroxylové skupiny na nepolárním skeletu a vysokému bodu varu je následně provedena derivatizace trimethylsilyletherem s použitím N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA), (fa. Sulpeco Inc., Bellefonte). Následně byla provedena separace plynovou chromatografií na nepolární kapilární koloně. Finální detekce probíhá metodou hmotnostní spektrometrie.

#### Princip:

Do rozmrazených a promíchaných vzorků se přidává nejprve denaturant v formě etanolu a roztok hydroxidu draselného. Po hodinové teplotaci v termostatu při teplotě 45 °C, během které dochází k hydrolyze triacylglycerol a fosfolipid, se vzorky prudce ochlazují. Následně je přidáván n-Hexan, do kterého se na horizontální teplotě po dobu 10 min extrahují lipidové látky. Následuje separace hexanové vrstvy centrifugací a její odpařování v koncentrátoru ve speciálních zkumavkách (Wassermannovy) do kterých se vrstva přenáší. Ve finále probíhá derivatizace trimethylsilyletherem s použitím N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA) při teplotě 75 °C po dobu 45 min v termobloku. Finální produkty, tzv. trimethylsilyl deriváty sterol se následně chromatograficky separují (obrázek 7 a 8). Kvantifikace se provádí metodou tak zvaného vnitřního standardu, kdy se koncentrace jednotlivých analytů odečítají z kalibračních přímků.

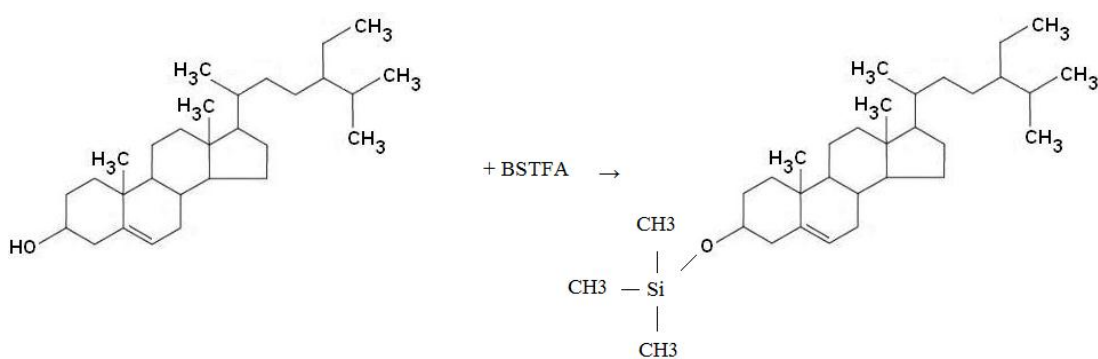


Obrázek 7. Příklad chromatografického záznamu.



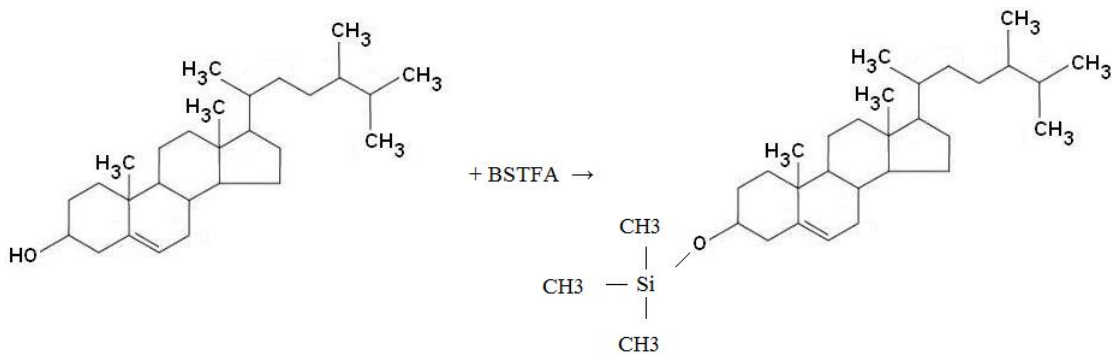
Latosterol

Trimethylsilyl derivát latosterolu



-sitosterol

Trimethylsilyl derivát -sitosterolu



Kampesterol

Trimethylsilyl derivát kampesterolu

Obrázek 8. P íklady trimethylsilyl derivát

### 4.3 statistické zpracování dat

Data byla ve všech souborech zpracována pomocí statistického softwaru Sigma-Stat 3,1 a výsledky jsou prezentovány jako medián [25-75%]. Pro hodnocení sledovaných parametrů byly použity: t-test, ANOVA a neparametrické testy.

V případě, kdy nebyla k dispozici hodnota kontrolního souboru pro sledovanou veličinu, byly hodnoceny zejména v případě srovnáním mezi sebou v rámci sledovaného parametru.

Rozdíl byl považován za signifikantní při hodnotě  $p < 0,05$ .

Naměřené hodnoty prezentovaných parametrů byly porovnány s kontrolní skupinou 100 dobrovolných dárců krve. Při determinaci kontrolního souboru jsme vycházeli z požadavku, aby se jednalo o zdravé jedince, jejichž laboratorní výsledky budou odrážet polymorfismus celé populace v tom nejširším měřítku. Byl proto zvolen výše uvedený soubor zdravých osob, u kterých bylo možno z pravidelných odběrů na krevním centru extrahovat také laboratorní polovky pro námi sledované parametry.

Pro primární porovnání sledované veličiny s adekvátní hodnotou kontrolní skupiny byl použit dvouvýběrový *t*-test. Ten se používá pro porovnání středních hodnot dvou populací s normálním rozdělením. Mírné porušení předpokladu normality zpravidla nemá na výsledky testu podstatný vliv. Nicméně v případě výraznějších odchylek od normality, které lze mimochodem vysledovat v grafické prezentaci našich výsledků, bylo nutno použít testy neparametrické (v našem případě Mann-Whitneyův test). Tyto neparametrické testy nekladou žádné požadavky na určení výchozího rozdělení a jejich využití je proto širší. Na druhou stranu slabší předpoklady musí vést logicky k závěru, že nejsou statisticky tak silné, jako jejich parametrické protějšky.

Pro porovnání změny sledované veličiny v časovém sledu (porovnání střední hodnoty více než dvou populací) byla použita analýza rozptylu, respektive ANOVA (z anglického ANalysis Of VAriance). To se týkalo zejména situace, kdy jsme pro sledovaný parametr

neboli kontrolní skupinu. Tato metoda patří mezi parametrické testy. Předpokládá nezávislost výběru, normalitu rozdělení a homoskedasticitu, tedy identický rozptyl u všech populací. Pokud ale docházelo k porušení homoskedasticity a/nebo při výrazných odchylkách od normality byl v našem případě prováděn test Kruskal-Wallisův.

Spearmanův korelační koeficient byl použit pro hodnocení vzájemného vztahu mezi sledovanými parametry lipidového metabolismu a hodnotami dalších specifických vybraných ukazatelů.

Míru závislosti mezi dvěma sledovanými znaky lze v této situaci statisticky hodnotit prostřednictvím tzv. korelačního koeficientu. V případě, že zpracováváný výběr pochází z dvourozměrného normálního rozdělení, je používán výběrový korelační koeficient. Tento předpoklad byl však v našem souboru porušen. Proto jsme použili zmíněný Spearmanův korelační koeficient. Jeho hodnota se pohybuje v rozmezí od -1 do 1, přičemž hodnoty blízké kromě znaménka znamenají, že mezi veličinami existuje silná závislost a naopak hodnoty blízké nule signalizují, že závislost mezi sledovanými veličinami neexistuje nebo je velice slabá.

## 5. Vlastní výsledky

V následující kapitole jsou prezentovány výsledky jednotlivých projektů. Jednalo se o vstupní, pilotní studii, která hodnotila metabolismus lipidů u pacientů s akutním interním onemocněním. Následují dvě další studie, které hodnotí stejné parametry na homogenních souborech nemocných s konkrétní interní diagnózou.

### Výzkumný projekt 1.: Změny metabolismu lipidů v interní intenzivní péči

Ve sledovaném souboru (n=60) byly při srovnání s kontrolní skupinou detekovány signifikantní změny v plasmatických koncentracích jak základních ukazatelů lipidového metabolismu, tak necholesterolových sterolů (tabulka 5, graf 1 a 2).

	kontrola	pacienti s akutním interním onemocněním (n=60)		
		den 0	den 3	den 7
t-CH (mmol/l)	4,832 (4,21-5,52)	3,195 (2,4 - 4,2)**	2,7 ( 2,3 - 3,607)**	3,8 ( 2,997 - 4,563)**
LDL-CH (mmol/l)		1,53 ( 1,1 - 2,4 )	1,22 ( 0,905 - 2,02 )	1,86 ( 1,313 - 2,735 )
HDL-CH (mmol/l)		0,98 ( 0,73 - 1,23 )	0,86 ( 0,725 - 1,13 )	0,98 ( 0,765 - 1,165 )
TAG (mmol/l)		1,075 ( 0,67-1,53 )	1,265 ( 0,89-1,625 )	1,67 ( 1,222-2,215 )
SQ (umol/l)	0,89 (0,535-1,52)		1,515 (0,785 - 2,715)*	1,47 ( 0,873 - 3,208)*
LTH (umol/l)	6,35 (4,85-8,705)		2,735 (1,29 - 4,905)**	3,36 ( 1,18 - 5,353)**
SIT (umol/l)	4,99 (3,31-6,16)		4,9 (2,33 - 9,892 )	4,47 ( 3,055 - 9,14 )
CAM (umol/l)	9,76 (7,46-12,51)		3,22 ( 1,94 - 4,99)**	3,28 ( 1,95 - 5,985)**

Tabulka 5. plasmatické koncentrace lipidů a sterolů u pacientů s akutním interním onemocněním (n=60).

t-CH: celkový cholesterol, LDL-CH: LDL cholesterol, HDL-CH: HDL cholesterol, TAG: triacylglyceroly, SQ: skvalen, LTH: latosterol, SIT: sitosterol CAM: kampesterol,

\*: statistická významnost  $p < 0,05$  (srovnání s kontrolní skupinou)

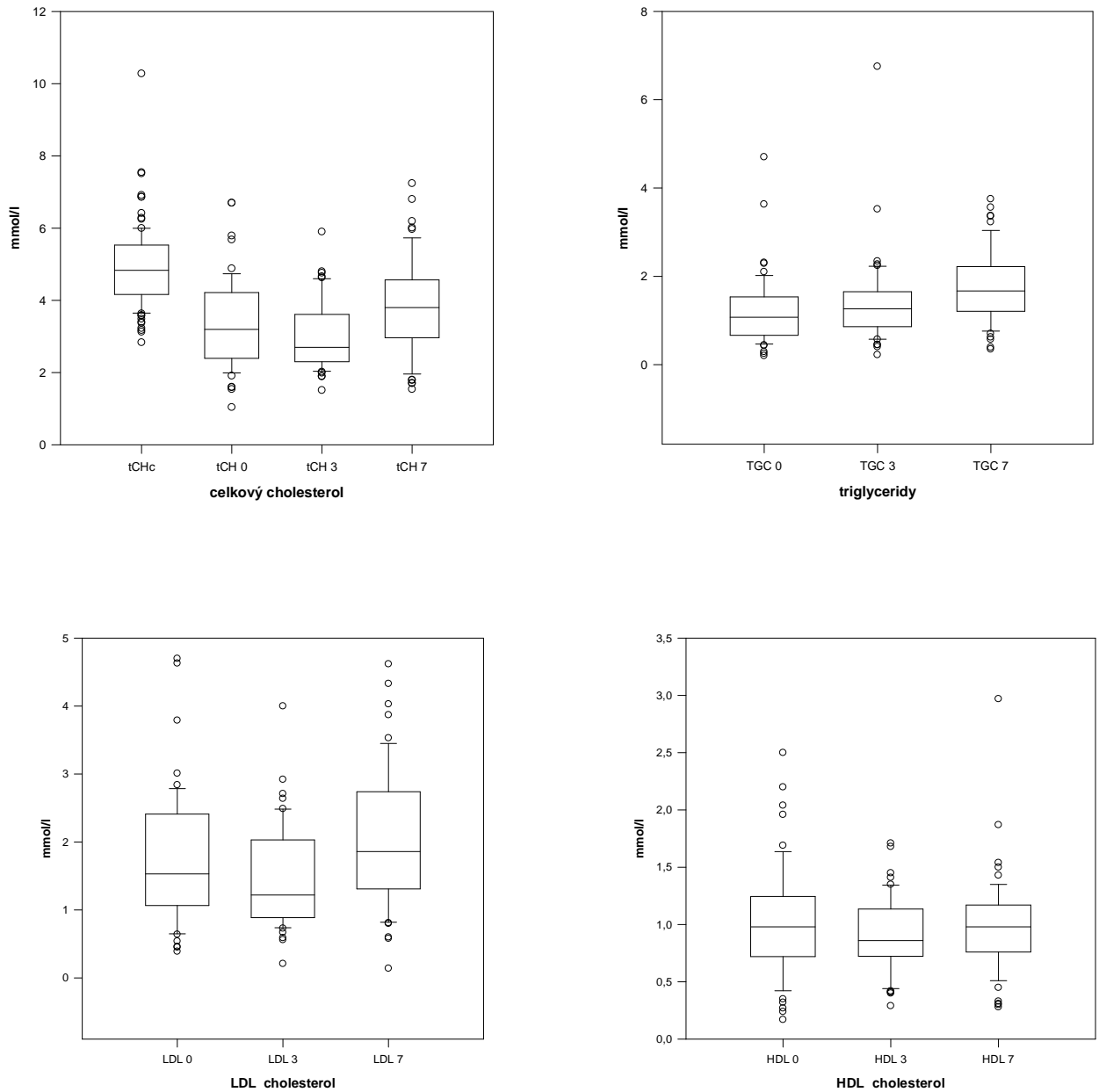
\*\* : statistická významnost  $p < 0,001$  (srovnání s kontrolní skupinou)

Celkový cholesterol byl snižován po celou dobu sledování ( $p < 0,05$ ) a nejnižší byl 3. den.

