

Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Doktorský studijní program  
Fyziologie a patologická fyziologie

**Metabolismus proteinů a aminokyselin u proteokatabolických stavů  
– vliv metabolitů leucinu.**

**Protein and amino acid metabolism in protein catabolic states  
– effect of leucine metabolites.**

Autor:

**Mgr. Miroslav Kovařík**

Školitel:

**Prof. MUDr. Milan Holeček, DrSc.**

Ústav fyziologie

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Univerzita Karlova v Praze

Hradec Králové, 2011

Obhajoba dne:

**Prohlášení:**

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

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

**Hradec Králové, 5. 2. 2011**

## Poděkování

„Tam kde sny končí  
hledal jsem pravdu čistou  
lží nepoučen.“  
(„Manik“ – [www.postreh.com](http://www.postreh.com))

Děkuji svému školiteli, Prof. MUDr. Milanu Holečkovi, DrSc., za jeho snahu vést mne během postgraduálního studia k samostatnosti a za jeho rady a zkušenosti směřované jak na výzkumnou, tak publikační činnost.

Děkuji svému nejbližšímu spolupracovníkovi, Mgr. Tomáši Muthnému, PhD., za rady a pomoc při seznamování s metodikou používanou v naší laboratoři, vlastními experimenty, hodnocením výsledků i publikační činností, která přesáhla pouhé kolegiální rozměry a přerostla v přátelský vztah.

Děkuji ostatním spolupracovníkům našeho výzkumného týmu, jmenovitě Ing. Ludku Šišperovi, CSc., Hance Buzkové a Radaně Fingerové, za příkladnou spolupráci a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji i zbývajícím členům Ústavu fyziologie, v čele s Prof. MUDr. Zuzanou Červinkovou, CSc., a všem dalším, kteří zde nebyli přímo jmenováni, ale také přispěli k vytvoření této práce.

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM 0021620820 a projektu GAUK 7322/2007.

# Obsah

Seznam zkratk.....	7
1. Teoretický úvod.....	10
1.1 Proteokatabolismus, kachexie.....	10
1.2 Sepse.....	11
1.2.1 Patofyziologie sepse.....	11
1.2.2 Vliv sepse na metabolismus bílkovin.....	16
1.2.2.1 Vliv sepse na proteosyntézu.....	17
1.2.2.2 Vliv sepse na proteolýzu.....	19
1.2.2.3 Vliv sepse na metabolismus bílkovin u různých typů svalů.....	20
1.2.3 Experimentální modely sepse.....	23
1.2.3.1 Injekce látky vyvolávající nekrózu.....	23
1.2.3.2 Modely toxémie.....	23
1.2.3.3 Podání živých bakterií.....	24
1.2.3.4 Abdominální sepse.....	24
1.3 Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem.....	25
1.3.1 Metabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem.....	25
1.3.2 Vliv aminokyselin s rozvětveným řetězcem a jejich metabolitů na metabolismus bílkovin.....	30
1.3.2.1 Vliv aminokyselin s rozvětveným řetězcem na metabolismus bílkovin.....	30
1.3.2.2 Vliv kyseliny $\alpha$ -ketoisokapronové na metabolismus bílkovin.....	32
1.3.2.3 Vliv $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrátu na metabolismus bílkovin.....	33
2. Cíle práce.....	38
3. Materiál a metody.....	39
3.1 Pokusná zvířata.....	39
3.2 Endotoxinový/lipopolysacharidový model sepse.....	39
3.3 Stanovení parametrů metabolismu aminokyselin a bílkovin za podmínek <i>in vivo</i> .....	40
3.3.1 Metabolismus leucinu a bílkovin za podmínek <i>in vivo</i> .....	40
3.3.2 Proteosyntéza ve tkáních za podmínek <i>in vivo</i> .....	41

3.4	Stanovení parametrů metabolismu aminokyselin a bílkovin na izolovaných kosterních svalech.....	42
3.4.1	Izolace kosterních svalů.....	42
3.4.2	Inkubace izolovaných svalů.....	43
3.4.3	Proteosyntéza a oxidace leucinu v izolovaných svalech.....	44
3.4.4	Celková a myofibrilární proteolýza v izolovaných svalech.....	46
3.4.5	Stanovení koncentrace aminokyselin.....	48
3.5	Stanovení aktivity a exprese proteolytických enzymů.....	49
3.5.1	Chymotrypsin-like aktivita proteazomu.....	49
3.5.2	Aktivita katepsinů B a L.....	50
3.5.3	Expres $\alpha$ -podjednotek proteazomu.....	51
3.6	Ostatní metody.....	51
3.6.1	Stanovení bílkovin.....	51
3.6.2	Měření radioaktivity.....	52
3.6.3	Biochemické vyšetření krve.....	52
3.6.4	Stanovení poměru suché a vlhké hmotnosti.....	52
3.7	Materiál.....	52
3.8	Statistické zpracování dat.....	53
4.	Výsledky.....	54
4.1	Vliv endotoxinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin v kosterním svalu – dávková závislost.....	54
4.2	Vliv metabolitů leucinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin u intaktních zvířat a při zátěžových stavech.....	66
4.2.1	Vliv KIC na metabolismus bílkovin a aminokyselin.....	66
4.2.1.1	Vliv KIC na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních a endotoxemických zvířat – studie <i>in vivo</i> .....	66
4.2.2	Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin.....	73
4.2.2.1	Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních zvířat – studie <i>in vivo</i> .....	73
4.2.2.2	Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin endotoxemických zvířat – studie <i>in vivo</i> .....	78
4.2.2.3	Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních a endotoxemických zvířat – studie <i>in vitro</i> .....	89
5.	Diskuze.....	95

5.1	Vliv endotoxinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin.....	95
5.2	Vliv metabolitů leucinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin.....	97
5.2.1	Vliv KIC na metabolismus bílkovin a aminokyselin.....	97
5.2.1.1	Vliv KIC na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních a endotoxemických zvířat – studie <i>in vivo</i> .....	97
5.2.2	Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin.....	98
5.2.2.1	Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních zvířat – studie <i>in vivo</i> .....	98
5.2.2.2	Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin endotoxemických zvířat – studie <i>in vivo</i> .....	99
5.2.2.3	Vliv HMB na metabolismus bílkovin v kosterním svalu – studie <i>in vitro</i> .....	100
5.3	Porovnání metabolismu bílkovin mezi EDL a SOL – vliv endotoxinu a metabolitů leucinu.....	100
6.	Závěry.....	102
7.	Literatura.....	104
8.	Souhrn.....	119
9.	Summary.....	121

## Seznam zkratk

- 4E-BP1 – Vazebný protein pro eIF4E
- AMPK – 5'-AMP aktivovaná proteinkináza
- AP-1 – Aktivační protein 1 (activator protein 1)
- APC – Aktivovaný protein C
- BCAA – Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (branched-chain amino acids): leucin, isoleucin a valin
- BCAT – BCAA aminotransferáza
- BCKA – Ketoanalog aminokyselin s rozvětveným řetězcem (branched-chain keto acids)
- BCKD – Dehydrogenáza ketoanalog aminokyselin s rozvětveným řetězcem (branched-chain keto acid dehydrogenase)
- C/EBP – CCAAT/enhancer binding protein
- C4bBP – Vazebný protein pro C4 složku komplementu (C4b binding protein)
- CASP – Colon ascendens stent peritonitis
- CLP – Podvaz slepého střeva s následnou perforací (cecal ligation and puncture)
- COX-2 – Cyklooxygenáza-2
- CpG DNA – Ekvivalent bakteriální DNA bohaté na nemetylované CG dinukleotidy
- EDL – Musculus extensor digitorum longus
- eIF – Eukaryotický iniciační faktor
- EPA – Kyselina ikosapentaenová
- EPCR – Endoteliální receptor proteinu C (endothelial cell protein C receptor)
- GM-CSF – Granulocyty a makrofágy stimulující faktor
- GSK-3 – Glykogen syntáza kináza 3
- HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát
- HMGB-1 – High Mobility Group Box-1 protein
- HMG-CoA –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutarylkoenzym A
- HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- ChTLA – Chymotrypsin-like aktivita proteazomu
- ICAM-1 – Intracelulární adhezní molekula 1 (inter-cellular adhesion molecule 1)
- IFN – Interferon
- IL – Interleukin
- iNOS – Inducibilní forma syntázy oxidu dusnatého

IRAK – Kináza asociovaná s receptorem pro interleukin-1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1)

I $\kappa$ B $\alpha$  –  $\alpha$  podjednotka inhibitoru nukleárního faktoru  $\kappa$ B

JNK – c-Jun N-terminální kináza

KIC – Kyselina  $\alpha$ -ketoisokapronová

KIV – Kyselina  $\alpha$ -ketoisovalerová

KMV – Kyselina  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerová

LIF – Leukemický inhibiční faktor

MAFbx/Atrogin-1 – Muscle atrophy box F

MAMP – Mikrobiální molekulární vzory (microbial-associated molecular patterns)

MAPK – Mitogeny aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinases)

MBL – Manózu vázající lektin

MCP-1 – Monocytární chemoatraktantní protein 1 (monocyte chemotactic protein 1)

MHC – Těžký řetězec myozinu (myosin heavy chain)

MIF – Inhibiční faktor migrace makrofágů (macrophage migration inhibition factor)

MLC – Lehký řetězec myozinu (myosin light chain)

mTOR – Cílová molekula pro účinek rapamycinu u savců (mammalian target of rapamycine)

MuRF-1 – Muscle ring finger 1

NADH – Nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NF $\kappa$ B – Nukleární faktor  $\kappa$ B

PAF – Krevní destičky aktivující faktor (platelet-activating factor)

PAR-1 – Proteázami aktivovaný receptor 1 (protease-activated receptor 1)

PGE2 – Prostaglandin E2

PI3K - Phosphoinositide-3 kinase

PIF – Proteolýzu indukující faktor

PKR – Double-strand RNA-dependent protein kinase

PP1 – Proteinfosfatáza 1

ROS – Reaktivní deriváty molekulového kyslíku (reactive oxygen species)

rT3 – Reverzní trijodtyronin

S6K1 – Kináza ribozomálního proteinu S6 (ribosomal protein S6 kinase-1)