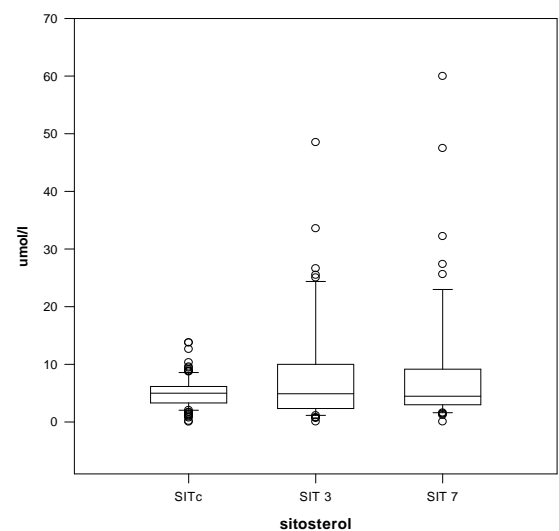
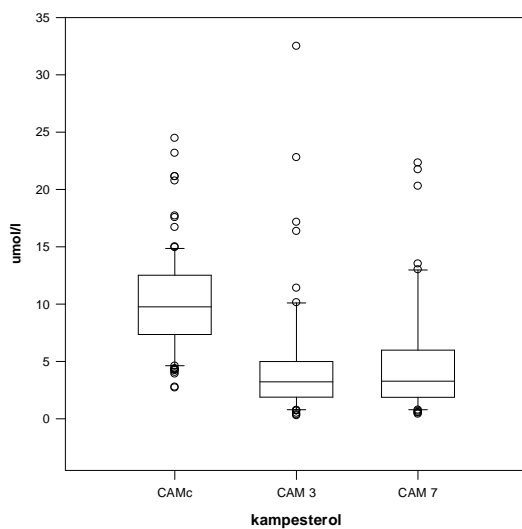
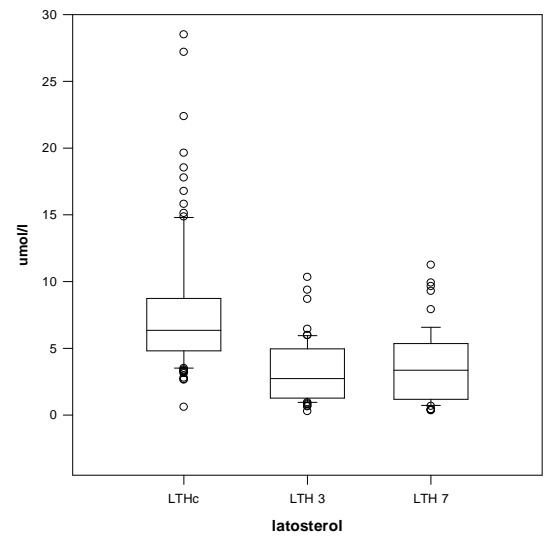
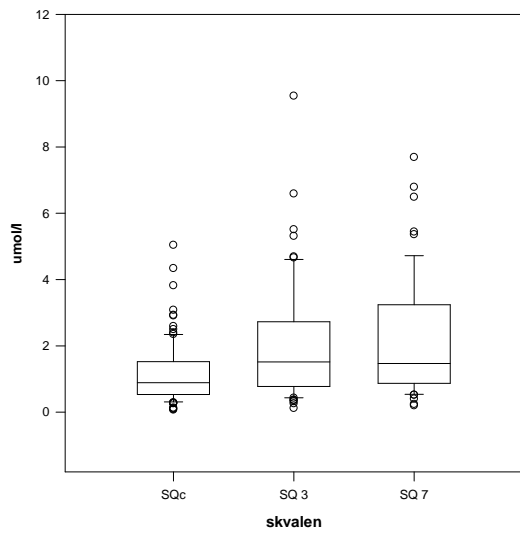
Pro LDL a HDL cholesterol jsme neměli kontrolní ukazatele, protože tyto hodnoty snižované s nejnižší hodnotou této den. Při porovnání výsledků uvnitř skupiny mezi sebou byl detekován rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi koncentracemi LDL cholesterolu 3. a 7. den. U HDL cholesterolu rozdíly nebyly zaznamenány. Nejnižší hodnota triacylglycerolů byla naměřena při porovnání. Opět bez možnosti vyuffit kontrolní skupinu byl detekován signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) při srovnání hodnoty při porovnání s hodnotou 3. a 7. den.



Změny plasmatických koncentrací sterolů byly významné u cholesterolu a kampesterolu ( $p < 0.001$ ). Koncentrace sitosterolu se pohybovaly na úrovni kontrolní skupiny a koncentrace skvalenu byly zvýšené.



Graf . 1. Box Plots : plasmatické koncentrace celkového, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerolů během sledování u pacientů s akutním interním onemocněním (n=60). tCH: celkový cholesterol, LDL: LDL cholesterol, HDL: HDL cholesterol, TGC: triacylglyceroly; písmeno C za zkratkou: kontrolní skupina; číslo 0,3,7 za zkratkou: den od přijetí.



Graf . 2. Box Plots : plasmatické koncentrace sterolů a jejich změny během sledování u pacientů s akutním interním onemocněním (n=60).

SQ: skvalen, LTH-latosterol, CAM: kampesterol, SIT: sitosterol;

písmeno C za zkratkou: kontrolní skupina; číslo 3,7 za zkratkou: den od přijetí

## Výzkumný projekt . 2: Změny metabolismu lipidů u pacientů s Crohnovou chorobou

Ve sledovaném souboru (n= 24) byly při srovnání s kontrolní skupinou detekovány signifikantní změny v plasmatických koncentracích jako základních ukazatelů lipidového metabolismu, tak necholesterolových sterolů (tabulka 6, grafy 3 a 4).

	kontrola	pacienti s Crohnovou chorobou (n=24)			
		den 0	den 3	den 14	den28
t-CH (mmol/l)	4,83(4,21-5,52)	3,32(2,3-3,86)**	2,73(2,22-3,42)**	4,10 (3,50-5,34)	4,86 (4,32-6,5)
LDL-CH (mmol/l)		1,70 (0,78-2,37)	1,26 (0,76-1,71)	2,28 (1,45-2,83)	3,05 (1,46-2,81)
HDL-CH (mmol/l)		0,94 (0,76-1,33)	0,87 (0,74-1,24)	1,06 (0,94-1,3)	1,62 (1,27-2,005)
TAG (mmol/l)		0,95 (0,59-1,55)	1,41 (0,85-1,77)	1,75 (1,15-2,22)	1,38 (0,960-2,13)
SQ (umol/l)	0,89(0,54-1,52)		1,09 (0,81-2,317)	1,05 (0,54-2,11)	0,98(0,43-1,86)
LTH (umol/l)	6,35(4,85-8,70)		1,87 (1,11-3,80)*	2,74(0,99-5,42)*	2,44(1,12-4,52)*
SIT (umol/l)	4,99(3,31-6,16)		4,91 (2,13-8,71)	4,32 (2,69-8,66)	6,28 (3,98-9,81)
CAM (umol/l)	9,76(7,46-12,51)		3,49(1,56-7,103)*	3,38(1,99-5,62)*	3,62(2,37-9,69)*

Tabulka 6. plasmatické koncentrace lipidů a sterolů u pacientů s Crohnovou chorobou (n=24)  
t-CH: celkový cholesterol, LDL-CH: LDL cholesterol, HDL-CH: HDL cholesterol, TAG: triacylglyceroly, SQ: skvalen, LTH: latosterol, SIT: sitosterol CAM: kampesterol,

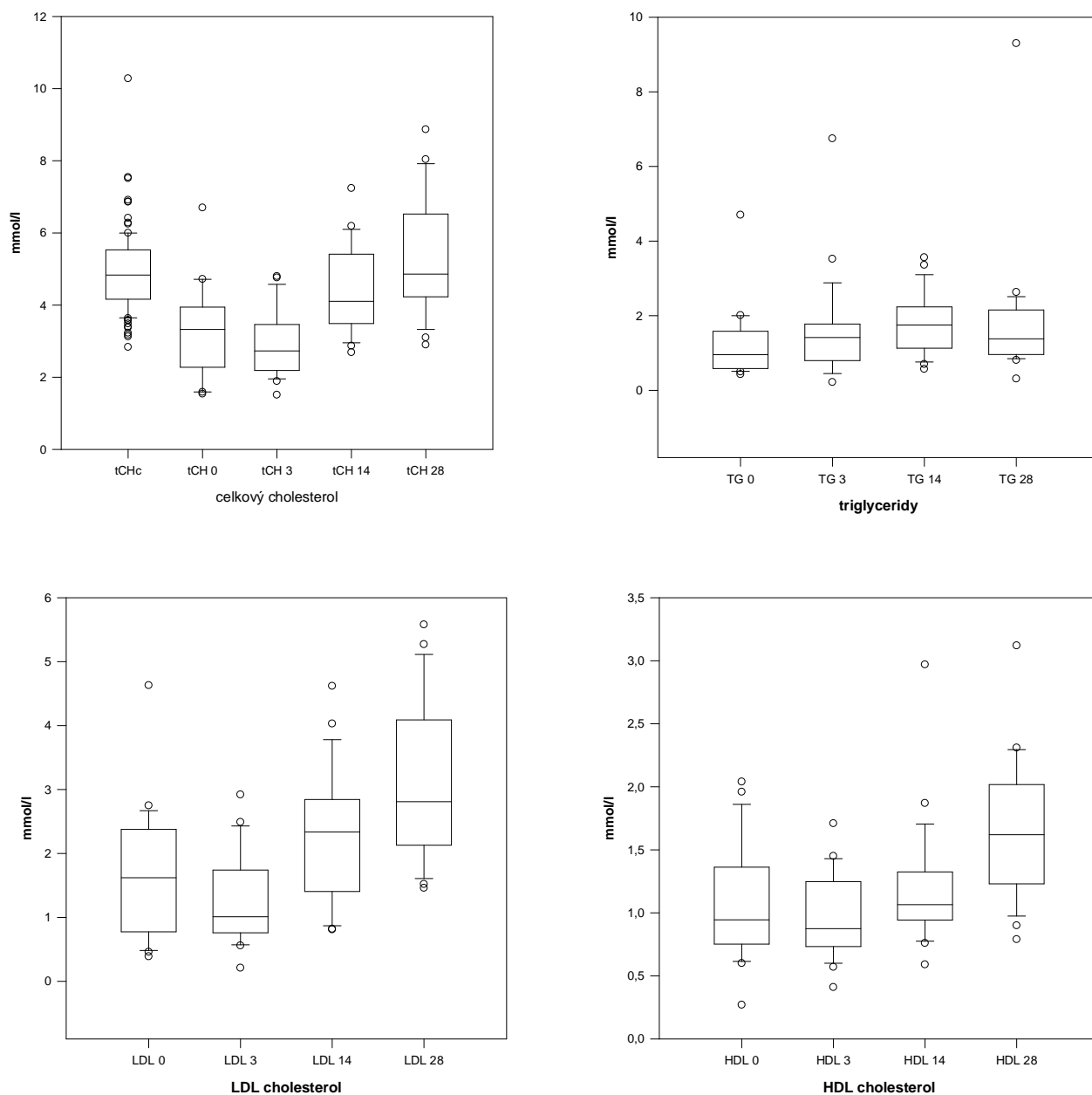
\*: statistická významnost  $p < 0,05$  (srovnání s kontrolní skupinou)

\*\* : statistická významnost  $p < 0,001$  (srovnání s kontrolní skupinou)