SEM – standardní chyba průměru (standard error mean)

SOL – Musculus soleus



Suc-LLVY-MCA – Sukcinyl-leucyl-leucyl-valyl-tyrosyl-4-methylkumaryl-7-amid  
T3 – Trijodtyronin  
TAK-1 – Transformujícím růstovým faktorem  $\beta$  aktivovaná kináza-1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1)  
TGF- $\beta$  – Transformační růstový faktor  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ )  
TIB – Musculus tibialis  
TIR – Toll/Interleukin-1 receptor  
TLR – Toll-like receptory  
TNF – Tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)  
TRAF-6 – Faktor-6 asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (TNF receptor associated factor 6)  
TREM-1 – Spouštěcí (trigerring) receptory exprimované na myeloidních buňkách 1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1)  
VEGF – Vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)  
Z-FA-MCA – Z-Fenylalanyl-Arginyl-7-amido-4-methylkumarin hydrochlorid  
Z-FF-FMK – Z-Fenylalanyl-Fenylalanyl-fluoromethylketon

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Proteokatabolismus, kachexie

Závažnou komplikací celé řady vážných onemocnění (např. sepse, nádorových onemocnění, AIDS, srdečních vad, selhávání ledvin, revmatoidní artritidy, tuberkulózy, chronické obstrukční plicní nemoci, cystické fibrózy, Crohnovy choroby a jiných) je komplexní metabolický syndrom, zvaný kachexie. Jeho dominantními příznaky jsou slabost, únava a ztráta tělesné hmotnosti, na niž se podílí zejména úbytek svalové hmoty, doprovázený někdy ztrátou tukové tkáně. Kachexie je často spojena s anorexií, systémovou zánětovou odpovědí, inzulínovou rezistencí a poklesem koncentrace anabolických hormonů. Ztráta proteinů postihuje především kosterní svalstvo, zatímco ve viscerální oblasti lze často pozorovat pozitivní proteinovou bilanci. Aminokyseliny uvolněné z bílkovin svalu jsou využity např. pro tvorbu proteinů akutní fáze (C-reaktivní protein, fibrinogen, ceruloplazmin), cytokinů nebo glukoneogenezi. Zvýšené odbourávání nepostihuje bílkoviny kosterního svalu rovnoměrně, preferenčně jsou degradovány zejména kontraktilní proteiny aktin a myozin.

Kachexie vede ke snížení kvality života a zvýšení morbidit i mortality. Odhaduje se, že jen v USA postihuje přibližně 5 milionů osob a je zodpovědná za úmrtí 10-20 % pacientů s nádorovým onemocněním a 15 % úmrtí způsobených orgánovou dysfunkcí u septických pacientů. Závažnou komplikací kachexie je fakt, že na rozdíl od prostého hladovění nelze jejímu rozvoji zabránit pouhou nutricí.

Ačkoliv se mnoho vědeckých týmů celého světa intenzivně věnuje studiu kachexie, mechanismy vedoucí k jejímu rozvoji ještě zcela objasněny nebyly. Vyrůstá však počet poznatků poukazujících na to, že na rozvoji proteokatabolismu u kachexie se alespoň částečně podílí systémová zánětová odpověď, zprostředkovaná dysregulací tvorby prozánětových cytokinů. Ty vyvolávají četné změny v metabolismu živin - bílkovin, tuků i sacharidů (*Delano a Moldawer 2006; Morley a kol. 2006; Evans a kol. 2008*).

Proteokatabolismus u mnoha odlišných onemocnění vykazuje některé shodné znaky. Byla popsána skupina více než 100 genů (např. geny podílející se na proteolýze, tvorbě ATP nebo transkripční faktory), jejichž exprese je aktivována nebo inhibována u různých proteokatabolických stavů, někdy se hovoří o společném transkripčním programu (*Lecker a*

*kol. 2004*). Přesto lze najít i celou řadu odlišností. Proto bude v této práci popisován proteokatabolismus u septických stavů, ačkoliv by mnohé poznatky mohly platit i obecně.

## 1.2 Sepse

Sepse je závažným zdravotnickým problémem, navíc její četnost stále vzrůstá. Mezi hlavní příčiny patří ve vyspělých zemích zejména stárnutí populace, rostoucí počet pacientů s poruchou imunity a AIDS nebo snižující se citlivost na antibiotika. Všechny tyto stavy zvyšují riziko infekce a incidenci sepse. Roční výskyt těžké sepse v USA představuje přibližně 3 případy na 1000 obyvatel, což by znamenalo při přepočtu na celosvětovou populaci přes 18 milionů případů. Navíc se předpokládá každoroční nárůst počtu případů těžké sepse o 1,5 % (*Angus a kol. 2001*). Zvyšující se incidenci septického šoku ukazují následující data: zatímco v roce 1993 dosahoval výskyt septického šoku ve francouzských jednotkách intenzivní péče hodnoty 7 %, v roce 2000 již 9,7 % (*Annane a kol. 2003*). Důležitost této problematiky dokládá fakt, že počet úmrtí následkem sepse je srovnatelný s počtem úmrtí na rakovinu plic, tlustého střeva a prsu dohromady. V USA ročně zemře na následek sepse asi 215 000 lidí (*Angus a kol. 2001*), v Evropě asi 135 000, na celém světě to je více než 500 000 lidí. Skutečný počet usmrcených může být až o 50% vyšší než jsou současné odhady, protože mnoho septických pacientů trpí alespoň jednou další chorobou (jako je rakovina nebo zápal plic) a úmrtí bývá často přisuzováno spíše těmto chorobám než sepsi.

Častými doprovodnými jevy sepse (ale také jiných vážných onemocnění) jsou kachexie a proteokatabolismus. Protože jedním z cílů této práce je sledování parametrů metabolismu bílkovin u sepse jako modelu proteokatabolického stavu, nebude zde tematika sepse diskutována v celém rozsahu, ale především se zaměřením na tuto problematiku.

### 1.2.1 Patofyziologie sepse

U pacientů postižených sepsí dochází k rozsáhlé aktivaci zánětlivých procesů, což vede ke zvýšení koncentrací cirkulujících cytokinů a aktivaci buněk imunitního systému. Zároveň se projevují poruchy krevního srážení – od mírné aktivace koagulace, přes pokles počtu krevních destiček a prodloužení srážlivosti až po diseminovanou intravaskulární koagulaci. Mezi aktivací zánětu a krevního srážení je úzký vztah – zánětlivá aktivita vede

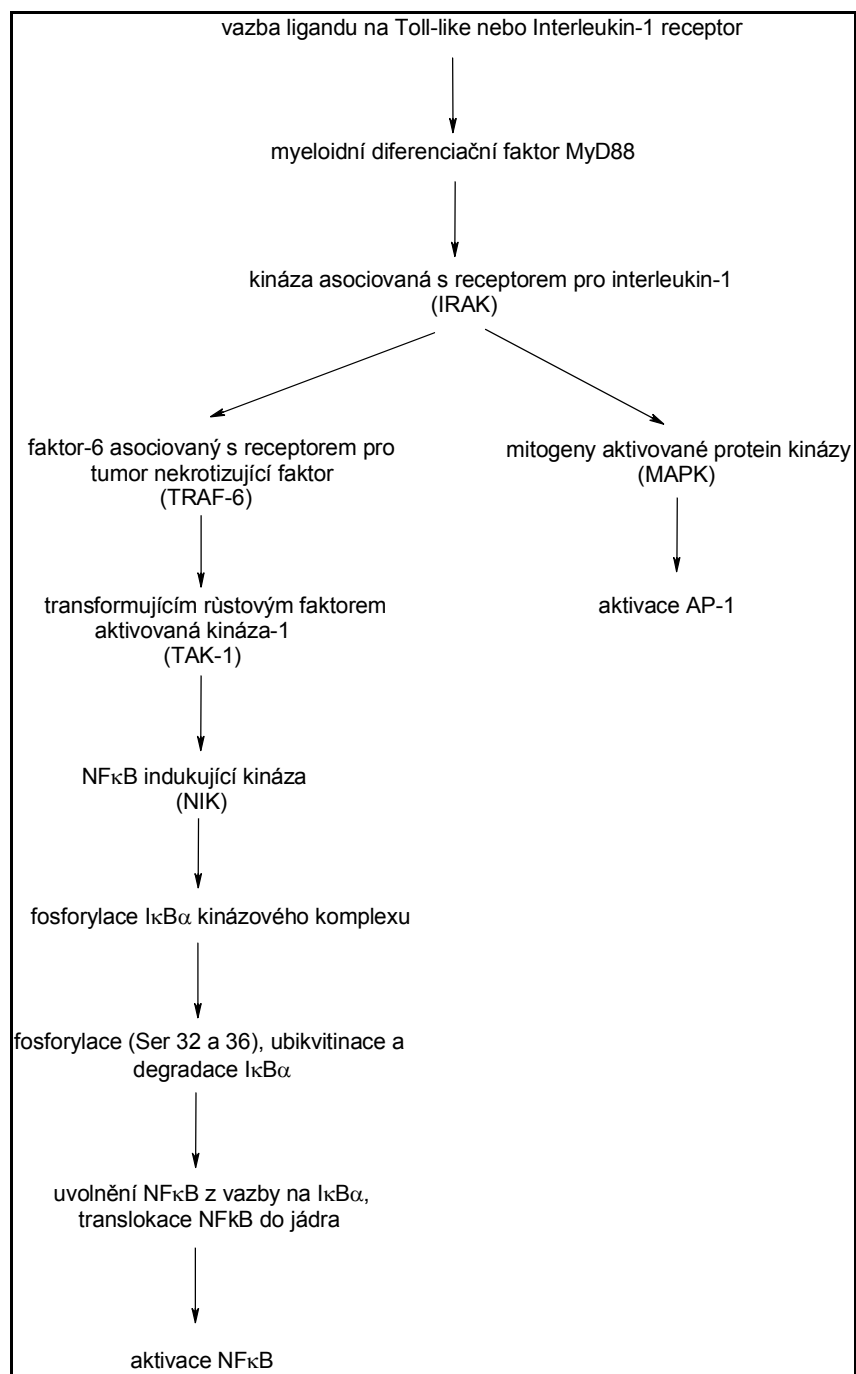
k aktivaci koagulace, současně aktivované proteázy krevního srážení ovlivňují zánětlivou odpověď.

Během sepse je celá řada dějů iniciována mikroorganismy a od nich odvozenými látkami, tzv. mikrobiálními molekulárními vzory (MAMP – microbial-associated molecular patterns), které překonají přirozené bariéry a proniknou do vnitřního prostředí organismu. Mezi ně patří mimo jiné lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, peptidoglykan a lipoteichoová kyselina grampozitivních bakterií, nemetylovaná bakteriální DNA, mannany kvasinek, flagelin nebo dvojitá šroubovice virové RNA (*Adib-Conquy a Cavaillon 2007*). Tyto nesavčí molekuly jsou rozpoznány třemi rodinami receptorů: Toll-like receptory (TLR), intracelulárními NOD-like receptory a peptidoglykan rozpoznávajícími proteiny. Nejvýznamnější z nich jsou TLR, které často fungují ve spojení s dalšími molekulami např. CD14 nebo jinými TLR.

Vazba MAMP na specifický TLR vede k přenosu signálu Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) signalizační doménou přes celou kaskádu kináz. Signalizace všech známých TLR je integrována přes myeloidní diferenciací faktor MyD88, který se podílí i na signálních drahách pro aktivaci receptoru pro interleukin-1 (*viz obr. 1*). MyD88 aktivuje kinázu asociovanou s receptorem pro interleukin-1 (IRAK), která dále stimuluje faktor-6 asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (TRAF-6) a následně transformujícím růstovým faktorem  $\beta$  aktivovanou kinázu-1 (TAK-1). To vede k aktivaci transkripčního faktoru NF $\kappa$ B (nukleární faktor  $\kappa$ B). Mezi geny, jejichž expresi ovlivňuje NF $\kappa$ B, patří např. tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), inducibilní forma syntázy oxidu dusnatého (iNOS), cyklooxygenáza-2 (COX-2) nebo intracelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1). Na ovlivnění exprese řady prozánětlivých genů, účastnících se na patofyziologii sepse, se podílí také jiný transkripční faktor, aktivační protein 1 (AP-1). Na jeho regulaci se podílí členové rodiny mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAPK), zejména c-Jun N-terminální kináza (JNK) a p38 MAPK (*Matsuda a Hattori 2006*). Výsledkem těchto pochodů je aktivace tvorby mnoha prozánětlivých látek či volných radikálů:

- cytokinů: TNF  $\alpha$ ; interleukin (IL) 1, 2, 12, 15, 18 a 27; interferon (IFN)  $\beta$  a  $\gamma$ ; leukemický inhibiční faktor (LIF); inhibiční faktor migrace makrofágů (MIF); granulocyty a mikrofégy stimulující faktor (GM-CSF)
- chemokinů: CXCL8 (= IL-8), CCL5 nebo ligandy CXCR1 a 2, CCR1 a CCR4
- růstových faktorů: vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF)

Obrázek 1: Signální dráhy aktivace Toll-like receptorů



NFκB – nukleární faktor κB; IκBα – α podjednotka inhibitoru NFκB; AP-1 – aktivační protein 1

- buněčných markerů stresu: High Mobility Group Box-1 protein (HMGB-1), kyselina močová, S100
- plazmatických faktorů: ligandy spouštěcích (trigerring) receptorů exprimovaných na myeloidních buňkách 1 (TREM-1), anafylatoxin C5a nebo manózu vázající lektin (MBL)
- lipidových mediátorů: prostaglandiny, leukotrieny, krevní destičky aktivující faktor (PAF), oxidované fosfolipidy
- purinových nukleosidů: adenosin
- neuromediátorů: substance P, noradrenalin
- enzymů: COX-2, 5-lipoxygenáza, fosfolipáza A2, dipeptidylpeptidáza 1 žírných buněk, elastáza, glykogen syntáza kináza 3 (GSK-3), iNOS, NADPH oxidáza
- koagulačních faktorů: tkáňový faktor, trombin

Hlavní roli ve sladění protiinfekčních procesů hrají cytokiny. Zvyšují mikrobicidní aktivitu fagocytů, podílejí se na směřování leukocytů do místa infekce, podporují hematopoezu a vyvolávají horečku. Tvorba prozánětlivých cytokinů stoupá velmi rychle, což dokládá fakt, že maximální koncentrace TNF  $\alpha$  se objevují již 90 minut po aplikaci endotoxinu. Takové rychlosti je dosaženo uvolněním ze žírných buněk nebo tím, že v některých buňkách (např. Kupfferovy buňky) dochází ke konstitutivní transkripci mRNA pro TNF  $\alpha$ , což umožní rychlou aktivaci tvorby tohoto cytokinu. Prozánětlivé cytokiny se podílejí na protiinfekčních procesech, jejich nadměrná tvorba ale vyvolává vážné nežádoucí účinky. Proto jsou během sepse ve velkém množství tvořeny také protizánětlivé mediátory jako prostaglandin E2 (PGE2), IL-10 nebo transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), jejich nadměrná produkce ovšem může vyvolat imunodepresi.

K mediátorům pozdějších fází sepse patří HMGB-1, který se řadí mezi endogenní molekuly signalizující poškození neboli „alarminy“. Tento jaderný protein je pasivně uvolňován z poškozených a virem napadených buněk nebo aktivně sekretován buňkami imunitního systému poté co je acetylován nebo fosforylován. Když dosáhne extracelulárního prostoru, váže se na receptory pro konečné produkty pokročilé glykace nebo TLR. Mezi účinky HMGB-1 patří stimulace aktivity a dozrávání buněk imunitního systému a endotelu (povzbuzení migrace; usnadnění rozpoznávání bakteriálních produktů; tvorba cytokinů, chemokinů, adhezních molekul a reaktivních forem kyslíku), inhibice fagocytózy

apoptotických neutrofilů, ale také podpora opravy a regenerace tkání. Na experimentálním modelu sepse u zvířat byly prokázány protektivní účinky nízkomolekulárních inhibitorů a specifických protilátek proti HMGB-1 (*Adib-Conquy a Cavailon 2007; Wang a kol. 2008; Klune a kol. 2008*).

Důležitou roli v patogenezi sepse a s ní spojenou dysfunkcí orgánů hraje aktivovaný protein C (APC). Cirkulující zymogen protein C je aktivován trombomodulinem vázaným na endoteliální buňky (po jeho aktivaci trombinem). Spolu se svým kofaktorem, proteinem S, degraduje APC esenciální koagulační faktory Va a VIIIa, vykazuje tedy antikoagulační účinky. Endoteliální receptor proteinu C (EPCR) urychluje aktivaci proteinu C, vazba APC na EPCR zesiluje jeho antikoagulační a protizánětlivé účinky (*Levi a van der Poll 2007*).

Sepse vede k poruchám funkce APC na několika úrovních. Množství proteinu C klesá díky degradaci proteolytickými enzymy jako je neutrofilní elastáza (*Eckle a kol. 1991*), spotřebování nebo snížení syntézy. Zhoršená aktivace proteinu C je způsobena downregulací trombomodulinu prozánětlivými cytokiny např. TNF $\alpha$  a IL-1 (*Nawroth a Stern 1986*). Účinek APC je zhoršen díky downregulaci EPCR (*Taylor a kol. 2000*) a snížení množství volného proteinu S. Ten je vázán ze 60 % na vazebný protein pro C4 složku komplementu (C4bBP), jehož množství při zánětu stoupá, neboť patří mezi proteiny akutní fáze (*Taylor a kol. 1995*).

Protizánětlivé účinky APC jsou zřejmě zprostředkovány EPCR. Vazba APC na EPCR ovlivňuje expresi genů inhibicí vstupu kalcia do buňky (*Hancock a kol. 1995*) a blokadou translokace NF $\kappa$ B do jádra a tudíž jeho aktivace (*White a kol. 2000*). Také samotný komplex APC-EPCR se může translokovat do jádra, a tak modulovat expresi genů. Vazba APC na EPCR může vést k aktivaci proteázami aktivovanému receptoru (PAR-1), a tak ovlivňovat cytokinovou odezvu – dochází např. k upregulaci exprese monocytárního chemoatraktantního proteinu (MCP-1), který má při sepsi protektivní účinky (*Riewald a kol. 2002*). APC vykazuje také protizánětlivý účinek v plicích, kde inhibuje sekreci a expresi růstového faktoru odvozeného z destiček (platelet-derived growth factor) (*Shimizu a kol. 2003*). APC dále brání porušení bariéry endoteliálních buněk při sepsi a inhibuje apoptózu těchto buněk.

Předpokládá se, že dysregulace apoptózy lymfocytů v brzlíku, slezině nebo lymfoidní tkáni spojené se střevem může vést k imunosupresi, a tedy citlivosti k následným infekcím nebo neschopnosti zdolání probíhající sepse. V časných fázích sepse jsou postiženy především T, v pozdějších i B lymfocyty. Nárůst apoptózy lymfocytů je spojený s poklesem proliferace, schopnosti uvolňovat interferon  $\gamma$  a nárůstem mortality (*Wesche a kol. 2005*).

V souladu s touto teorií vede podání inhibitorů kaspáz k nárůstu přežití septických myší (*Hotchkiss a kol. 2000*). Vzhledem k nízké specifitě a potenciálním vedlejším účinkům nejsou inhibitory kaspáz v klinické praxi používány. Na rozdíl od lymfocytů se u sepse zvyšuje doba přežívání neutrofilů v cirkulaci. Díky aktivaci NFκB a poklesu koncentrace a aktivity kaspázy 3 a 9 totiž dochází ke zpomalení apoptózy neutrofilů a tudíž zvýšení rizika poškození tkání (*Taneja a kol. 2004*).