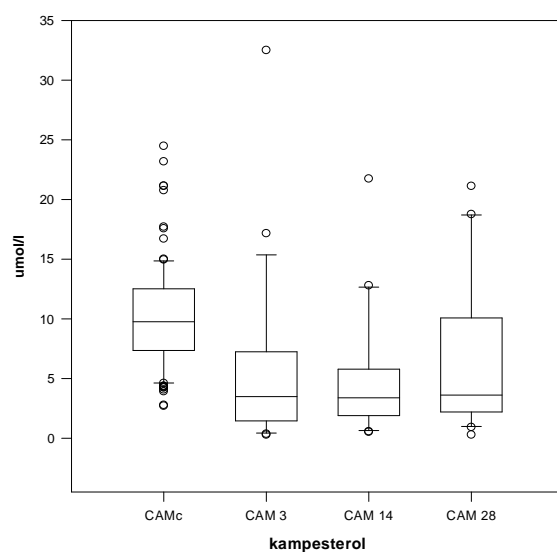
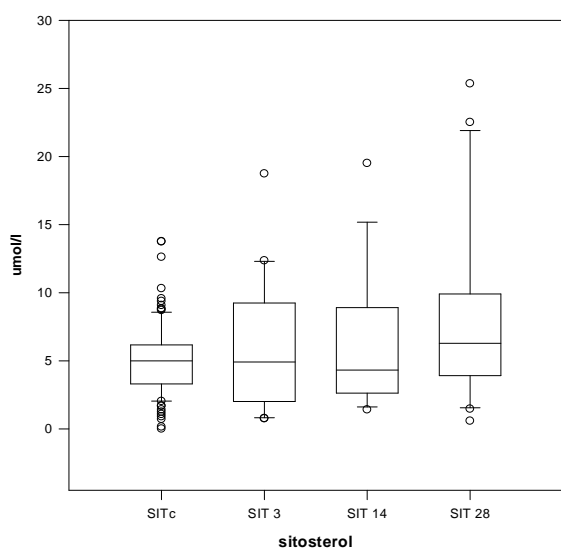
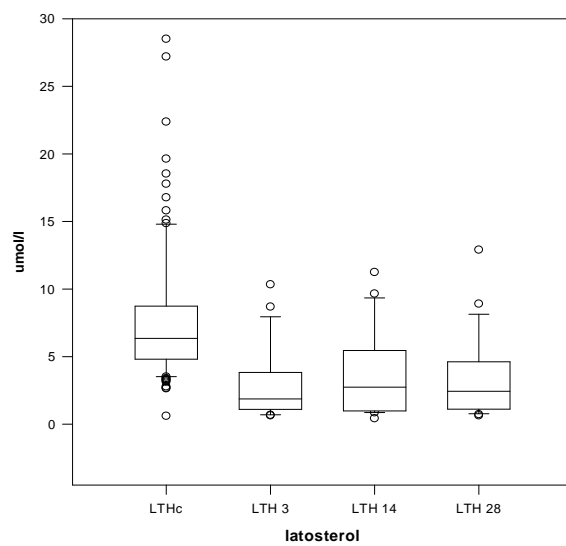
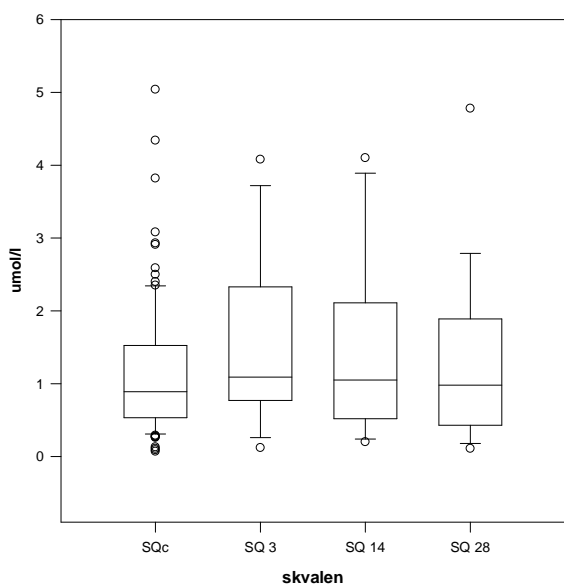
Celkový cholesterol byl nejnižší 3. den sledování s tím, že společně s hodnotou při přijetí vykazoval signifikantní pokles ( $p < 0,001$ ). Při porovnání naměřených koncentrací LDL a HDL cholesterolu uvnitř skupiny mezi sebou byly zaznamenány významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) při srovnání nejnižších hodnot obou parametrů 3. den s hodnotami 14. a 28. den. Hladiny triacylglycerolů byly nejnižší při přijetí a statisticky významnou odchylku ( $p < 0,05$ ) jsme zaznamenali při srovnání hodnot při přijetí a 14. den.

Při hodnocení hladin sterolů jsme zaznamenali statisticky významný pokles hladin ( $p < 0,05$ ) latosterolu a kampesterolu, které byly nejnižší na začátku sledování. U sitosterolu a skvalenu se pohybovaly na úrovních kontrolní skupiny a byly statisticky nevýznamné.

Korelace mezi ukazateli lipidového metabolismu a nutričními markery (albumin, prealbumin) a ukazateli zánětu (CDAI, C-reaktivní protein) neprokázaly statisticky významné souvislosti.



Graf . 3. Box Plots : plasmatické koncentrace celkového, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerol b hem sledování u pacient s akutní Crohnovou chorobou (n=24). tCH: celkový cholesterol, LDL: LDL cholesterol, HDL: HDL cholesterol, TG: triacylglyceroly; písmeno C za zkratkou: kontrolní skupina; íslo 0,3,14,28 za zkratkou: den od p íjetí.



Graf . 4. Box Plots : plasmatické koncentrace sterol a jejich zm ny b hem sledování u pacient s akutní Crohnovou chorobou (n=24).  
 SQ: skvalen, LTH-latosterol, CAM: kampesterol, SIT: sitosterol;  
 písmeno C za zkratkou: kontrolní skupina; íslo 3,14,28 za zkratkou: den od p íjetí

### Výzkumný projekt . 3: Změny metabolismu lipidů u pacientů s akutním krvácením do GITu

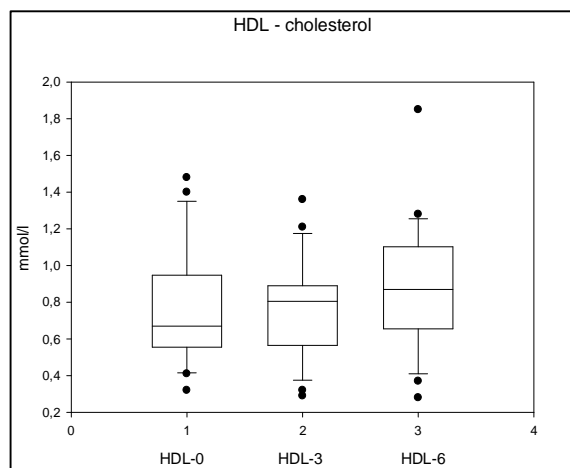
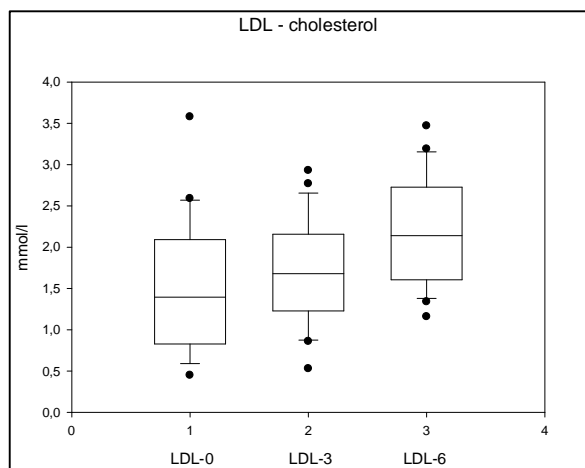
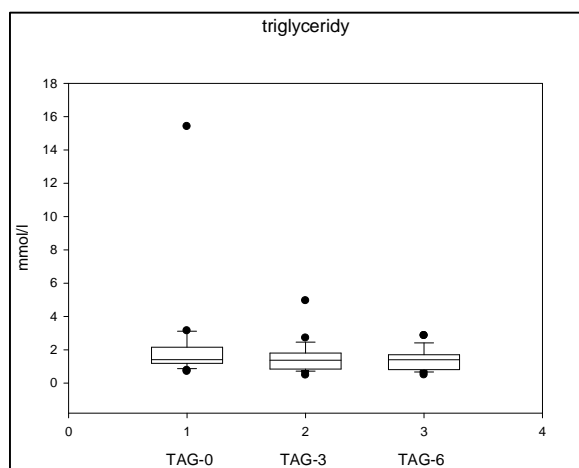
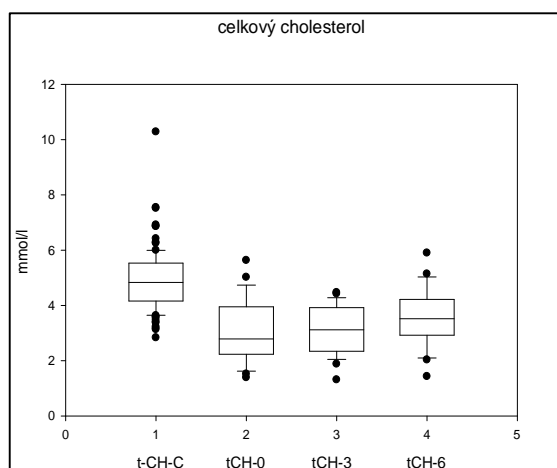
Ve sledovaném souboru (n= 24) byly při srovnání s kontrolní skupinou detekovány signifikantní změny v plasmatických koncentracích jak základních ukazatelů lipidového metabolismu, tak necholesterolových sterolů (tabulka 7, grafy 5 a 6).

	kontrola	pacienti s krvácením do GITu (n=24)		
		den 0	den 3	den 6
t-CH (mmol/l)	4,832 (4,21-5,52)	2,79 (2,315-3,94)**	3,12 (2,395-3,89)**	3,52 (2,98 - 4,215)**
LDL-CH (mmol/l)		1,395 (0,865-2,015)	1,68 (1,235-2,155)	2,14 (1,65-2,715)
HDL-CH (mmol/l)		0,67 (0,56-0,915)	0,805 (0,58-0,89)	0,87 (0,66-1,075)
TAG (mmol/l)		1,41 (1,195-2,11)	1,375 (0,85-1,785)	1,405 (0,82-1,70)
SQ (umol/l)	0,89 (0,535-1,52)	0,805 (0,425-1,15)	0,597 (0,288-1,02)*	0,599 (0,483-0,985)
LTH (umol/l)	6,35 (4,85-8,705)	2,733 (1,93-5,41)**	2,939 (1,646-6,21)**	3,876 (1,69-7,047)**
SIT (umol/l)	4,995 (3,31-6,165)	3,489 (2,46-4,306)*	3,055 (2,422-3,96)**	3,265 (2,495-4,869)*
CAM (umol/l)	9,76 (7,46-12,51)	5,94 (5,222-8,65)**	4,740 (3,555-8,27)**	6,398 (4,951-8,29)**

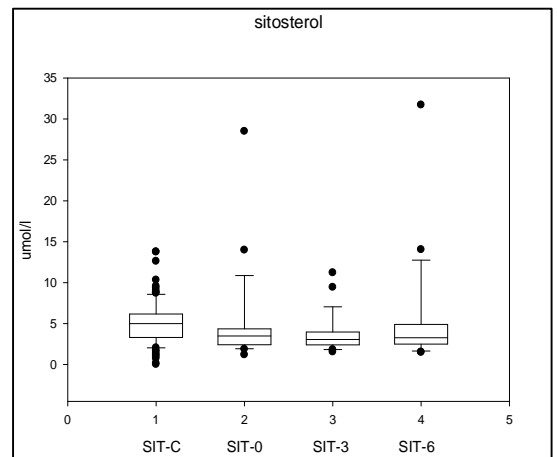
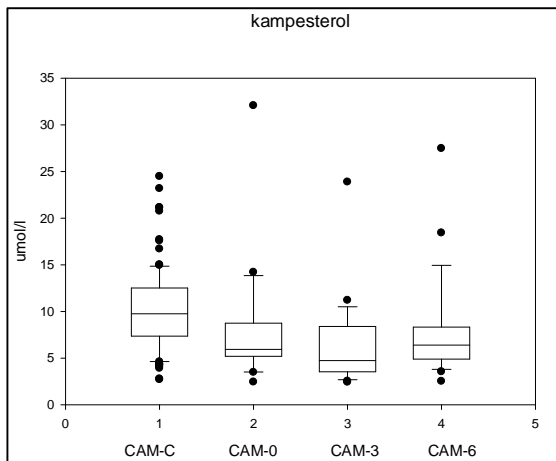
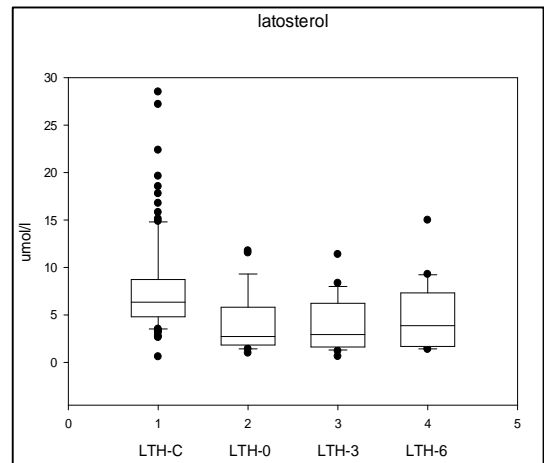
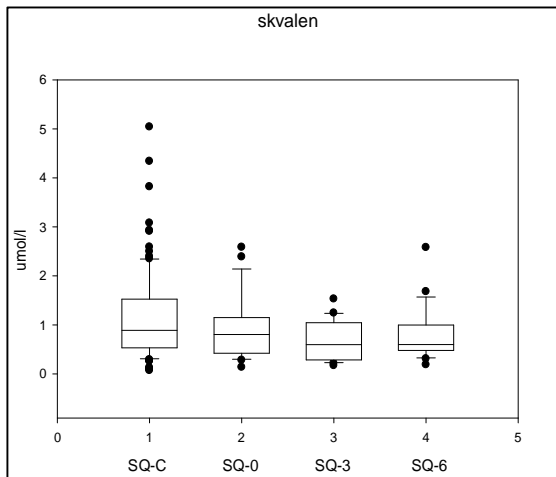
Tabulka 7. plasmatické koncentrace lipidů a sterolů u pacientů s krvácením do GITu (n=24)  
t-CH: celkový cholesterol, LDL-CH: LDL cholesterol, HDL-CH: HDL cholesterol, TAG: triacylglyceroly, SQ: skvalen, LTH: latosterol, SIT: sitosterol CAM: kampesterol,  
\*: statistická významnost  $p < 0,05$  (srovnání s kontrolní skupinou)  
\*\*: statistická významnost  $p < 0,001$  (srovnání s kontrolní skupinou)

Hladiny celkového cholesterolu byly při srovnání s kontrolní skupinou signifikantně nižší ( $p < 0,001$ ) a nejnižší hodnota byla naměřena při přijetí. Porovnání LDL a HDL cholesterolu mezi sebou objektivizovalo signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) pouze u LDL cholesterolu, pokud byly srovnány hodnoty při přijetí se dnem třetím. Plasmatické koncentrace triacylglycerolů nevykazovaly statisticky významné změny a během sledování byly ve fyziologickém rozmezí. Plasmatické koncentrace latosterolu ( $p < 0,001$ ), kampesterolu ( $p < 0,001$ ) a sitosterolu ( $p < 0,05$ ) byly porovnáním s kontrolní skupinou statisticky signifikantně sníženy. Pokles skvalenu byl významný pouze 3. den ( $p < 0,05$ ).

Spearmanův korelační koeficient neprokázal statisticky významné korelace mezi ukazateli lipidového metabolismu a nutričními markery (BMI, albumin, prealbumin) stejně jako spotřebou transfusních přípravků, hodnotami hemoglobinu a hematokritu.



Graf . 5. Box Plots : plasmatické koncentrace celkového, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerol b hem sledování u pacient s akutním krvácením do horního GITu (n=24). tCH: celkový cholesterol, LDL: LDL cholesterol, HDL: HDL cholesterol, TAG: triacylglyceroly; písmeno C za zkratkou: kontrolní skupina; íslo 0,3,6 za zkratkou: den od p íjetí.



Graf . 6. Box Plots : plasmatické koncentrace terol a jejich zm ny b hem sledování u pacient s akutním krvácením do horního GITu (n=24).  
 SQ: skvalen, LTH-latosterol, CAM: kampesterol, SIT: sitosterol;  
 písmeno C za zkratkou: kontrolní skupina; íslo 0,3,6 za zkratkou: den od p íjetí



## 6. Diskuze

První zmínky o metabolických změnách u akutně nemocných pacientů sahají až do první poloviny 20. století [158]. Během následujících desetiletí byla objevena celá řada nových souvislostí a zásadních poznatků, které ovlivnily přístup k tomuto typu nemocí, jejich projevy a staly se v duchu švedvidence based medicine základem tak zvaných doporučených postupů. Metabolismus lipidů z tohoto pohledu není výjimkou a zejména fenomén hypocholesterolemie, včetně jeho významu v predikci závažnosti onemocnění, je trvale a opakovaně diskutován [84-102,106-110,113,114,121,137,159].

Cílem naší práce bylo popsat eventuelní odchylky v lipidovém spektru u pacientů, kteří jsou přijímáni na jednotku intenzivní péče interního typu. Skladba nemocných je zde velmi nehomogenní a často vyfladuje mezioborový přístup. Současně je nutno připravit, že tento typ intenzivní péče mnohdy nedosahuje takových rozměrů jako na jednotkách ARO, kde jsou hospitalizováni pacienti s kritickými následky traumat, sepse či popálenin.

První projekt našeho výzkumu, který ve své následně diskutovaných souvislostí označujeme za projekt pilotní, byl proveden na souboru deseti dospělých pacientů s akutním interním onemocněním. Hodnotili jsme zde jednotlivé parametry lipidového metabolismu, včetně ukazatelů cholesterolové syntézy a absorpce. Jak se později ukázalo, v konkrétních podmínkách našeho pracoviště (metabolická JIP interní kliniky) se jednalo o velmi nesourodou skupinu akutních diagnóz z oblasti kardiologie, gastroenterologie, hepatologie, nefrologie nebo také třeba toxikologie (tabulka 2). Hlavní limitací projektu se tak stala jeho nehomogenita. Ta následně z pohledu metody zpracování dat způsobilá jeho hraniční hodnotitelnost a v konečném důsledku i publikovatelnost. Bylo obtížné najít společný jmenovatel pro interpretaci tak variabilní skupiny subjektů. Byli sledováni například mladí, jinak zdraví pacienti s akutními projevy nespecifických stěvních zánětů, stejně jako pacienti polymorbidní, vyvíjející v současnosti, u kterých se aktuálně vyvinulo jiné nové akutní onemocnění. Polymorbidita byla tedy dalším faktorem podporujícím tvrzení o nehomogenitě vyšetřovaných subjektů. Vždy u 44 pacientů (73%) byla detekována současná přítomnost více jak tří onemocnění, nepočítaje základní diagnózu. Podrobnější rozbor by ukázal, že u 10 pacientů (16%) byl diagnostikován diabetes melitus, u 19 pacientů (32%) u kterých z forem aterosklerózy, u 22 pacientů (36%) hypertenze, u 7 pacientů (11%) chronická renální insuficience a celkem u 21 pacientů (35%) další, jiné přidružené onemocnění (viz též charakteristika souboru, strana 28).

Dalším významným aspektem byla odlišná rychlost nástupu onemocnění. V nichž případech byla anamnéza úvodních symptomů několik týdnů (například nespecifické st evní záněty). Jindy několik hodin nebo dokonce přímo pacient přišel "z ulice" (například akutní kardio-pulmonální problémy). V těchto souvislostech bylo i použití univerzálních skórovacích systémů dubiozní. Navíc v těchto interních chorobách má svůj vlastní způsob hodnocení závažnosti.

V neposlední řadě byl našim pacientům poskytován odlišný koncept umělé výživy. V souladu s doporučením pro intenzivní péči [160] jsme sice nemocné živili především a hlavně enterální cestou, ale v nichž případech byla nutná výživa parenterální. V souladu s energetickou/metabolickou potřebou nemocných bylo navíc v nichž indikacích nutno sáhnout k podání tukových emulzí.

Z výše uvedených důvodů jsme nakonec došli k názoru, že všechny tyto nevýhody musíme konvertovat do jediné výhody, totiž jednoduchosti. Stanovili jsme si jako základní kritérium jen holý fakt, že se jedná o pacienta s jistou interní diagnózou a že bude žít pouze umělou výživou. Vyloučili jsme pak všechny nemocné, kteří tato dvě kritéria nesplňovali. Součástí nebyli za azování ti pacienti, u kterých byla velká pravděpodobnost, že podstoupí v nejbližších dnech chirurgický výkon, který by zásadně ovlivnil přirozený průběh interního onemocnění. Jednalo se například o pacienty s ileosními stavů nebo peritoneálními příznaky.

Navzdory všem výše uvedeným omezením lze konstatovat, že v uvedeném souboru nemocných byl detekován statisticky významný pokles celkového, HDL i LDL cholesterolu a rozvinula se tudíž hypocholesterolemie. Nejnižší hodnoty během týdenního sledování byly detekovány třetí den. Z hlediska hledání příčiny snížených plasmatických hladin cholesterolu lze uvažovat o mnoha faktorech. Hypocholesterolemie je v obecné rovině charakterizována jako výsledek nerovnováhy mezi nabídkou a poptávkou po cholesterolu s tím, že lidský organismus není schopen v kritické situaci pokrýt jeho potřebu [86]. Syntéza cholesterolu je energeticky velmi náročná a během kritického stavu logicky klesá [116]. Součástí je přitom jeho zvýšená spotřeba z důvodu intenzivních nároků na syntézu steroidních hormonů a dále pro obnovu poškozených tkání a orgánů. Hemodiluce [84,85], porucha funkce jater [84,93,119], malnutrice [118] a těsný vztah mezi poškozením metabolismu proteinů a lipidů [93,121-123] jsou další faktory, akceptované v rozvoji hypocholesterolemie. To vše je umocněno stresovým metabolismem s cytokinovou bouří v rámci systémové zánětlivé reakce (SIRS) [91,97,106-111,130-137]. Vliv SIRS na lipidový metabolismus je přitom dobře známý, protože byl především popsán prostřednictvím demonstrace účinku endotoxinu na zdravé dobrovolníky [91]. Navíc je nutno připomenout, že látky lipidové povahy nejen

reagují na SIRS, ale hrají také významnou roli v ochraně před jeho negativními dopady [138,139,142,143]. V souhrnu lze tedy říct, že kritický stav se SIRS vede k poklesu účinnosti protizánětlivého a imunomodulačního materiálu a současně se vytrácí schopnost tlumit spouště této reakce [149-155].

Předpokládáme, že v etiologii hypocholesterolemie u našeho souboru nemocných se ve větší míře uplatnily všechny z výše uvedených příčin. Byla přítomna malnutrice, kterou charakterizovaly průměrné hodnoty albuminu 28,7g/l (rozptyl min-max: 16,5-49,1g/l), prealbuminu 0,13g/l (0,03-0,26g/l) i absolutního počtu lymfocytů 1,09 (0,2-2,6). Zvýšená zánětlivá aktivita byla prezentována průměrnou plasmatickou koncentrací CRP 103mg/l, s rozptylem od normálních/negativních hodnot <10mg/l až po nejvyšší 317mg/l. Průměrná hodnota hematokritu byla 0,32 (0,17-0,46), což může svědčit pro možný vliv anémie. Na druhou stranu zkušený kliník pozná, že výše prezentované rozptyly hodnot jsou extrémní. Není tedy překvapivé, že z důvodů prezentovaných pochybností o homogenitě souboru a výše uvedených skutečností byl vyetovaný soubor hraničně únosný také pro publikovatelnost výsledků. To otevřeně poznáváme při v domě hlavního cíle postgraduálního studia.

Aby bylo hodnocení potencionálních příčin hypocholesterolemie komplexní, je nutno také zdraznit roli narušeného příjmu potravy. Věichni naši nemocní byli závislí na přísunu umělé výživy, protože perorální příjem kuchyňské stravy nebyl možný. Již v roce 2002 popsal Zadák et al. u takové skupiny pacientů významné změny v metabolismu cholesterolu, včetně poruchy procesu jeho syntézy [161]. Poukázal přitom na fakt, že umělá výživa, která je nemocným podávána, standardně cholesterol neobsahuje. Takže, a u našich pacientů byli fliveni enterálně nebo v indikovaných případech parenterálně, ve chvíli zastavení klasického perorálního příjmu se současně zastavil příjem cholesterolu. Lze tedy usuzovat, že v souladu s výše uvedeným se arteficiální výživa podílela na rozvoji hypocholesterolemie také v našem projektu. Rozsah tohoto vlivu je těžké hodnotit. Aktuálně si nejsem v domě, že by existovala validní data, která by tento vzájemný vliv přesněji kvantifikovala. Z literárních pramenů je totiž známo, že podání parenterální nutriční podpory může zvýšení hladin cholesterolu indukovat [124-127]. Autoři tento fakt vysvětlují pravděpodobným uvolněním cholesterolu z membrán červených krvinek a současně indukci syntézy cholesterolu adekvátním pokrytím nutričních potřeb v kritickém stavu. Ve výsledném hodnocení tedy proti sobě stojí fakta, že parenterální umělá výživa je příčinou hypocholesterolemie a současně vytváří příznivé podmínky pro její zvládnutí. Obdobné dilema vyvolává hodnocení účinnosti výživy enterální. Ta rovněž cholesterol standardně neobsahuje, ale po jejím podání byl rovněž zaznamenán

příznivý vliv na hypocholesterolemii. Je totiž schopna navodit zvýšení hladin HDL-cholesterolu a apoproteinu A-1 [129].

V každém případě je ale zřejmé, že odnutí kuchyňské stravy znamená zástavu přísunu cholesterolu. Otázka, jakým způsobem zajistit přísun cholesterolu nemocným, kteří nejsou schopni přijímat klasickou kuchyňskou stravu, zůstává stále otevřená. První podání lipidové emulze s cholesterolem bylo přitom popsáno již v roce 2003 [128]. Po její aplikaci došlo sice ke zlepšení utilizace tuků z podávané infuze, ale k ovlivnění hladin cholesterolu v plasmu nedošlo. Tato problematika by byla jistě hodna dalšího hlubšího studia.

Plasmatické hladiny triglyceridů během našeho sledování pokles cholesterolu prakticky kopírovaly. Tento průběh je ostatně popisován i literárně [93]. Pokles plasmatických koncentrací byl ale u našeho souboru detekován hned od prvního dne sledování, zatímco nejnižší hladiny cholesterolu byly až třetí den. Nicméně je známo, že TAG se v průběhu kritického stavu mohou chovat velmi rozmanitě. Důležitou se tak prostřednictvím mnoha vlivů. Hlavním je průvodní stresový metabolismus, kdy se hlavním metabolickým substrátem stává glukóza a dominuje glukoneogeneza. Oxidace mastných kyselin je neurohumorálně suprimována a část jejího poolu je zpětně re-esterifikována na TAG. Navíc je nutno počítat s vlivem hypoxie a cytokinové bouře, které tlumí aktivitu lipoproteinové lipázy [102], která je esenciální pro normální metabolismus lipoproteinů. Dalším významným faktorem je také vliv zejména parenterální nutriční podpory se zastoupením tukových emulzí [103-105]. Část našich pacientů přitom tento druh vlivy dostávala. Na jedné straně je tedy pravdou, že plasmatické hladiny TAG změny v koncentracích cholesterolu obvykle kopírují. Na stranu druhou je ale nutno uvést, že byly za řady kritických situací detekovány jejich koncentrace jak zvýšené [106,107], tak i snížené [91,108]. Z klinického pohledu pak nelze opomíjet nález perzistující hypocholesterolemie s hypertriglyceridemií, který často představuje alarmující ukazatele prohlubující se metabolické dysbalance a rizika zvýšené mortality [86,106,107,109-111]. Tento fenomén v práci ale pozorován nebyl.

Lidský organismus získává cholesterol dvěma způsoby: syntézou a absorpcí z potravy. Jednou z možností, jak tyto dva procesy kvantifikovat, je stanovení hladin latosterolu a skvalenu (ukazatelé syntézy) a/nebo fytosterolů: sitosterolu a kampesterolu (ukazatelé absorpce) [26]. Odborných prací, které studují podrobně změny na úrovni procesů získávání cholesterolu v lidském organismu je relativně málo. Velká pozornost je samozřejmě věnována zejména fytosterolům, které mají prokázaný pozitivní vliv na hypercholesterolemii [69-79] a představují neoddělitelnou součást její léčby. Pokud se ale budeme pohybovat v oblasti akutní medicíny, pak jsou spíše sporadické, včetně pokusů o posouzení vlivu stupně závažnosti

onemocnění na cholesterolovou syntézu [137]. Navíc jsou tato sdělení v drtivé většině případů v nově nastaveném nejstabilnějším stavu, jako jsou polytraumata a závažné pooperační stavy. Naše práce proto chtěla obohatit stávající informace z takové oblasti akutní medicíny, která nedosahuje tak významného stupně závažnosti. Na jednotce intenzivní péče interního typu.