K dalším změnám dochází v neuroendokrinním systému. Reakce akutní fáze zahrnuje masivní uvolnění stresových hormonů – kortizolu, katecholaminů, růstového hormonu, antidiuretického hormonu, inzulínu a glukagonu. Cílem je snaha o udržení dodávky kyslíku do tkání. Dále to vede k mobilizaci zásob sacharidů, tuků a proteinů ze svalů a jater, které slouží k syntéze proteinů akutní fáze a glukoneogenezi. Stoupá klidový energetický výdej. Během pozdější fáze sepse klesají koncentrace cirkulujících hormonů na normální, někdy až subnormální hodnoty. Často dochází k výskytu syndromu „nízkého T3“ (trijodtyroninu), který se projevuje poklesem hladin trijodtyroninu a tyroxinu a nárůstem neaktivního reverzního trijodtyroninu (rT3). V této fázi klidový energetický výdej opět narůstá (*Carre a Singer 2008*).

### **1.2.2 Vliv sepse na metabolismus bílkovin**

Jedním z charakteristických projevů sepse je katabolismus proteinů kosterního svalstva. Z krátkodobého hlediska je navození katabolického stavu, a tedy poskytnutí dostatečného množství substrátů důležité pro záchranu organismu. Pokud však trvá delší dobu, vede ke zvýšení morbidity a mortality. Fatální je většinou ztráta více než 30 % tělesné hmotnosti, což odpovídá ztrátám až 75 % proteinů kosterních svalů. Katabolismus bílkovin je způsoben zvýšením proteolýzy a/nebo poklesem proteosyntézy, relativní vliv proteosyntézy a proteolýzy závisí na mnoha faktorech a může se lišit dle etiologie inzultu (*Tisdale 2005; Lang a kol. 2007*). Vlivem sepse dochází ke změnám metabolismu některých aminokyselin. Byl prokázán deficit glutaminu, a to jak v plazmě, tak ve tkáních (*Smith a Wilmore 1990; Holecek a kol. 1997*). Glutamin je syntetizován zejména v kosterním svalstvu (jako zdroj aminoskupiny slouží aminokyseliny s rozvětveným řetězcem – BCAA; branched-chain amino acids) a po uvolnění ze svalů je využíván v ledvinách, enterocytech a buňkách imunitního systému nebo je použit jako prekurzor pro syntézu nukleotidů. Pokles plazmatické koncentrace glutaminu je asociovaný s vyšší mortalitou (*Oudemans-van Straaten a kol. 2001*), u kriticky nemocných



pacientů měla suplementace glutaminem příznivé účinky na mortalitu a snížení počtu komplikací (Novak a kol. 2002). Vlivem sepse dochází ke zvýšené utilizaci BCAA, které jsou využity jako zdroj energie pro kosterní sval a zdroj aminokupiny pro syntézu glutaminu a alaninu (Holecek a kol. 1998). Význam BCAA a jejich ovlivnění sepse bude podrobněji vysvětlen v kapitole 1.3 *Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem*. K možným zásahům pro úpravu proteokatabolického stavu v terapii sepse se řadí podání proteinů, některých aminokyselin (BCAA a glutamin), glukózy nebo některých hormonů či jejich syntetických analog (inzulín, růstový hormon, testosteron), nicméně pro rutinní využití v běžné klinické praxi dosud chybí konsenzus.

### 1.2.2.1 Vliv sepse na proteosyntézu

Syntéza jednotlivých bílkovin je regulována v závislosti na potřebách organismu. Vlivem sepse stoupá v játrech syntéza proteinů akutní fáze a klesá syntéza albuminu, v kosterním svalu stoupá syntéza bílkovin ubikvitin-proteazomového komplexu, ovšem celková proteosyntéza klesá. U sepse dochází k ovlivnění syntézy jak myofibrilárních, tak sarkoplazmatických bílkovin (Lang a kol. 2007).

Zda jsou změny v syntéze proteinů u sepse způsobeny zásahem ve fázi transkripce, neexistuje jednoznačná shoda. Zatímco některé práce potvrdily, že pokles proteosyntézy je alespoň zčásti způsoben poklesem exprese genů pro aktin a těžký řetězec myozinu (Hasselgren a kol. 1991), jiné to naopak vyvrátily (Macallan a kol. 1996). Proto je za hlavní příčinu poklesu proteosyntézy považována snížená účinnost translace.

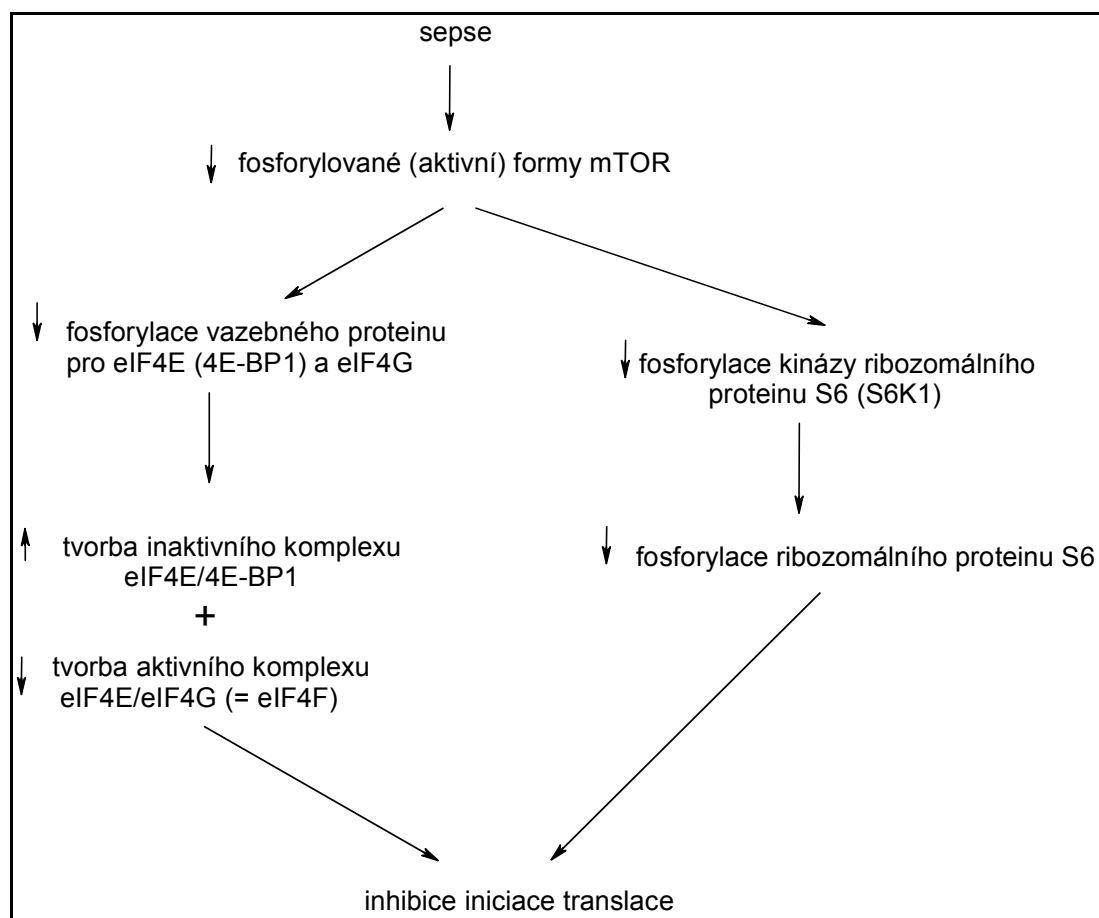
Ze tří fází translace mRNA (iniciace, elongace a terminace) podléhá nejvíce metabolické kontrole iniciace translace, proto se většina prací, vztahující se k ovlivnění proteosyntézy sepsí, zabývá sledováním změn v této fázi. Sepse způsobuje poruchy iniciace jak ve fázi připojení iniciační methionyl tRNA na malou 40S podjednotku ribozomu (tvorba 43S komplexu), tak při zavádění 43S komplexu na čepičku („capped“) mRNA. Iniciace translace je regulována řadou eukaryotických iniciačních faktorů (eIF), z nichž jsou mnohé citlivé k hormonům a složkám potravy.

Sepse snižuje množství fosforylované, tedy aktivní formy kinázy mTOR (mammalian target of rapamycine), celkové množství mTOR proteinu se nemění (přesný mechanismus dosud znám není, může se na něm podílet jak inhibice autofosforylační aktivity mTOR, tak jiných kináz). To způsobuje redukci fosforylace kinázy S6K1 (ribosomal protein

S6 kinase-1) a vazebného proteinu pro eIF4E (4E-BP1), což vede k tomu, že se eIF4E ve zvýšené míře váže na 4E-BP1 a v menší míře na eIF4G, tudíž dochází ke zhoršení tvorby aktivního komplexu eIF4F a tedy k inhibici proteosyntézy. Mimo to se snižuje množství fosforylované formy eIF4G, což negativně ovlivňuje vazbu eIF4G na eIF4E (viz obr. 2) (Lang a Frost 2004; Lang a kol. 2007).

Na poklesu proteosyntézy se může podílet také pokles koncentrace inzulínu podobného růstového faktoru (IGF-1) vlivem sepse, a to jak cirkulujícího, tak tkáňového (Frost a kol. 2003). Tuto hypotézu podporuje také zjištění, že IGF-1 má pozitivní účinek na proteosyntézu v kosterním svalu septických potkanů (Vary 2006).