Na základě získaných výsledků lze, prostřednictvím signifikantního poklesu hladiny cholesterolu, který představuje nejvýznamnější marker syntézy [56] tvrdit, že během akutního stavu byla cholesterolová syntéza v naší práci suprimována. Plasmatické koncentrace cholesterolu byly rovněž jako u celkového, LDL a HDL cholesterolu nejnižší těle a dynamika změny byla tudíž identická. Hladiny skvalenu byly naopak během sledování zvýšené. Skvalen je druhým ukazatelem, opakovaně zmínovaným také v české odborné literatuře. V práci Bakaláře et al. se uvádí, že pacienti po závažném traumatu mají hladiny skvalenu snižené [116]. Autor to dává do souvislosti s alterací cholesterolové syntézy. Nicméně pokles koncentrací nebyl v jeho práci statisticky významný. Autoři souasně rozvíjejí teorii, že místem, kde dochází k blokáde syntézy cholesterolu, je pravděpodobně skvalensyntetáza. My jsme během sledování detekovali naopak hladiny zvýšené. Výsvětlení nalézáme ve skutečnosti, že skvalen se v organismu nachází ve více počlech. To umožní jeho uvolnění během stresové reakce zejména z tukových zásob [51,52]. Tím se stává ukazatelem s nízkou mírou spolehlivosti. Navíc lze spekulovat také o závislosti jeho hladiny na rychlosti nástupu akutního stavu. Proto se od jeho používání při hodnocení syntézy v poslední době ustupuje.

Změny v cholesterolové absorpci byly u našeho souboru pacientů charakterizovány poklesem plasmatických hladin obou sledovaných fytoosterolů, tedy známkami narušení tohoto procesu. Zejména u kampesterolu byl pokles signifikantně významný, protože s absorpcí lépe koreluje a není v takové míře ovlivněn dávkou fytoosterolů v umělé výživě. Přípravky umělé výživy, které jsou pacientům standardně podávány, totiž fytoosteroly běžně obsahují, protože jejich výroba jsou používány rostlinné oleje [162]. Jejich průchod do organismu tak ve finále může být značně vysoký. Týká se to přitom jak přípravků enterální výživy, tak parenterálních tukových emulzí s tím, že nejčastěji zastoupeným fytoosterolem bývá sitosterol. Jeho hladiny, naměřené v naší studii, tak mohly být ovlivněny/navýšeny právě jeho průchodem v arteficiální výživě. Tímto způsobem lze vysvětlit méně výrazný pokles u této druhé sledované veličiny, který nedosáhl signifikantní úrovně. Umělá výživa má tedy z pohledu naší práce dva významné negativní atributy. Zaprvé není schopna dodat organismu cholesterol, protože ho neobsahuje. Zadruhé je přímou zvýšenou dávkou fytoosterolů do lidského organismu se všemi negativními vlivy na jeho metabolismus, jak je zmínováno v úvodní kapitole [80-82]. Na

druhou stranu v fládném p ípad nechceme vytvá et pochyby o zcela zásadním, esenciálním významu arteficiální výflivy v pé i o kriticky nemocné. Spí-e se nabízí úvaha, zda znovu neoffivit pon kud zapomenuté experimentální práce s výflivou, která byla o cholesterol obohacená [128].

Ve druhé fázi na-eho projektu (podporován grantem IGA MZ NR/7854-3.) jsme se v novali studiu zm n lipidového metabolismu na souboru 24 pacient s aktivní Crohnovou chorobou (CD). Jedná se o chronické zán tlivé onemocn ní zaflivacího traktu nejasné p íny, a tudífl bez možnosti kauzální terapie [163]. Mezi hlavní klinické projevy onemocn ní pat í rozmanité typy dyspepsie, bolesti b ichta, zán tlivými mediátory indukovaná anorexie, hubnutí a rozvoj metabolických abnormalit [164-167]. Pr m rný váhový úbytek dosahoval v na-em souboru hodnoty 6,7kg (nejv t-í 12kg/3m síce). Krom anorexie jsou p íinou -patného nutri ního stavu také snížená absorpce metabolit v zán tem po-kozeném st ev , zvý-ené st evní ztráty a vysoká energetická náro nost zán tlivého onemocn ní. Výfliv a obecn stravovacím návyk m je proto v nována velká pozornost. První oblastí zájmu je pr zkum složení p íjímané potravy a jejího potencionálního vlivu na vznik a pr b h onemocn ní, v etn vlivu tukových komponent [168]. B hem procesu trávení totiíl dochází k významné interakci mezi lipoproteiny a lymfocyty v prost edí st evního lymfatického systému (GALT) st evní mukózy [169]. P edpokládá se, fle tato reakce m fle být za ur itých podmínek negativn ovlivn na a to zejména látkami lipidové povahy. Dokazuje to skute nost, fle vysoký p ísun mastných kyselin s dlouhým et zcem v enterální výfliv zhor-uje její p íznivý efekt na pr b h CD [170]. Na druhou stranu byl popsán pozitivní ú inek  $\omega$ -3 polynesaturovaných mastných kyselin (a tím i rybího oleje), který je zprost edkován protizán tlivým p sobením prostaglandinu PGE<sub>3</sub> a leukotrienu LTB<sub>5</sub> [171,172].

Druhou oblastí studia je detekce vlivu výflivy na pr b h akutního, aktivního stádia choroby. D íve publikované práce prokázaly jednozna n p íznivý vliv enterální výflivy nejen na malnutrici, ale také na indukci a udržení následné remise onemocn ní [173]. Naopak totální parenterální výfliva s tak zvaným st evním klidem u nemocných s nespecifickými st evními zán ty nemá prokazatelné výhody v dosaflení remise i ovlivn ní nutnosti chirurgické intervence. Vy azení gastrointestinálního traktu z pasáfle není proto ve vztahu k docílení remise u Crohnovy choroby nezbytné [174]. V souladu s t mito poznatky pat í aplikace um lé výflivy k základním opat ením v rámci primární terapie CD. Nahrazením kuchy ské stravy um lou se totiíl sniíuje antigenní zát fl lymfatického systému st eva [175] a spole n s podáváním jífl zmi ovaných -3 polynesaturovaných mastných kyselin se tak

enterální výživa stává efektivním prostředkem potlačení zátlivé reakce [172,176]. V-ichni na-i pacienti proto nedostávali kuchy skou stravu a byli fliveni p ípravky um lé definované enterální výživy ve snaze zlep-ít nutri ní stav nemocných, upravit eventueln poru-ený proces st evní digesce [177] a p ízniv ovlivnit pr b h nemoci [168,178-180]. Význam enterální výživy je ostatn diskutován na poli celé oblasti intenzivní medicíny. Je totiž známo, že udržení normální funkce st eva asnou enterální výživou snižuje septické i neseptické komplikace, zkracuje délku hospitalizace, zlep-uje dusíkovou bilanci, hojení ran, posiluje st evní slizni ní bariéru a imunitní funkce [181] V-echny tyto aspekty p ítom hrají v patogenezi Crohnovy choroby velmi podstatnou úlohu.

U pacient ů s CD byly již v minulosti popsány zm ny v metabolismu lipid ů [182,183], mastných kyselin [184-187] i v antioxida ní ochran ě [188], která je s lipidy úzce spjata. Geerling et al. jako jeden z prvních v roce 1999 popsal na dosp ělých pacientech s CD alteraci profilu mastných kyselin [184]. Vzhledem k tomu, že tyto zm ny byly vyvinuty zejména u nemocných s dlouhodobou anamnézou onemocn ění, rozvíjí teorii o významu délky trvání choroby s významným podílem malnutrice a kortikoterapie. Zm ny v profilu mastných kyselin dává do souvislosti se zm nami aktivity desatura ní a elonga ní enzym ů, které m ě mohou potencovat nedostatek zinku. V dal-í své práci prezentuje nálezy, sv ěd ící pro sou asné snížení antioxida ní ochrany v akutním stádiu CD[188]. Oxidativní stres totiž m ě negativn ovliv ůvat profil mastných kyselin, zejména svou interakcí s polynesaturovanými mastnými kyselinami. Sv ě tvrzení pak podpo il v roce 2000, kdyfl objektivizoval, že suplementace antioxidant ů a -3 mastných kyselin zlep-uje profil MK u pacient ů s CD v remisi [185]. Rovn ě práce u pediatrických pacient ů popisují spojitost CD se zm nami sérových hladin lipid ů, lipoprotein ů a deficitem ve spektru zejména polynesaturovaných -3 a -6 mastných kyselin [183]. Sou asn ě je poukazováno na souvislost mezi nízkou hodnotou body-mass indexu (BMI), vysokou aktivitou onemocn ění a zm nou profilu esenciálních mastných kyselin a jejich derivát ů [186]. Deplece poly-nesaturovaných mastných kyselin je dávána do souvislosti s jejich sníženým p íjmem a zvý-enou spot ebou pro reparaci po-kozených tkání v etn ě jejich konverze na eikosanoidy. Tyto záv ry byly do jisté míry potvrzeny pozd ěji a sou asn ě bylo objektivizováno, že snaha o ovlivn ění pom ru mezi -3 a -6 PUFA podáváním rybího oleje m ě vést k supresi hladiny arachidonové kyseliny [185]. Zm ny ve spektru MK u d ětských pacient ů jsou navíc spojeny s riziky retardace r ůstu [189].

V souboru na-ích pacient ů byly zachyceny nízké hladiny celkového cholesterolu, LDL i HDL cholesterolu, p í emfl poklesy byly statisticky významné. Tyto hodnoty byly nejnižší na za átku sledování s postupnou tendencí k normalizaci. P í in tohoto stavu je mnoho a byly

již nastínily v dřívejších odstavcích. Malnutrice, porucha digesce i absorpce, vysoká energetická náročnost cholesterolové syntézy a/nebo nedostatečný přísun cholesterolu v přijímané umělé výživě mohly hrát svoji roli. Nelze samozřejmě opomíjet ani vliv systémové zánětlivé reakce během aktivní fáze CD. Pozitivní korelace mezi změnami lipidového spektra a zánětlivou aktivitou je přítomná u pacientů s CD známa [190]. Stejně jako vzájemný reverzní vztah zvýšených hladin cytokinů na hladinu cholesterolu [86,97,137]. Nicméně my jsme jednoznačně, signifikantní vztah mezi ukazateli závažnosti a zánětu, hodnocených prostřednictvím hodnot CDAI (Crohn disease activity index) a CRP (C-reaktivní protein) a změnami v cholesterolovém metabolismu, neprokázali. Obdobné výsledky byly při porovnání nutričních markerů (albumin a prealbumin). Vysvětlením by mohl být malý vyšetřovaný soubor nemocných.

Sérové koncentrace triglyceridů měly podobnou dynamiku, což koresponduje s již proklamovaným tvrzením, že TAG obvykle kopírují změny v metabolismu cholesterolu [93]. Negativní vliv parenterální nutriční podpory byl ve studii eliminován izolovanou aplikací enterální výživy. V případě potřeby výživy parenterální, tato neobsahovala žádné tukové emulze. Výsledky a jejich dynamika tedy ukazují, že v akutním stádiu CD je metabolismus lipidů významně alterován a změny sledovaných parametrů odrážejí postupný proces stabilizace nemocných s paralelní restitucí poškozených tkání a orgánů v návaznosti na poskytovanou komplexní intenzivní terapii.

Cílem tohoto našeho projektu byla nejenom prostá snaha determinovat fenomén hypocholesterolemie u pacientů v aktivní fázi Crohnovy choroby, ale blíž charakterizovat eventuelní změny na úrovni jeho intermediárního metabolismu. Přesněji řečeno, zhodnotit změny v syntéze a absorpci cholesterolu, které představují základní dva mechanismy jeho získávání v lidském organismu [26]. I když prací, které hodnotí metabolismus lipidů u rozmanitých onemocnění je mnoho, změnám v procesu cholesterolové absorpce/syntézy se věnují jen sporadicky. V problematice Crohnovy choroby je pak podle dostupných informací tato práce první svého druhu.

Plasmatické koncentrace cholesterolu byly v naší studii statisticky významně sníženy ve srovnání s kontrolní skupinou. Přitom kopírovaly dynamiku změn cholesterolu. Lze tedy odvozovat, že u pacientů s aktivní CD dochází k významné alteraci procesu syntézy, nebo tento prekursor tvorby cholesterolu je jejím zásadním markerem [56]. Sérové hladiny dalšího prekursoru cholesterolové syntézy skvalenu byly u našich sledovaných subjektů naopak zvýšené. Komentář k tomuto nálezu byl již uinová, v etně zdrazně jeho diurnálního kolísání a uvolnění z tukových zásob [51,52]. V návaznosti na naše výsledky a dříve



publikovaná data, která detekovala hladiny skvalenu u pacientů s polytraumaty snižené [88], se domníváme, že významnou roli v této variabilitě hraje rychlost nástupu onemocnění. Čím je pomalejší, pozvolnější nástup nemoci, tím více se zvyšuje pravděpodobnost záchytu zvýšených hladin skvalenu z důvodu jeho uvolnění z tukového depa.

Plasmatické koncentrace fytoosterolů, marker cholesterolové absorpce z potravy, byly v naší studii rovněž snižené. Markantní je to zejména u hladin kampesterolu, kde byla detekována statisticky významná odchylka oproti kontrolní skupině. Během prvních 14 dnů sledování byli všichni pacienti živieni pouze definovaným přípravkem enterální výživy. Ten neobsahoval žádný cholesterol a ve 100g bylo obsaženo 0,8g živočišných a 1,7g rostlinných tuků. Pokud byla nezbytná parenterální nutriční podpora z důvodu snížené tolerance výživy enterální, pak nebyly podávány žádné tukové emulze. Vzestup hladiny fytoosterolů na konci sledování bylo logickým vyústěním obnovení perorálního příjmu ve formě kuchyňské stravy. V souladu s již dříve uvedeným platí, že koncentrace fytoosterolů v séru jsou závislé na jejich vstřebávání ve střevě a/nebo arteficiálním zejména parenterálním přísunem [81]. Poté, co jsme v úvodní fázi projektu eliminovali druhý jmenovaný faktor na minimum, lze tedy odvodit, že u našich pacientů s aktivní formou CD došlo k alteraci jak procesu syntézy, tak absorpce a že se na rozvoji hypocholesterolemie podílely oba zmínované mechanismy.