**Obrázek 2: Modelové schéma ovlivnění iniciace translace při sepsi**



mTOR – cílová molekula pro účinek rapamycinu u savců (mammalian target of rapamycin); eIF – eukaryotický iniciační faktor

### 1.2.2.2 Vliv sepse na proteolýzu

Existuje mnoho studií potvrzujících zvýšené odbourávání bílkovin u sepse, a to jak na různých zvířecích experimentálních modelech (*Breuille a kol. 1999; Chai a kol. 2003; Poylin a kol. 2008*), tak u pacientů se sepsí (*Tiao a kol. 1997 a*). Rychlost odbourávání různých proteinů se liší. Zvýšená degradace proteinů u sepse postihuje zejména myofibrilární proteiny aktin a myozin. To potvrzují studie, které při porovnání celkové a myofibrilární proteolýzy prokázaly, že vzestup odbourávání myofibrilárních proteinů je významně vyšší než nárůst celkové proteolýzy (*Tiao a kol. 1996*).

Z významných proteolytických systémů hraje u sepse (stejně jako u jiných proteokatabolických stavů – AIDS, nádorová kachexie, polytraumata...) nejdůležitější roli aktivace ubikvitin-proteazomového systému. Během sepse vzrůstá exprese různých genů souvisejících s tímto systémem – např. genů pro ubikvitin, různé podjednotky 20S proteazomu (vlastní katalytické jádro), ubikvitin konjugací enzymy (enzymy nesoucí ubikvitin podílející se na výběru substrátu) nebo ubikvitin ligázy E3 (enzymy katalyzující přenos ubikvitinu na specifický substrát) MAFbx/Atrogin-1 (muscle atrophy box F) a MuRF1 (muscle ring finger 1) (*Hasselgren a kol. 2005*). Některé práce ale poukázaly na to, že zvýšení exprese na úrovni mRNA nevede vždy k odpovídajícímu zvýšení na úrovni proteinů (*Hobler a kol. 1999*). Kromě zvýšení exprese se u sepse zvyšuje i vlastní katalytická aktivita 20S proteazomu.

Ačkoli aktivace proteazomu u sepse hraje důležitou roli při zvýšení degradace proteinů, zejména myofibrilárních, je nutné podotknout, že bylo prokázáno, že intaktní myofibrily nejsou substrátem pro degradaci proteazomem. Proto degradaci myofibrilárních proteinů proteazomem předchází jejich uvolnění z myofibril. Tímto krokem je zřejmě degradace proteinů souvisejících se Z diskem (titin,  $\alpha$ -aktinin) pomocí kalpainů (kalciem dependentní cysteinové proteázy), jejichž aktivita během sepse stoupá (*Hasselgren a Fischer 2001; Goll a kol. 2008*). Existuje také názor, že tento krok katalyzují spíše než kalpains kaspázy (*Du a kol. 2004*).

Stimulace degradace proteinů vlivem sepse je spojena se zvýšením exprese mnoha genů regulujících proteolýzu. K tomu dochází díky změnám v expresi a aktivitě různých transkripčních faktorů. Byla popsána zvýšená exprese a aktivita AP-1 a CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) vlivem sepse (*Penner a kol. 2001 a 2002*). Aktivita NF- $\kappa$ B v časných fázích sepse je aktivována, v pozdějších spíše inhibována. Také pokusy na

transgenních zvířatech prokázaly, že aktivace NF- $\kappa$ B vedla ke zvýraznění svalové atrofie, naopak inhibice mírnila ztrátu svalů (*Cai a kol. 2004*). Promotory genů ubikvitin-proteazomového proteolytického systému obsahují vazebná místa pro tyto transkripční faktory (*Penner a kol. 2001 a 2002*).

### 1.2.2.3 Vliv sepse na metabolismus bílkovin u různých typů svalů

Metabolismus proteinů se liší u různých typů svalů v závislosti na složení svalových vláken jak za normálních podmínek, tak za různých patologických stavů včetně sepse. Ačkoliv jsou některé dílčí poznatky známy, mnoho prací se touto tematikou detailněji nezabývá.

Kosterní svaly mohou tvořit až téměř polovinu hmotnosti lidského těla i množství proteinů. Tato tkáň je velice heterogenní a je tvořena řadou typů svalových vláken. Svalové vlákno je tvořeno jednou mnohjadernou buňkou, rhabdomyocytem, která obsahuje v cytoplazmě (sarkoplazmě) myofibrily, které se dále dělí na funkční jednotky, sarkomery. Základní složkou sarkomery jsou myofibrilární proteiny myozin a aktin, umožňující svalovou kontrakci, a regulační proteiny (troponin, tropomyozin, titin, nebulin, aktinin, C- a M-proteiny). Molekula myozinu se skládá ze 6 polypeptidů – 2 těžkých a 4 lehkých řetězců (2 regulační a 2 alkalické). Těžké řetězce obsahují myozinové hlavičky, interagující s aktinem při kontrakci, vazebné místo pro ATP, sloužící také k hydrolýze ATP (zdroj energie pro kontrakci) (*Scott a kol. 2001*).

Svalová vlákna lze dělit dle několika různých kritérií – dle rychlosti kontrakce, histochemického barvení pro myozinovou ATP-ázu, metabolických vlastností nebo typu těžkého řetězce myozinu (MHC – myosin heavy chain). Dělení dle různých kritérií se ne vždy jednoznačně shodují.

Podle rychlosti stahu lze rozlišit vlákna rychlá a pomalá. Rychlá vlákna (typ I) se také označují jako bílá, pomalá (typ II) jako červená, díky vyššímu obsahu myoglobinu a zásobení kapilárami, proto mají vyšší kapacitu oxidativního metabolismu a jsou odolnější vůči únavě.

Dle histochemického barvení pro myozinovou ATP-ázu se původně rozlišovaly 3 základní typy vláken, později byly identifikovány další, takže se rozlišuje u člověka 7 typů vláken: I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAB a IIB (řazeno od nejpomalejších k nejrychlejším).

Další často užívaná klasifikace je založena na biochemické identifikaci enzymů energetického metabolismu. Dle této klasifikace se rozlišují 3 základní typy vláken: rychlá glykolytická (anaerobní), rychlá oxidativní (aerobní) a pomalá oxidativní. Zatímco u pomalých oxidativních vláken existuje dobrá korelace s vlákny typu I, u vláken typu II (resp. jejich podtypů) je situace komplikovanější a chybí významná korelace s rychlými glykolytickými i oxidativními vlákny. Se vzrůstající rychlostí a se zvětšujícím se průměrem svalového vlákna roste aktivita  $\alpha$ -glycerofosfátdehydrogenázy, naopak klesá aktivita sukcinátdehydrogenázy (Rivero a kol. 1998). Rychlá vlákna obsahují více fosfokreatininu a ATP než pomalá. Také hodnoty fosforylačního potenciálu nebo ATP-ázová aktivita jsou u rychlých vláken vyšší (Pette a kol. 1999).

Svalová vlákna lze klasifikovat také dle typu přítomného MHC. Ačkoliv genom člověka obsahuje alespoň 10 genů pro MHC, u dospělých jsou exprimovány pouze 3 (MHCI, MHCIIa a MHCIIb). U malých savců je exprimována navíc izoforma MHCIIx/d, která leží svými vlastnostmi mezi izoformami MHCIIa a MHCIIb. Analýza DNA ovšem prokázala, že izoforma popisovaná u člověka jako MHCIIb odpovídá u malých savců izoformě MHCIIx/d a k expresi nejrychlejší izoformy MHC u člověka nedochází. Každé vlákno může obsahovat více než jednu isoformu MHC, taková vlákna jsou pak označována jako smíšená nebo hybridní. Proto se rozlišuje větší počet typů než by odpovídalo v případě exprese právě jedné izoformy MHC (Pette a kol. 1999; Scott a kol. 2001).

Svalová vlákna se neliší pouze díky expresi různých izoform MHC, také další proteiny existují v různých izoformách, které ovlivňují vlastnosti daného vlákna. Vlákna homogenní z hlediska exprese izoformy MHC mohou být heterogenní z hlediska exprese izoform lehkého řetězce myozinu (MLC – myosin light chain). Přesto se „rychlé“ izoformy MHC spojují většinou s „lehkými“ izoformami MLC a „těžké“ izoformy MHC s „těžkými“ izoformami MLC. Spolu s MHC a MLC jsou koexprimovány i další „rychlé nebo pomalé“ proteiny, a tak můžeme mluvit o specifickém programu genové exprese proteinů typickému pro dané svalové vlákno (Bottinelli a Reggiani 2000).

Nezávisle na použitém typu klasifikace, typ svalového vlákna se může v případě potřeby změnit z jednoho na jiný. Tato přizpůsobivost metabolických a kontraktlních vlastností svalu v reakci na podnět dovoluje adaptaci na různé podmínky (inervace, mechanické a hormonální faktory). Snížené užívání kosterních svalů nebo jejich denervace vede k přeměně směrem k rychlejším svalovým vláknům, dochází také k poklesu aktivity enzymů oxidativního metabolismu. Naopak vytrvalostní trénink vede ke zvyšování oxidativní kapacity a konverzi směrem k pomalejším svalovým vláknům (Scott a kol. 2001). Expresi

MHC ovlivňují také hormony štítné žlázy – hypothyreóza zvyšuje expresi pomalých izoform, hypertyreóza ji naopak inhibuje. Kromě změn izoform MHC může docházet také ke změnám exprese izoform MLC (*Soukup a Jirmanová 2000*).

Jednotlivé kosterní svaly se liší dle zastoupení typů vláken, tyto rozdíly jsou dány jak geneticky, tak faktory prostředí. Pomalá vlákna jsou uzpůsobena pro izometrické kontrakce, spotřebovávají malé množství ATP a díky převažujícímu aerobnímu metabolismu mají velkou výdrž, ovšem vyvíjí pouze nízkou sílu. Proto jsou zastoupeny nejvíce u svalů zajišťujících pomalé opakované kontrakce – dýchací svaly, svaly zajišťující vzpřímené držení těla nebo užívané při chůzi např. m. soleus (SOL). Naproti tomu rychlá vlákna jsou schopná vyvinout intenzivní sílu, ovšem délka kontrakce je krátká, neboť využívají ve větší míře anaerobní metabolismus a snadněji se unaví. Jsou tedy více zastoupeny ve svalech zajišťujících rychlé intenzivní kontrakce – okohybné svaly nebo svaly končetin podílejících se na běhu nebo pohybu prstů např. m. extensor digitorum longus (EDL).

Mezi svaly lišícími se ve svém složení existují významné rozdíly v jejich metabolismu, ale také reakci na různé humorální faktory či fyziologické a patologické podmínky. Tyto rozdíly lze vysvětlit na příkladu svalů SOL a EDL. SOL je za normálních podmínek metabolicky aktivnější než EDL, což prokazují vyšší absolutní hodnoty různých parametrů metabolismu proteinů (týkajících se jak proteosyntézy, tak proteolýzy) (*Kadlcikova a kol. 2004; Muthny a kol. 2008*). Naproti tomu je SOL více odolný ke změnám metabolismu vlivem různých patologických podmínek jako jsou sepse (*Tiao a kol. 1997 b*), popáleniny (*Fang a kol. 1998*), hyperinzulinémie (*Larbaud a kol. 2001*) nebo zánět vyvolaný aplikací terpentýnového oleje (*Muthny a kol. 2008*). Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišnou mírou odpovědi na některé mediátory podílející se na rozvoji proteokatabolismu jako jsou cytokiny nebo glukokortikoidy, známy jsou také rozdíly v aktivaci ubikvitin-proteazomového proteolytického systému (*Tiao a kol. 1997 b*).

U sepse jsou inhibicí proteosyntézy intenzivněji postiženy svaly obsahující převahu rychlých (bílých) než svaly s převahou pomalých (červených) svalových vláken (*Vary a Kimball 1992; Kadlcikova a kol. 2004*), při těžkém průběhu sepse však může být pozorován spíše generalizovaný pokles proteosyntézy, nezávislý na typu svalu (*Lang a kol. 2007*). Podobně jako v případě proteosyntézy závisí míra ovlivnění rychlosti degradace proteinů u sepse na typu svalu. Proteolýza je aktivována výrazněji ve svalech s převahou rychlých svalových vláken než ve svalech složených především z pomalých vláken (*Tiao a kol. 1997 b*).

### 1.2.3 Experimentální modely sepse

Ideální experimentální model sepse by umožňoval přenést poznatky získané na pokusných zvířatech na podmínky sepse u lidí. Sepse je však velice variabilní onemocnění, navíc žádný model nedokáže plně simulovat komplexnost sepse u lidí. Proto se používá mnoho různých modelů sepse, z nichž každý má své výhody a nevýhody.

#### 1.2.3.1 Injekce látky vyvolávající nekrózu

Zdroj zánětu je lokalizován nejčastěji ve svalu nebo subkutánně a je zajištěn injekčním podáním látky vyvolávající nekrózu. Příkladem je subkutánní aplikace terpentýnového oleje, která vyvolá lokální zánět a rozvinutou reakci akutní fáze (*Wusteman a kol. 1990; Muthny a kol. 2008*). Vzhledem k tomu, že zánět není infekční povahy, není ovšem terminologicky správné hovořit v tomto případě o modelu sepse.

#### 1.2.3.2 Modely toxémie

Modely toxémie zahrnují intravenózní nebo intraperitoneální podání agonisty TLR, které vyvolá zánět až šokový stav. Mezi používané agonisty patří zejména endotoxin/lipopolysacharid (glykolipid ze stěny gramnegativních bakterií), CpG DNA (ekvivalent bakteriální DNA bohaté na nemetylované CG dinukleotidy), syntetické lipopeptidy nebo zymosan. Většinou se podává daná látka jednorázově ve vysoké dávce, klinickou situaci ovšem lépe vystihuje kontinuální nízkodávková infuze. K výhodám modelů toxémie patří jednoduchost provedení, vysoká homogenita a tedy dobrá reprodukovatelnost. Na druhou stranu je ale nutné podotknout, že selhávají v plném napodobení sepse při její komplikovanosti, neboť podáváme pouze jednu z mnoha látek podílejících se na patogenezi sepse.

Nejvíce rozšířeným modelem je jednorázové podání vysoké dávky endotoxinu. To vyvolá rychlý, ale pouze přechodný nárůst systémové koncentrace prozánětlivých cytokinů. U septických pacientů dochází spíše k trvalejšímu zvýšení produkce cytokinů, absolutní koncentrace dosahují ale výrazně nižších hodnot (*Remick a Ward 2005*). Citlivost laboratorních zvířat na endotoxin (a zejména hlodavců) je také významně menší než u lidí.

Účinky endotoxinu navíc silně závisí na zvolené dávce, v některých případech tak dochází k výskytu příznaků opačných ve srovnání s těmi, které se nachází v klinické praxi – např. místo zvýšení srdečního výdeje je pozorováno spíše jeho snížení (*Nemzek a kol. 2008; Dyson a Singer 2009*).

### 1.2.3.3 Podání živých bakterií

Modely podání živých bakterií se liší způsobem podání (i.v., i.p., i.m., s.c.), frekvencí podání (bolus vs. kontinuální podání), použitým kmenem bakterie či velikostí inokula. Oproti toxemickým modelům je výhodou imunitní odpověď na celou bakterii. Exogenní podání bakterií ovšem často nevede k infekci díky aktivaci imunitního systému a lýze bakterií komplementem, tudíž tento typ modelu nelze vždy považovat za model infekce, ale v některých případech spíše toxémie (*Buras a kol. 2005*).

### 1.2.3.4 Abdominální sepse

Tyto modely zahrnují chirurgický zákrok v abdominální oblasti s cílem vytvořit peritonitidu. Z hlediska provedení jsou sice náročné, navíc vyžadují anestezii, nicméně lépe vystihují klinický stav.

Vytvoření peritonitidy se může dosáhnout implantací infekčního materiálu. Ačkoliv se k implantaci používají různé infikované materiály (bakteriální suspenze, fekální pelety...), nejvíce je rozšířená implantace fibrinové sraženiny impregnované bakteriemi do peritoneální dutiny, která slouží jako zdroj infekce.

Jinou možností je porušení gastrointestinální bariéry s následným průnikem bakterií. Toho se nejčastěji dosahuje podvazem slepého střeva a jeho následnou perforací (CLP – cecal ligation and puncture). Podvázané střevo je propíchnuto pomocí jehly. Po průniku střevních bakterií se rozvíjí infekce. Stupeň postižení závisí na počtu vpichů, velikosti použité jehly a délce podvázaného střeva. Mezi další faktory ovlivňující symptomy vyvolané CLP patří typ použitého anestetika, případně korekce postoperační hypotermie, podání antibiotika nebo hydratace organismu (ta se doporučuje pro rozvoj hyperdynamické fáze sepse). Užití techniky CLP vyvolává zánětlivé, imunitní, hemodynamické a biochemické změny blížící se sepsi u lidí (*Otero-Anton a kol. 2001; Singleton a Wischmeyer 2003*).



Alternativou CLP je CASP (colon ascendens stent peritonitis) – kontinuální průchod obsahu střeva do peritonea je zajištěn zavedením stentu. Mortalitu lze regulovat pomocí nastavení průměru stentu (*Krarup a kol. 1999*), případně odnětím stentu po určité době (*Zantl a kol. 1998*). Při srovnání s CLP, byly zjištěny při použití CASP vyšší koncentrace cytokinů v séru i tkáních a výraznější průnik bakterií (*Lustig a kol. 2007*). Výhodou oproti CLP je nepřítomnost nekrotické tkáně nebo abscesu.

### 1.3 Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem

BCAA, jmenovitě leucin, isoleucin a valin patří mezi esenciální aminokyseliny, tedy aminokyseliny, jejichž de novo syntéza v organismu je nedostatečná, a tudíž musí být přijímány potravou. Obsah BCAA v běžných potravinách je dostatečně vysoký, takže dosud nebyl popsán syndrom vyvolaný jejich deficitem v potravě.