Ve této fázi výzkumu jsme se snažili během týdenního sledování determinovat změny v metabolismu lipidů u dvaceti čtyř dospělých pacientů s akutním krvácením do horního zažívacího traktu (GITu), které představuje závažný stav spojený s vysokou morbiditou i mortalitou [191]. Incidence se pohybuje kolem 100 případů na 100000 obyvatel a mortalita je udávána kolem 6-10%. Tato variabilita je dána výskytem přidružených negativních faktorů, jako jsou věk, komorbidita, chronická medikace nebo velikost samotné krevní ztráty [192,193]. Zejména varikózní krvácení, které se vyskytlo v našem souboru u pěti subjektů s jaterní cirhózou, je obvykle spojeno s velkými krevními ztrátami a pochopitelně vyšší mortalitou [194]. Paralelně je průběh u těchto pacientů komplikován i dalšími zhoršenými stavy: nutrice, poruchami koagulace i encefalopatií. To ostatně dokazovaly i naše výsledky, kdy při potěbě transfusí a souasně vyšší nutriční markery byly detekovány u pacientů s jaterním postižením. Přivzdáváme si domněnku, že chronické onemocnění jater může významně ovlivnit jejich syntetické funkce, jsme se snažili, aby byl tento vliv pokud možno co nejvíce minimalizován. Nebyli žádní pacienti se známou cirhózou, a pokud bylo jaterní onemocnění diagnostikováno až po zazení, pokračovali jen nemocní klasifikovaní jako

Child-Pough A. Navíc, statistické porovnání skupiny s cirhózou (n=6) a bez ní (n=18) bylo nevýznamné (Tabulka 4).

Z našich výsledků, týkajících se lipidového profilu vyplývá, že zatímco hladiny triglyceridů byly více méně konstantní, koncentrace celkového, LDL i HDL cholesterolu byly v průběhu 14denního sledování sníženy. V případě celkového cholesterolu signifikantně. Jako první vysvětlení příčiny tohoto stavu se nabízí efekt hemodiluce [84,85]. Bakalář et al. jako první upozornil na zajímavé souvislosti mezi změnami v krevním obraze a cholesterolovým metabolismem u pacientů po polytraumatu [195]. Později potvrdil na stejném typu nemocných svou teorii, že změny v cholesterolové syntéze nelze pokles koncentrací cholesterolu vysvětlit pouze prostou hemodilucí [88]. Průměrná hodnota hematokritu u našeho souboru nemocných byla 0,25 a hemoglobinu 81,4g/l, tedy hluboko subnormální. Hemodiluce tedy určitě hraje svoji roli. Na druhou stranu korelace mezi změnami v metabolismu lipidů a hladinami hemoglobinu, hematokritu i spotřebou transfusních přípravků nepřednesly signifikantní výsledky. Důvodem však mohl být malý vyšetřovaný soubor a také neznalost standardních hodnot krevního obrazu před přijetím, což by umocnilo přesnější určení krevní ztráty. Navíc je nutno poznamenat, že některé vstupní hodnoty hematokritu byly sníženy jen málo výrazně. Teprve až následná objemová infuzní resuscitace objektivizovala/způsobila skutečný pokles tohoto parametru. Indikace ke krevnímu převodu pak logicky vznikla až na základě kontrolního krevního odběru.

Abychom dále podpořili předchozí tvrzení, že hemodiluce není jedinou příčinou hypocholesterolemie, sledovali jsme cholesterolový metabolismus podrobně v procesech jeho získávání. Statisticky významný pokles hladin cholesterolu a skvalenu u našich pacientů svědčí pro alteraci cholesterolové syntézy a potvrzuje se tím její podíl na výsledné hypocholesterolemii. Komentář k významu cholesterolu a skvalenu již není nutno opakovat, včetně faktorů, které ovlivňují komplikovanou interpretaci druhého ze jmenovaných. Co je však z pohledu této práce u skvalenu opět hodno pověimnutí je skutečnost, že srovnání výsledků nemocných s CD (zvýšené hladiny) a s krvácením (snížené hladiny) posiluje naše předchozí tvrzení, že koncentrace skvalenu jsou významně ovlivněny rychlostí nástupu onemocnění.

Plasmatické koncentrace fytoosterolů byly v této studii rovněž sníženy. To jistě není překvapivé, protože nemocní měli tedy zastavený perorální příjem a živiny byli jen parenterálně roztoky aminokyselin a glukózy. Na druhou stranu neobjevaným zjištěním byl předpokládaný pokles i po obnovení perorálního příjmu kuchyňské stravy (9500kJ, 80g protein, 40g tuku, 380g sacharidů na den). Zdá se, že příjem stravy po stabilizaci by mohl

být n jakým zp sobem omezen, nap íklad v d sledku b i-ního dyskomfortu i anorexie, která limituje kvantitu i kvalitu p íjaté stravy. Nicmén k bliíímu objasn ní i potvrzení této hypotézy bude nutno provést dal-í studie na v t-ím po tu respondent .

Jak jifl bylo nazna eno, významnou limitací tohoto výzkumného projektu byl fakt, fle se ho ú astnili pacienti s jaterní cirhózou. O na-ích snahách minimalizovat tento vliv jsme se jifl zmi ovali. Sou asn je nutno podotknout, fle cíle studie byly mimo jiné zam eny na posouzení dynamiky zm n. Je to v souladu s názory, fle na pokles plasmatických koncentrací cholesterolu se nelze dívat stacionárn . Také u pacient s jaterními chorobami totiž dochází k prohloubení hypocholesterolémie a v návaznosti na stabilizaci stavu se hladiny vracejí k p vodním hodnotám [84,86]. Proto se tato studie, sledující zm ny lipid u pacient s akutním krvácením do GITu dále roz-í uje a probíhá sb r dal-ích dat. Cílem je je-t více zkvalitnit finální výsledek a podrobn ji oz ejmit nov se objevující fakta, v etn podrobn j-ího porovnání dynamiky zm n u pacient s cirhosou a bez ní.

V souhrnu vý-e uvedených skute ností lze tedy diskuzi uzav ít tvrzením, fle u pacient s akutním interním onemocn ním byla prokázána porucha metabolismu lipid a fle tato problematika v sob skrývá spoustu dal-ích otev ených problém . V tomto duchu v-ak bude pot eba provést dal-í podrobn j-í studie.

## 7. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, zda jsou změny v metabolismu lipidů přítomny také u akutních onemocnění interní povahy. Hlavním důvodem naší snahy blíže pochopit a popsat tyto abnormality byla skutečnost, že jsou v literatuře popisovány hlavně u těchto nejtěžších kritických stavů. Naopak v oblasti vnitřního lékařství jim není věnována taková pozornost, jakou by si zasloužily. Výsledky i metodologické aspekty výzkumu ukázaly zajímavé souvislosti, které jsou prezentovány v krátkém přehledu.

1. U nemocných s akutním interním onemocněním byla detekována významná hypocholesterolemie a hladiny triglyceridů kopírovaly dynamiku cholesterolu.

2. Pokles plasmatických hladin cholesterolu během akutního stavu je složitý multifaktoriální děj a v současné době nelze jednoznačně určit jeho jedinou hlavní příčinu.

V těchto etiologických souvislostech bylo v naší práci objektivizováno následující:

a) byla přítomna alterace cholesterolové syntézy

b) byla přítomna alterace cholesterolové absorpce

c) nebyla prokázána korelace těchto změn s ukazateli zátlaku, malnutrice a krevních ztrát, které jsou uznávanými faktory v rozvoji hypocholesterolemie.

3. U pacientů v akutním stádiu Crohnovy choroby je metabolismus lipidů významně alterován. Změny lipidového metabolismu u pacientů s aktivní Crohnovou chorobou zahrnují statisticky významné nízké hladiny celkového cholesterolu, LDL i HDL cholesterolu, s postupnou tendencí k normalizaci. Sledované parametry odrážejí postupný proces stabilizace nemocných s paralelní restitucí poškozených tkání a orgánů v návaznosti na poskytovanou komplexní intenzivní terapii.

4. Prioritou v problematice metabolismu cholesterolu u akutní Crohnovy choroby je zejména zjistit, že dochází k významné alteraci procesu syntézy cholesterolu. Příčiny tohoto stavu jsou komplexní: malnutrice, porucha digesce i absorpce, vysoká energetická náročnost cholesterolové syntézy a/nebo nedostatečný přísun cholesterolu v přijímaném léčivém a vliv systémové zátlakové reakce.

5. Kromě alterace procesu syntézy cholesterolu dochází u pacientů s aktivní Crohnovou chorobou také ke snížení absorpce cholesterolu. Proto lze konstatovat, že se na rozvoji hypocholesterolemie podílejí u této skupiny pacientů oba zmíněné mechanismy.

6. U pacientů s akutním krvácením do horního zažívacího traktu jsou hladiny triglyceridů více méně konstantní, zatímco koncentrace celkového, LDL i HDL cholesterolu jsou sníženy. Pokles koncentrací cholesterolu nelze vysvětlit pouze prostou hemodilucí. Významný pokles hladin cholesterolu a skvalenu svědčí pro alteraci cholesterolové syntézy a potvrzuje se tím její podíl na výsledné hypocholesterolemii.

7. Rozdílné koncentrace cholesterolu a skvalenu u nemocných s Crohnovou chorobou (zvýšené hladiny) a s krvácením do GIT (snížené hladiny) posiluje naše tvrzení, že tyto metabolity jsou významně ovlivňovány rychlostí nástupu onemocnění. Čím je pomalejší, pozvolnější nástup nemoci, tím více se zvyšuje pravděpodobnost zachytu zvýšených hladin skvalenu z důvodu jeho vyplavení z tukového depotu.

8. Skvalen není přesným markerem cholesterolové syntézy z důvodu (mimo jiné) kolísání hladin v závislosti na časovém odstupu od vyvolávajícího inzultu. Skvalen se totiž během akutní stresové reakce uvolňuje z tukových zásob, čímž se stává ukazatelem s nízkou mírou spolehlivosti a navíc závislým na rychlosti nástupu akutního stavu. Proto se od jeho používání při hodnocení syntézy v poslední době ustupuje.

9. Dostupné přípravky umělé výživy – jak enterální výživa, tak parenterální tukové emulze – které jsou pacientům standardně podávány, neobsahují žádný cholesterol, naopak však obsahují fytoosteroly. Pacienti, kteří nemají jiný zdroj příjmu vládních lipidů, jsou proto na jedné straně v riziku prohloubení hypocholesterolemie, na druhé straně je zatíženi dobrou dobou dodávka fytoosterolů, které mají při dlouhodobém podávání neřídící účinky.

10. Práce obohatila informace o metabolických změnách u pacientů s akutním interním onemocněním. Cholesterol ve vnitřním lékařství nelze vnímat pouze jako rizikový faktor aterosklerózy, ale také jako ukazatel závažnosti onemocnění se schopností determinovat prognózu. Naše publikační aktivita byla tímto směrem cílená.

11. V širokém kontextu změn metabolismu lipidů v akutní fázi onemocnění se nabízí úvaha, zda by problematice obohacování umělé výživy o cholesterol neměla být věnována větší pozornost při vývoji budoucích formulí parenterální a enterální výživy. Zda lze považovat cholesterol za podmíněně esenciální nutriente zůstává nadále otevřeným problémem. Závěry naší práce a literární údaje podporují fakt, že suplementace cholesterolem při závažném akutním onemocnění může být prospěšná, zejména u rizikových, polymorbidních nebo malnutričních pacientů.

## 8. Literatura

1. Miner JL. The adipocyte as an endocrine cell. *J Anim Sci* 2004; 82: 935-941.
2. Brennan AM, Mantzoros CS. Leptin and adiponectin: their role in diabetes *Curr Diab Rep* 2007; 7:1-2.
3. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M, et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271: 518-520.
4. 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: 1717-1726.
5. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000; 289: 1524-1529.
6. Stein O, Thiery J, Stein Y. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2002; 160:1-10.
7. Davis HR Jr, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 679-683
8. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303: 1201-1204.
9. Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, 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: 33586-33592.
10. 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: 2725-2735.
11. Poulsen, LC, Siersbæk M, Mandrup S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23: 631- 639.
12. Levy E, Spahis S, Sinnott D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, et al. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipid* 2007; 18: 310-318

13. Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Coméra C, et al. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR\_BI. *J Biol Chem* 2006; 281: 7214-7219
14. Nauli AM, Nassir F, Zheng J, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, et al. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 2006; 131: 1197-1207
15. Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Pfenninger A, Frick W, Jähne G, et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimide in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem* 2005; 280: 1306-1320.
16. Duval, C., et al., Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 1259-1263.
17. Fedorow H, Pickford R, Hook JM, Double KL, et al. Dolichol is the major lipid component of human substantia nigra neuromelanin. *J Neurochem* 2005; 92: 9906995.
18. 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: 1125-1131.
19. Rawson RB. The SREBP pathway - insight from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 631-640.
20. Kuipers F, Stroeve JH, Caron S, Staels B. Bile acids, farnesoid X receptor, atherosclerosis and metabolic control. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18:289-297.
21. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms *J Hepatol* 2004; 40:539-551.
22. Avigan, J, Steinberg, D. Sterol and bile acid excretion in man and the effects of dietary fat. *J Clin Invest* 1965; 44:1845-1856.
23. DiBuono M, Jones PHJ, Beaumier L, Wykes LJ. Comparison of deuterium incorporation and mass isotopomer distribution analysis for measurement of human cholesterol biosynthesis *J Lip Res* 2000; 41: 1516-1523.
24. Parker TS, McNamara DJ, Brown CD, Kolb R, Ahrens EH Jr, Alberts AW, et al. Plasma mevalonate as a measure of cholesterol synthesis in man. *J Clin Invest* 1984; 74:795-804.
25. Hypler R, Crhová<sup>TM</sup> Gaspari J, Zadák Z, ífková M, Balasová V. Determination of isoprene in human expired breath using solid phase microextraction and gas chromatography ó mass spectrometry, *J Chromatogr B* 2000; 739: 183-190.
26. Kuksis A. Plasma non-cholesterol sterols. *J Chromatogr* 2001; 935: 203-236.
27. Pfohl M, Naoumova RP, Kim KD, Thompson GR. Use of cholesterol precursors to assess changes in cholesterol synthesis under nonsteady-state conditions. *Eur J Clin Ivestig* 1998; 28: 491-496.