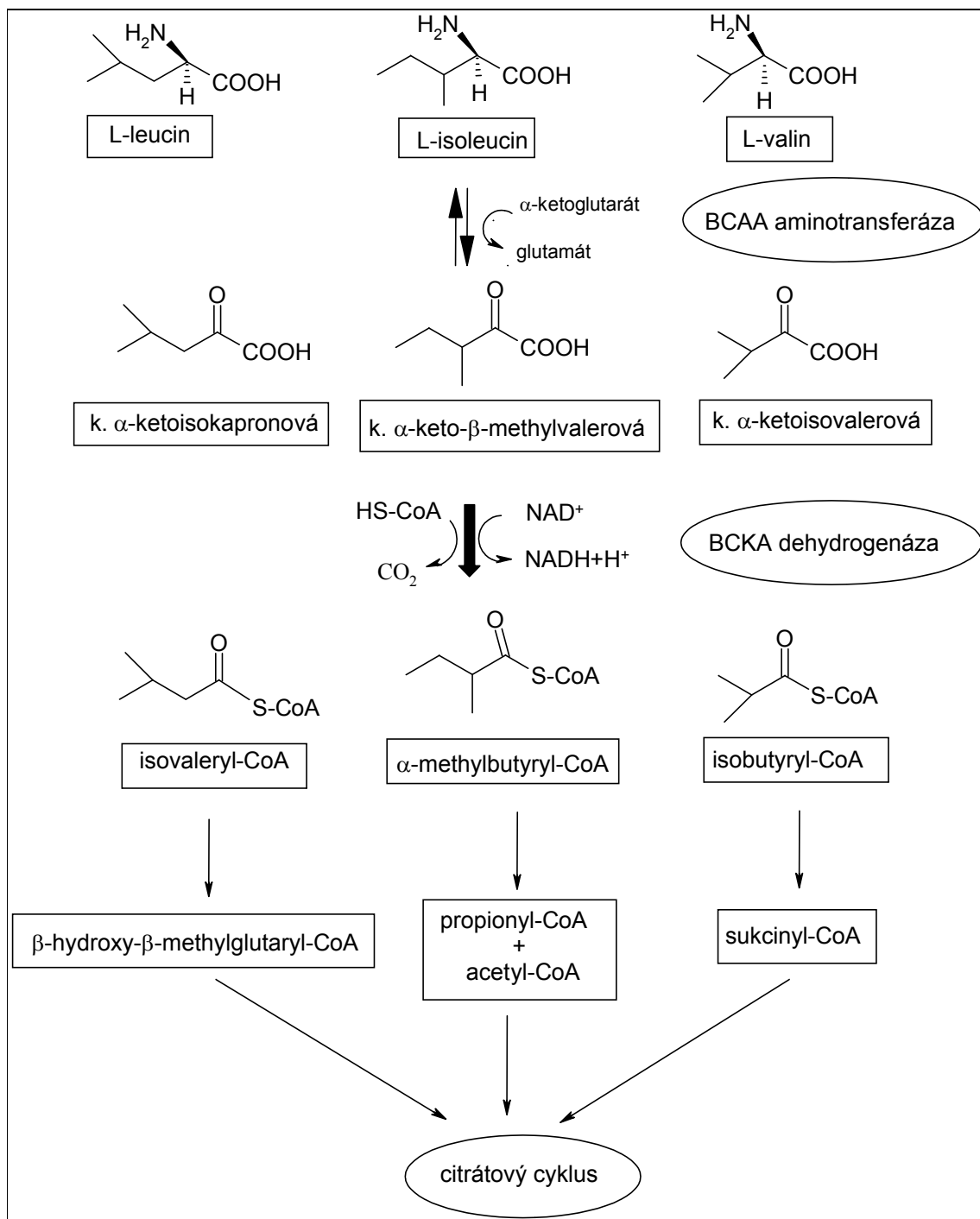
Na rozdíl od jiných aminokyselin, je za normálních podmínek většina potravou získaných BCAA využita na proteosyntézu, jen malá část (10 - 15 %) je oxidována (*Harper a kol. 1984*). O tom jak důležitým substrátem pro syntézu bílkovin jsou BCAA svědčí fakt, že tvoří přibližně třetinu obsahu esenciálních aminokyselin v bílkovinách svalové tkáně. BCAA nejsou pouhým substrátem pro tvorbu bílkovin, podílejí se také na regulaci proteosyntézy a proteolýzy a slouží jako zdroj aminoskupiny při tvorbě alaninu a glutaminu ve svalu (*Kimball a Jefferson 2006*).

#### 1.3.1 Metabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem

Metabolismus BCAA je zahájen reverzibilní transaminací katalyzovanou specifickou BCAA aminotransferázou (BCAT), z aminokyselin vznikají příslušná ketoanalogia (BCKA – branched-chain keto acids) – z leucinu kyselina  $\alpha$ -ketoisokapronová (KIC), z isoleucinu kyselina  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerová (KMV) a z valinu kyselina  $\alpha$ -ketoisovalerová (KIV), současně se přeměňuje  $\alpha$ -ketoglutarát na kyselinu glutamovou (*viz. obr. 3*). Není znám specifický mechanismus regulace BCAT, rychlost transaminace závisí na množství enzymu, substrátu a produktu.

Byly popsány mitochondriální a cytosolické isoenzymy BCAT. Mitochondriální isoenzym BCAT je exprimován ubikvitně (vysoká exprese ve svalu, ledvinách a GIT, nízká

Obrázek 3: Metabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem



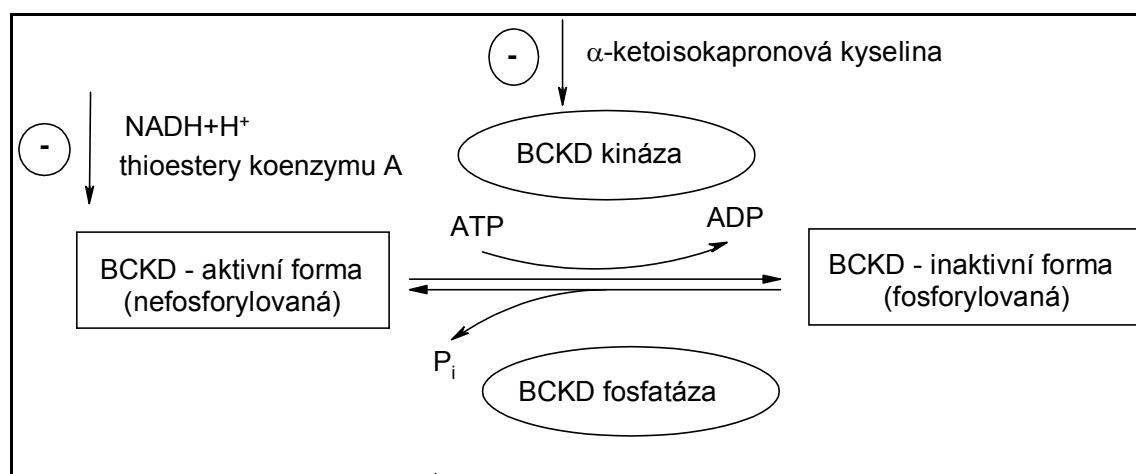
BCAA - aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (branched-chain amino acids); BCKA - ketoanaloga aminokyselin s rozvětveným řetězcem (branched-chain keto acids); CoA – koenzym A

v játrech) v kolokalizaci s komplexem BCKD (branched-chain keto acid dehydrogenase) a podílí se na zahájení katabolismu BCAA. Naproti tomu cytosolický isoenzym BCAT je exprimován výhradně v mozku (u potkana i v placentě, vaječnicích a periferních nervech), kde není exprimována BCKD (*Suryawan a kol. 1998*). Jeho funkcí tedy zřejmě není oxidace BCAA, ale spíše funguje jako součást dusíkového člunku v glutamátergních neuronech (*Sweatt a kol. 2004*).

Dalším a rychlost určujícím krokem metabolismu BCAA je ireverzibilní dekarboxylace ketoanalog aminokyselin mitochondriálním komplexem BCKD za vzniku příslušného thioesteru koenzymu A – z KIC vzniká isovaleryl koenzym A, z KIV  $\alpha$ -metylbutyryl koenzym A a z KIV isobutyryl koenzym A. Enzymový komplex BCKD se skládá z BCKA dekarboxylázy, dihydrolipoamid acyltransferázy a dihydrolipoamid dehydrogenázy.

Aktivita tohoto komplexu podléhá přísné regulaci, a to jak kovalentní, tak alosterické. Alostericky je inhibován NADH a thioestery koenzymu A vznikajících z BCKA (inhibice produktem). Klíčovou složkou regulace aktivity je BCKD kináza, která fosforylací BCKA dekarboxylázy inhibuje její aktivitu (BCKD fosfatáza pomocí defosforylace reaktivuje BCKD). BCKD kináza je alostericky inhibována KIC, její aktivita je také regulována vazbou na komplex BCKD (viz obr. 4) (*Brosnan a Brosnan 2006*). Exprese a aktivita BCKD kinázy je ovlivněna nutričním stavem, hladinou hormonů nebo různými onemocněními, liší se také mezi tkáněmi – nejvyšší aktivita byla zjištěna v ledvinách, játrech, mozku a srdci (*Suryawan a kol. 1998; Shimomura a kol. 2001*).

**Obrázek 4: Regulace aktivity BCKD komplexu**



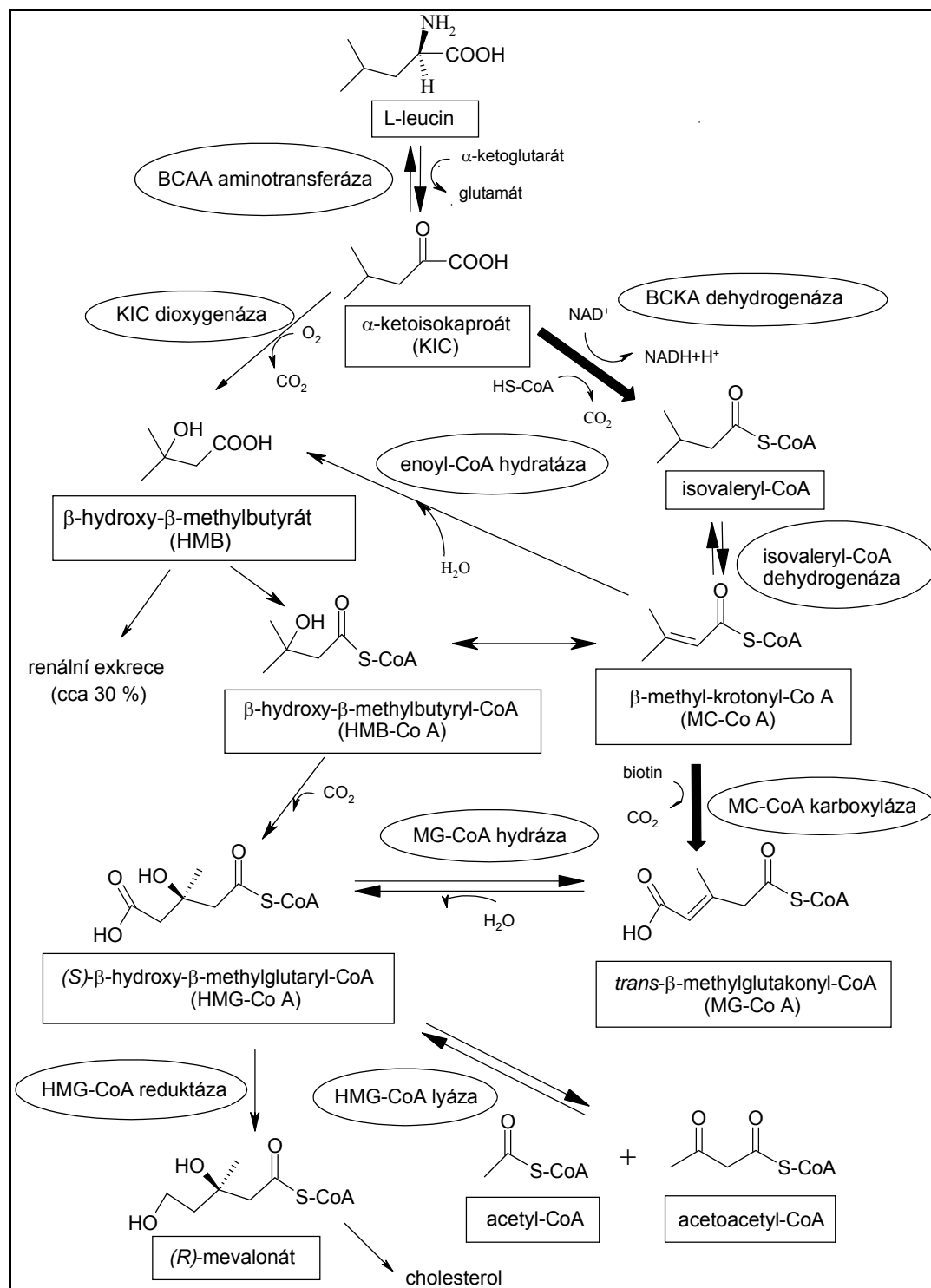
BCKD – dehydrogenáza ketoanalog aminokyselin s rozvětveným řetězcem (branched-chain keto acid dehydrogenase)