28. Miettinen TA. Diurnal variation of cholesterol precursors squalene and methyl sterols in human plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1982; 23: 466-473.
29. Beylot M. Use of stable isotopes to evaluate the functional effects of nutrients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 734-739.
30. Stellard F. Use of dual isotope tracer in biomedical research. *Isotopes Environ Health Stud* 2005; 41:275-286.
31. Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutrition* 1986; 43: 92-97.
32. Tong L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:1784-803.
33. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; 428:569-574.
34. Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2006; 281:32207-32216.
35. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9116-9121.
36. Jazurek M, Dobrzy P, Dobrzy A. Regulation of gene expression by long-chain fatty acids. *Postepy Biochem.* 2008;54:242-250.
37. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007; 282:743-751.
38. Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res* 2003; 43: 1585-1594.
39. Grimsey N, Han GS, O'Hara L, Rochford JJ et al. Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J Biol Chem* 2008; 283:29166-29174.
40. Reue K, Brindley DN. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J Lipid Res* 2008; 49:2493-2503.
41. Donkor J, Sparks LM, Xie H, Smith SR, Reue K. Adipose tissue lipin-1 expression is correlated with peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression and insulin sensitivity in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:233-239.
42. Yamagishi K, Iso H, Date C, Fukui M, 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; 52:988-996.

43. Singer P, Shapiro H, Theilla M, Anbar R et al. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Int Care Med* 2008; 34:1580-1592.

44. Das UN. Perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids, immune response and adult diseases. *Med Sci Monit* 2004; 10: 19-25.

45. Weaver KL, Ivester P, Seeds M, Case LD et al. Effect of dietary fatty acids on inflammatory gene expression in healthy humans. *J Biol Chem* 2009; 284:15400-15407.

46. Warodomwicht D, Arnett DK, Kabagambe EK, Tsai MY, Hixson JE, et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effect of TCF7L2 gene variants on postprandial lipemia. *J Nutr* 2009; 139:439-446.

47. Vance DE, Van den Bosch H. Cholesterol in the year. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1529:1-8.

48. Vecka M, fiák A, Tvrzická E. Noncholesterol sterols. *Acta Univ Carol Med Monogr CLIV*, Carolinum Press, Praha 2008:101 stran, ISBN 978-80-246-1530-1

49. Kim JH, Lee JN, Paik YK. Cholesterol biosynthesis from lanosterol. A concerted role for Sp 1 and NF-Y-binding sites for sterol-mediated regulation of rat 7-dehydrocholesterol reductase gene expression. *J Biol Chem*. 2001; 276: 18153-18160.

50. Keller B, Ohnesorg T, Mindnich R, Gloeckner CJ et al. Interspecies comparison of gene structure and computational analysis of gene regulation of 17 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248:168-171.

51. Liu GCK, Ahrens EH, Schreiberman PH, Crouse JR. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application. *J Lipid Res* 1976; 17: 38-45.

52. Saudek ChD, Frier BM, Liu GCK. Plasma squalene: Lipoprotein distribution and kinetic analysis. *J Lipid Res* 1978;19:827-835.

53. Moghadasian MH Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008; 48: 4026410.

54. Nair GM, Connolly SJ. Should patients with cardiovascular disease take fish oil? *CMAJ* 2008; 178: 1816182.

55. Berquin IM, Min Y, Wu R et al. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J Clin Invest* 2007; 117: 186661875.

56. Bjorkhem I, Miettinen TA, Reihner E, et al. Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG- CoA reductase in human liver. *J Lipid Res* 1987; 28:1137-1143.
57. Axelson M, Angelin B, Hillebrant CG, Reihner E et al. The level of 7-dehydrocholesterol in plasma reflects the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the human liver. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1394: 153-157.
58. Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thøgersen H et al. Chemical structure of sterol that activate oocyte meiosis. *Nature* 1995; 374: 559-562.
59. Kallio MJ, Siimes MA, Perheentupa J, Salmenpera L et al. Cholesterol and its precursors in human milk during prolonged exclusive breast feeding. *A J Clin Nutr* 1989; 50: 782-785.
60. Igel M, Giesa U, Lütjohann D, von Bergmann K. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols and stanols in mice. *J Lipid Res* 2003; 44: 533-538.
61. Seyma Y. Cholestanol metabolism, molecular pathology and nutritional implications. *J Med Food* 2003; 6: 217-224.
62. Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 939-966.
63. Schrick L, Fujioka S, Takatsuto S, Stierhof YD et al. A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and the cellulose in *Aribidopsis*. *Plant J* 2004; 38: 227-243.
64. Moreau RA, Hicks KB. The in vitro hydrolysis of phytosterol conjugates in food matrices by mammalian digestive enzymes. *Lipids* 2004; 39: 769-776.
65. 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: 302-308.
66. Normén L, Dutta P, Lia Å, Andersson H. Soy sitosterol esters and  $\beta$ -sitostanol ester as inhibitors of cholesterol in human small bowel. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:9008-9013.
67. Hendriks HFJ, Westrate JA, vanVliet T, Meijer GW. Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 319-327.
68. Plat J, Mensink RP. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *FASEB J* 2002; 16: 1248-1253
69. Ostlund RE, Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids* 2007; 42: 41-45
70. Miettinen TA, Gylling H. Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr Opin Lipidol* 1998; 10: 9-14.

71. Clifton P. Lowering cholesterol - a review on the role of plant sterols. *Austral Family Phys* 2009; 38: 218-221.
72. Vecka M, fiák A, Tvrzická E. Phytosterols as a functional food. *Cas Lek Cesk* 2007; 146: 337-342.
73. 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: 337-344.
74. Chen SC, Judd JT, Kramer M, Meijer GW et al. Phytosterol intake and dietary fat reduction are independent and additive in their ability to reduce plasma LDL cholesterol. *Lipids* 2009; 44: 273-281.
75. O'Neill FH, Sanders T, Thompson G. Comparison of efficacy of plant stanol ester and sterol ester: short-term and longer-term studies. *Am J Cardiol* 2005; 96:D29-36.
76. Fuentes J, López-Miranda J, García A, Pérez-Martínez P et al. Basal plasma concentrations of plant sterols can predict LDL-C response to sitosterol in patients with familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 495-501.
77. fiák A, Vecka M, Tvrzická E, Jáchymová M et al. Factors modulating parameters of cholesterol homeostasis in the metabolic syndrome. *Cas Lek esk* 2007; 146: 357-66
78. Mahelová A, Hypler R, Haas T. Relation of cholesterol metabolism and non-cholesterol sterols to insulin resistance. *Physiol Res* 2007; 56: 749-755.
79. Nissinen MJ, Miettinen TE, Gylling H, Miettinen TA. Applicability of non-cholesterol sterols in predicting response in cholesterol metabolism to simvastatin and fluvastatin treatment among hypercholesterolemic men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; Aug 18, PubMed ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)), PMID: 19695854
80. Yago MD, González V, Serrano P, Calpena R, Martínez MA, Martínez-Victoria E, et al. Effect of the type of dietary fat on biliary lipid composition and bile lithogenicity in humans with cholesterol gallstone disease *Nutrition* 2005; 21: 339- 347.
81. Llop JM, Virgili N, Moreno-Villares JM, García-Peris P, Serrano T, Forga M, et al. Phytosterolemia in parenteral nutrition patients: Implications for liver disease development. *Nutrition* 2008; 24:1145-1152.
82. Ukarapol N. Update on Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease: Pathogenesis and Management. *Current Nutrition & Food Science* 2005; 1:161-165.
83. Langheim S, Yu L, von Bergmann K, Lütjohann D, et al. ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J Lipid Res* 2005; 46:1732-1738.

84. Giovannini I, Chiarla C, Greco F, Boldrini G, Nuzzo G. Characterization of biochemical and clinical correlates of hypocholesterolemia after hepatectomy. *Clin Chemistry* 2003; 49: 317-320.
85. Giovannini I, Boldrini G, Chiarla C et al: Pathophysiologic correlates of hypocholesterolemia in critically ill surgical patients. *Int.Care Med* 1999; 25: 748-51.
86. Giovannini I, Chiarla C, Giuliente F, Vellone M, Zadák Z, Nuzzo G: Hypocholesterolemia in surgical trauma, sepsis, other acute conditions and critical illness. In Kramer MA: *Trends in cholesterol research*, Nova Biomedical 2005, s 137-161, ISBN 1-59454-378-X.
87. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JCL, Sloan B-J, Barie PS, Rubin AL. Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia. *Crit Car Med* 1996; 24: 584-589.
88. Bakalá B, Hy-pler R, Pachel J, Zadák Z. Changes in cholesterol and its precursors during the first days after major trauma. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115/21-22: 775-779.
89. Wolfram G, Eckart J, Zollner N. Disturbances of lipoprotein and fatty acid metabolism in patients with heavy injuries. *Wien Klin Wochenschr* 1980; 58: 1327-1337.
90. Marik PE. Dyslipidemia in the critically ill. *Crit Care Clin* 2006; 22:151-159.
91. Hudgins LC, Parker TS, Levine DM, Gordon BR, Saal SD, Jiang X et al.. A single intravenous dose of endotoxin rapidly alters serum lipoproteins and lipid transfer proteins in normal volunteers. *J Lipid Research* 2003, 44:1489-1498.
92. Vyroubal P, Chiarla C, Giovannini I, Hy-pler R, et al. Hypocholesterolemia in clinically serious conditions – a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc* 2008; 152: 181-189.
93. Chiarla C, Giovannini I, Giuliente F, Zadák Z, Vellone M, Ardito F, et al. Severe hypocholesterolemia in surgical patients, sepsis, and critical illness. *J Critical Care* 2010; 25:361e7-361e12.
94. Dunham CM, Chirichella TJ. Attenuated hypocholesterolemia following severe trauma signals risk for late ventilator-associated pneumonia, ventilator dependency, and death: a retrospective study of consecutive patients. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 42.
95. Chien JY, Jerng JS, Yu ChJ, Jang PCh. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33:1688-1693.
96. Vanni HE, Gordon BR, Levine DM Sloan BJ, Stein DR, Yurt RW et al. Cholesterol and interleukin-6 concentrations relate to outcomes in burn-injured patients. *J Burn Care Rehabil* 2003; 24: 133-141.

97. Bonville DA, Parker TS, Levine DM, Gordon BR, Hydo LJ, Eachempati SR 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.
98. Fraunberger P, Nagel D, Walli AK, Seidel D, Werdan K. Serum cholesterol and mortality in patients with multiple organ failure. *Crit Care Med* 2000; 28: 3574-3575.
99. Gui D, Spada PL, De Gaetano A, et al. Hypocholesterolemia and risk of death in critically ill surgical patient. *Int Care Med* 1996; 22: 790-794.
100. Schatz IJ, Masaki K, Yano K et al.: Cholesterol and all-cause mortality in elderly people from Honolulu Heart Program: A cohort study. *Lancet* 2001; 358: 351-355.
101. Dunham CM, Fealk MH et al. Following severe injury, hypocholesterolemia improves with convalescence but persist with organ failure or onset of infection. *Crit Car* 2003; 7: R145-R153.
102. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 2003; 80: 7536769.
103. Heidegger CP, Darmon P, Pichard C. Enteral vs. parenteral nutrition for the critically ill patient: a combined support should be preferred. *Curr Opin Crit Care* 2008; 14:408-414.
104. Pálová S, Charvat J, Kvapil M. Comparison of soybean oil- and olive oil-based lipid emulsions on hepatobiliary function and serum triacylglycerols level during realimentation. *J Int Med Res* 2008; 36:587-593.
105. Sobotka L, Soeters PB, Raguso CA, et al. Nutritional support in critically ill and septic patients. In: Sobotka L Basic in clinical nutrition, Third edition; Galen 2004, 500stran. ISBN 80-7262-292-7.
106. Feingold KRI, Staprans RA, Memon AH, Moser JK, 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: 1765-1776.
107. Chenaud C, Merlani PG, Roux-Lombard P, Burger D et al. Low apolipoprotein A-I level at intensive care unit admission and systemic inflammatory response syndrome exacerbation. *Crit Care Med* 2004; 32: 632-637.
108. van Leeuwen HJ, Heezius ECJM, Dallinga GM, van Strijp JAG, et al. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31: 1359-1366
109. Khovidhunkit W, Kim M-S, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH et al. Effect of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lip Res* 2004; 45:1169-1196.

110. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. Hypotransferrinemia and changes in plasma lipid and metabolic patterns in sepsis. *Amino Acids* 2009; 36: 327-331.
111. Kamolz LP, Anđel H, Mittlböck M et al. Serum cholesterol and triglycerides: potential role of mortality prediction. *Burns* 2003; 29: 810-815.
112. Druml W. Is cholesterol a conditionally essential nutrient in critically ill patients? *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115:740-742.
113. Bakalá B, Zadák Z, Páchl J, Hyšpler R, Črhová T<sup>M</sup>, Karásek J, Šapek V. Severe hypocholesterolemia is associated with adrenal insufficiency in multiple trauma patients. *Int Care Med* 2001; 27: S253-S253.
114. Van der Voort PHJ, Gerritsen RT, Bakker AJ, Boerma EC, Kuiper MA, deHeide L. HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen in critically ill patients. *Int Care Med* 2003; 29: 2199-2203.
115. Chauffard A, Richet C, Grigaut A. La cholesterinémie au cours de la tuberculose pulmonaire. *Compt Rend Soc Biol* 1911 ; 276-277.
116. Bakalá B, Zadák Z, Páchl J, Hyšpler R, Pařlout J. Změny v metabolismu cholesterolu v prvních dnech po závažném traumatu. *Anest neodklad péče* 2002; 13: 10-11.
117. Atac B, Brahař D, Frishman WH, Lerner R. Anemia and hypocholesterolemia. *Heart disease* 2003; 5: 65-71
118. Sato M, Nagao K, Sakono M, Ogawa H, Yamamoto K, Imaizumi K. Low protein diets posttranscriptionally repress apolipoprotein B expression in rat liver. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 381-385
119. 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: 743-746.
120. Coombes EJ, Shakespeare PG, Batstone GF. Lipoprotein changes after burn injury in man. *J Trauma* 1980; 20: 971-975.
121. Lopez-Martinez J, Sanchez Castilla M, Garcia-de-Lorenzo A. Hypocholesterolemia in critically ill patients ( Letter to the Editor and reply by Giovannini I, Boldrini G, Chiarla C, Giuliante F, Vellone M, Nuzzo G). *Int Care Med* 2000; 26: 259-260.
122. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Boldrini G, Coleman WP, Castagneto M. Relationship of plasma cholesterol to doses of branch-chain amino acids in sepsis *Crit Care Med* 1990; 18: 32-36.
123. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. The relationship between plasma cholesterol, amino acids and acute phase proteins in sepsis. *Amino Acids* 2004; 27: 97-100

124. Chiarla C, Giovannini I, Boldrini G, Castagneto M. The influence of amino acid load and energy expenditure on plasma cholesterol levels in sepsis. *Acta Med Rom* 1989; 27: 166-170.
125. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Castagneto M. Relationship of plasma acute-phase protein to amino acid levels during high-dose branched chain amino acids support in sepsis. In: Faist E et al. *Host defense dysfunction in trauma, shock and sepsis*. Berlin Heidelberg New York
126. 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: 883-892.
127. Nichols GE, Weinsier RL, Millikan WJ jr., Smith DK. Lipid and lipoprotein levels in adults receiving Liposyn II. *Nutrition* 1991; 7: 329-332.
128. Druml W, Fischer M. Cholesterol improves the utilization of parenteral lipid emulsion. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115: 767-774.
129. Havel E, Sobotka L, Bláha V, Mařík J, Solichová D, Hyšpler R, Zadák Z. 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.
130. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JCL, Sloan B-J, Barie PS, Rubin AL. Relationship of hypolipidemia to cytokine concentrations and outcomes in critically ill patients. *Crit Care Med* 2001; 29:1563-1568.
131. Akgün S, Ertel NH, Mosenthal A, Oser W: Postsurgical reduction of serum lipoproteins: interleucine-6 and acute-phase response. *J. Lab Clin Med* 1998, 131: 103-108.
132. Fraunberger P, Pilz G, Cremer P et al: Association of serum tumor necrosis factor levels with decrease of cholesterol during septic shock. *Shock* 1998; 10: 359-363.
133. Fraunberger P, Schaefer S, Werdan K, Walli AK, Seidel D. Reduction of circulating cholesterol and apolipoprotein levels during sepsis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 357-362.
134. Pinsky MR. Dysregulation of the immune response in severe sepsis. *Am J Med Sci* 2004; 328:220-229.
135. Murch O, Collin M, Hinds CJ, Thiemermann C. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Int Care Med* 2007; 33: 13-24
136. Wendel M, Paul R, Heller A. Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Int Care Med* 2007; 33: 25-35.



137. Vyroubal P, Hypl R, Tichá A, Samek J, Cerman J, Havel E, et al. Porucha syntézy cholesterolu a jeho prekurzor u klinicky závažných stav . Vnit Lék 2011; 57: 441-450.
138. Freudenberg MA, Bog-Hansen TC, Back U, et al. Interaction of lipopolysaccharides with plasma high density lipoprotein in rats. Infect Immun 1980; 28: 373-380.
139. 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; 97:1028-1034.
140. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 1990; 249: 1431-1433.
141. Gallay P, Heumann D, Le Roy D, et al. Lipopolysaccharide-binding protein as a major plasma protein responsible for endotoxemic shock. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 9935-9938.
142. McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, Cuzzocrea S, Mota-Filipe H, Hinds CJ et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression on a rodent model of endotoxic shock. Shock 2003; 20: 551-557.
143. vonErckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. Crr Opin Clin Nutr Metab Care 2005; 8: 147-152.
144. Flegel WA, Wolpl A, Mannel DN, Northoff H. Inhibition of endotoxin-induced activation of human monocytes by human lipoproteins. Infect Immun 1989; 57: 2237-2245.
145. Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. J Biol Chem 1999; 274: 34116-34122.
146. Levels JHM, Marquart JA, Abraham PR, van den Ende AE, Molhuizen HOF, van Deventer SJH, Meijers JCM. Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein. Infect Immun 2005; 73: 2321-2326.
147. Leardi S, Altilia F, Delmonaco S et al. Blood levels of cholesterol and postoperative septic complications. A Chir Ital 2000; 71: 233-237.
148. Vesly CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from Gram-negative bacterial membranes. Infect Immun 2000; 68: 2410-2417.
149. Park SH, Park JH, Kang JS, Kang YH. 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: 168-182 .

150. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1987-1994.
151. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-B1 activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat med* 2001; 7: 853-857.
152. Ferreti G, Bacchetti T, Moroni C, Savino S, Liuzzi A, Balzola F et al. Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese female. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1728-1733.
153. Gordon BR; Parker TS, Levine DM, Feuerbach F, Saal SD, Sloan BJ et al. Neutralization of endotoxin by a phospholipid emulsion in healthy volunteers. *J Infect Dis* 2005; 191:1515-1522.
154. Xia P, Vadas MA, Rye KA, Barter PJ, Gamble JR. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem* 1999; 274: 33143-33147.
155. Yan JJ, Jung JS, Lee JE, Huh SO, Kim HS et al. Therapeutic effect of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med* 2004; 10: 161-167.
156. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 dietary reference intakes for calcium and vitamin D: what dietetics practitioners need to know. *J Am Diet Assoc* 2011; 111: 524-527.
157. Gottschlich MM, Mayes T, Khoury J, Warden GD. Hypovitaminosis D in acutely injured pediatric burn patients. *J Am Diet Assoc* 2004; 104: 931-941.
158. Cuthbertson D: The disturbance of metabolism produced by bony and non-bony injury, with notes on certain abnormal conditions of bone. *Biochem J* 1930; 24: 1244-1263
159. Malmendier CL, Lontie J-F, Buboia DY. Mechanisms of hypocholesterolemia. In: *Hypercholesterolemia, hypocholesterolemia, hypertriglyceridemia*. In: Malmendier CL, Alupovic P, Bryan Brewer H jr. editors. New York; Plenum Press 1990; 173-182
160. Kreymann KG, Berger MM, Deutz NE, et al. ESPEN Guidelines on enteral nutrition: intensive care. *Clin Nutr* 2006; 25: 210-223.
161. Zadák Z, Hypl R, Havel E, et al. Changes in metabolism of cholesterol and its precursors in critical patients on total parenteral nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 214.
162. Hallikainen M, Huikko L, Kontra K, Nissinen M, Piironen V, Miettinen T, et al. Effect of parenteral serum plant sterols on liver enzymes and cholesterol metabolism in a patient with short bowel syndrome. *Nutr Clin Pract* 2008; 23: 429-35.

163. Travis SP, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, Marteau P, Colombel JF, Gionchetti P, Bouhnik Y, Turet E, Kroesen J, Starlinger M, Mortensen NJ, European Crohn's and Colitis Organisation: European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006; 55 Suppl 1: 16-35.
164. Lochs H.: Nutritional support in inflammatory bowel disease. In: Sobotka L.: Basics in clinical nutrition, Edited for ESPEN courses, second edition, Galen, 2000, 300pp. ISBN 80-7262-070-3.
165. Barton BE: IL-6-like cytokines and cancer cachexia: consequences of chronic inflammation. *Immunology research* 2001; 23:41-58.
166. McClane SJ, Rombeau JL: Cytokines and inflammatory bowel disease: a review. *J Parenteral Enteral Nutrition* 1998; 23:20-24.
167. Griffiths AM, Drobniec A, Soldin SJ, Hamilton JR. Enteric protein loss measured by fecal alpha-1-antitrypsin clearance in the assessment of Crohn's disease activity. *J Pediatr Gastro Nutr* 1986, 5: 907-911.
168. Smith PA. Nutritional therapy for active Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4420-4423.
169. Miura S, Tsuzuki Y, Hokari R et al.: Modulation of intestinal immune system by dietary fat intake: Relevance to Crohn disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13:1183-1190.
170. Gorard DA: Enteral nutrition in Crohn's disease: fat in the formula. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 115-118.
171. Krejsek J, Kopecký O: Klinická imunologie, NUKLEUS HK 2004; 822-823.
172. Blok WL, Katan MB, van den Meer JWM. Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. *J Nutr* 1996; 126: 1515-1533.
173. O'Sullivan MA, O'Morain CA: Nutritional therapy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998; 4: 45-53
174. Greenberg GR, Fleming CR, Jeejeebhoy KN, et al. Controlled trial of bowel rest and nutrition support in the management of Crohn's disease. *Gut* 1998; 29: 1309-1315
175. Gassul MA, Fernandez-Ba ares F, Cabre E, Papo M, et al. Fat composition may be a clue to explain the primary therapeutic effect of enteral nutrition in Crohn's disease: results of a double blind randomized multicentre European trial. *Gut* 2002; 51:164 -168.
176. Belluzi A., Brignota C, Campieri M, et al.: Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Eng J Med* 1996; 334: 1557-1560.

177. Winter TA, Lemmer ER, O'Keefe SJD, Ogden JM. The effect of severe undernutrition and subsequent refeeding on digestive function in human patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 191-196.
178. Raouf AH., Hildrey V., Daniel J., Walker RJ., Krasner N., Elias E., Rhodes JM.: Enteral feeding as sole treatment for Crohn's disease: controlled trial of whole protein v amino acid based feed and a case study of dietary challenge. *Gut* 1991; 32: 702-707.
179. Dupont B, Dupont C, Justum AM, Piquet MA, Reimund JM. Enteral nutrition in adult Crohn's disease: present status and perspectives. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:875-84
180. Moorthy D, Cappellano KL, Rosenberg IH. Nutrition and Crohn's disease: an update of print and Web-based Guyance *Nutr Rev* 2008; 66: 387-97.
181. Peter JV, Moran JL, Phillips-Hughes J. A metaanalysis of treatment outcomes of early enteral versus early parenteral nutrition in hospitalized patients. *Crit Care Med* 2005; 33: 213-220.
182. Kostic N, Bozanic M, Cvetkovic R, Adamov A. Lipids and total bile acids in the blood of patients with infalammatory bowel disease, *Srp Arh Celok Lek* 1990; 118: 43-46.
183. Levy E, Rizwan Y, Thibault L et al.: Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 807-815.
184. Geerling BJ, v. Houwelingen AC, Badart-Smook A, Stockbrügger RW, Brummer RJM Fat intake and fatty acid profile in plasma phospholipids and adipose tissue in patients with Crohn's disease, compared with controls. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 410- 417.
185. Geerling BJ, Badart-Smook A, v Deursen C, v. Houwelingen AC, Russel MGVM, Stockbrügger RW, Brummer RJM. Nutritional supplementation with n-3 fatty acids and antioxidants in patients with Crohn's disease in remission: effect on antioxidant status and fatty acid profile. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 77-84.
186. Trebble TM, Wootton SA, May A, Erlewyn-Lajeunesse MDS, Chakraborty A, Mullee MA at al. Essential fatty acid status in paediatric Crohn's disease: relationship with disease activity and nutritional status. *Alimen Pharmacol Ther* 2003; 18: 433-442.
187. Socha P, Ryzko J, Koletzko B, Celinska-Cedro D, Woynarowski M, Czubkowski P, Socha J. Essential fatty acid depletion in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 573-577.
188. Geerling BJ, v.Houwelingen AC, Badart-Smook A, Stockbrügger RW, Brummer RJM The relation between antioxidant status and alterations in fatty acid profile in patients with Crohn disease and controls. *Scand J Gastroenterol* 1999; 11: 1108-1116.

189. Lapillonne A, Carlson SE. Polyunsaturated fatty acids and infant growth. *Lipids* 2001; 36: 901-911
190. Romanato G, Scarpa M, Angriman I, Faggian D et al. Plasma lipids and inflammation in active inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29:298-307.
191. Fallah MA, Prakash C, Edmundowicz S. Acute Gastrointestinal bleeding. *Med Clin North Am* 2000; 84: 1183-1208.
192. Dertinger SH, Vestner H, Müller K, Merz M, Hahn EG, Altendorf-Hofmann A, et al. Prospective study of diagnosis, therapy and follow-up of acute gastrointestinal hemorrhage in 397 patients. *Wien Klin Wochenschr* 1996; 108: 717-21.
193. Kolarz G, Mayrhofer F, Neumann K, Singer F. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. A prevalence study in Austria. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115: 41-46,
194. Tiuca N, Sztogrin W. The news of treatment of variceal upper gastrointestinal bleeding. *J Med and Life*. 2011; 4: 395-399
195. Bakalar B, Zadak Z, Pachel J, Sidak M, Hyspler R, Crhova D. Hypocholesterolemia after multiple injuries is not caused by simple dilution. *Rozhl Chir* 2001; 80: 67-71.