Dekarboxylací vzniklé thioestery koenzymu A jsou dále metabolizovány na intermediáty citrátového cyklu, kde jsou přeměněny na oxid uhličitý a vodu. Z leucinu vzniká  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutarylkoenzym A (HMG-CoA), z isoleucinu propionylkoenzym A a acetylkoenzym A, z valinu pak sukcinylkoenzym A.

Alternativní cestu oxidace KIC popsali na počátku 80. let 20. století *Sabourin a Bieber (1982)*. Podle ní je KIC oxidován cytosolickou KIC-dehydrogenázou za vzniku  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrátu (HMB), přeměně na HMB podléhá asi 5-10 % leucinu (*viz obr. 5*). Minoritním zdrojem HMB může být i  $\beta$ -methylkrotonyl koenzym A, ale pouze při nadměrně zvýšených koncentracích (deficit biotinu). *Van Koevering a Nissen (1992)* popsali, že alespoň u prasete je jediným zdrojem pro syntézu HMB leucin.

Nejpravděpodobnější cestou metabolismu HMB je přeměna na HMG-CoA, buďto přímou karboxylací nebo přes  $\beta$ -methylkrotonylkoenzym A. Metabolismus HMB je kromě kondenzace acetylkoenzymu A s acetoacetylkoenzymem A jediným zdrojem HMG-CoA, substrátu pro klíčový enzym syntézy cholesterolu, HMG-CoA reductázu. *In vivo* studie ukazují, že leucin může být významným zdrojem pro syntézu cholesterolu ve svalu (*Nissen a Abumrad, 1997*). Přeměna HMB na cholesterol je v literatuře popsána, kvantitativní podíl HMB na syntéze cholesterolu však dosud stanoven nebyl.

Obrázek 5: Schéma metabolismu leucinu



BCAA - aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (branched-chain amino acids); BCKA – ketoanaloga aminokyselin s rozvětveným řetězcem (branched-chain keto acids)

### 1.3.2 Vliv aminokyselin s rozvětveným řetězcem a jejich metabolitů na metabolismus bílkovin

BCAA nejsou pouze substrátem pro tvorbu proteinů, ale působí také jako regulátory proteosyntézy, proteolýzy nebo biosyntézy a sekrece inzulínu. V regulaci těchto procesů je ze všech tří BCAA nejučinnější leucin (*Kimball a Jefferson 2006*). Proteoanabolickou aktivitu vykazují kromě leucinu také některé jeho metabolity, zejména KIC a HMB, a dodnes není jasné, které z pozorovaných účinků jsou způsobeny přímým působením leucinu a které nepřímým účinkem prostřednictvím jeho metabolitů.

#### 1.3.2.1 Vliv aminokyselin s rozvětveným řetězcem na metabolismus bílkovin

BCAA se podílejí na aktivaci proteosyntézy zásahem do signálních drah regulujících iniciaci translace. Nejučinnějším aktivátorem je leucin; isoleucin a valin jsou mnohem méně účinné. To lze demonstrovat např. na pokusu, kdy potkanům drženým 18 hodin o hladu byla podána některá z BCAA – zatímco podání leucinu vedlo ke stimulaci proteosyntézy, v případě isoleucinu nebo valinu pozitivní účinek na tvorbu bílkovin pozorován nebyl. Leucin vyvolal také mírné přechodné zvýšení sérové koncentrace inzulínu. Ta sama o sobě nevedla ke stimulaci proteosyntézy, ale měla permisivní účinek na působení leucinu. Následná studie studující vliv inzulínu na účinek leucinu prokázala, že část účinků leucinu na proteosyntézu je způsobena mechanismy nezávislými na inzulínu (*Anthony a kol. 2000 a, 2002*).

Při studiu mechanismu účinku leucinu na aktivaci proteosyntézy bylo zjištěno, že leucin stimuluje tvorbu komplexu eIF4F, klíčového komponentu iniciace translace ve fázi vazby mRNA. Dochází ke zvýšené fosforylaci 4E-BP1, což vede k uvolnění eIF4E z vazby na inaktivní komplex s 4E-BP1. Volný eIF4E pak asociuje s eIF4G za tvorby aktivního komplexu eIF4F. K stimulaci proteosyntézy leucinem vede také zvýšená fosforylace eIF4G, S6K1 a jejího substrátu S6, které se podílejí na selektivní translaci mRNA obsahujících polypyrimidinový řetězec, důležitých pro tvorbu translačního aparátu a elongačních faktorů (*Anthony a kol. 2000 a; Bolster a kol. 2004*). Fosforylace 4E-BP1, eIF4G a S6K1 je zčásti mediována pomocí kinázy mTOR, která se účastní na signálních drahách vedoucích k aktivaci proteosyntézy. Zapojení této kinázy potvrzuje také blokáda účinků leucinu pomocí rapamycinu, specifického inhibitoru mTOR (*Anthony a kol. 2000 b*). Na ovlivnění proteosyntézy leucinem se tedy podílí jak mechanismy závislé na inzulínu (signalizace přes

mTOR na 4E-BP1 a S6K1), tak mechanismy na inzulínu nezávislé (nejsou plně objasněny, zřejmě zahrnují fosforylaci eIF4G či jeho asociaci s eIF4E).

Při podání malého množství leucinu bylo popsáno, že změny proteosyntézy korelují se změnami fosforylace eIF4G a asociace eIF4G s eIF4E. Naproti tomu signalizace přes mTOR na 4E-BP1 a S6K1 roste se zvyšujícími koncentracemi leucinu (a také se zvyšujícími se koncentracemi inzulínu), ačkoliv proteosyntéza už od určité koncentrace leucinu dále neroste (*Crozier a kol. 2005*).

Za určitých podmínek není leucin schopen aktivovat tvorbu bílkovin v kosterním svalu. Signální dráhy vedoucí k aktivaci proteosyntézy po podání leucinu jsou kompletně blokovány např. endotoxinem (lipopolysacharidem). Endotoxin brání fosforylaci mTOR, 4E-BP1 a tvorbě aktivního komplexu eIF4F (*Lang a Frost 2005*). Také aktivace 5'-AMP aktivované proteinkinázy (AMPK) vyvolá zabránění rozvoje leucinem indukovaných změn v proteosyntéze (*Przysnak a kol. 2008*).

BCAA, zvláště leucin, se kromě ovlivnění tvorby proteinů podílejí také na regulaci jejich odbourávání. Na modelu nádorové kachexie (adenokarcinom MAC16) bylo zjištěno, že podávání leucinu, ne však isoleucinu nebo valinu, částečně tlumí proteolýzu v kosterním svalu. Vzhledem k tomu, že podávání leucinu současně aktivovalo proteosyntézu, vzrostla vlhká váha sledovaných svalů a došlo k zmírnění úbytku tělesné hmotnosti. Tyto změny byly zřejmě způsobeny inhibicí aktivace PKR (double-strand RNA-dependent protein kinase), tedy snížením poměru fosforylované a nefosforylované formy. Tuto hypotézu potvrzuje také fakt, že byla zjištěna snížená exprese protein fosfatázy 1 (PP1), jejímž známým substrátem je právě PKR (*Eley a kol. 2007 a*).

Při sledování vlivu leucinu na expresi (na úrovni mRNA) genů souvisejících se základními proteolytickými systémy bylo zjištěno, že leucin inhibuje expresi ubikvitinu a C2 podjednotky proteazomu, pouze vysoké dávky leucinu inhibují expresi velké podjednotky m-kalpainu, exprese katepsinu B není leucinem ovlivněna. Účinky leucinu byly sledovány jak *in vitro*, tak *in vivo* pokusech (*Nakashima a kol. 2005*). O důležité roli ubikvitin-proteazomového systému při účinku BCAA na proteolýzu svědčí i studie *Herningtyase a kol. (2008)*, prokazující snížení exprese ubikvitin-ligáz MAFbx/Atrogin-1 a MuRF1 v kosterním svalu vlivem BCAA (na modelu hladovění). Pomocí užití specifických inhibitorů bylo zjištěno, že na snížení exprese ubikvitin-ligázy Atrogin-1 se podílela kináza mTOR, ne PI3K (phosphoinositide-3 kinase). Naproti tomu nebylo zjištěno, že by se na ovlivnění exprese MuRF1 podílela mTOR. V otázce mechanismu účinku leucinu, resp. BCAA při tlumení proteolýzy ovšem nepanuje shoda, neboť práce *Nakashimy a kol. (2005)* vyvrací podíl mTOR

na tlumení myofybrilární proteolýzy a expresi proteazomu vlivem leucinu. Účinek leucinu dle této práce závisí na signálních drahách PI3K a proteinkinázy C.

### 1.3.2.2 Vliv kyseliny $\alpha$ -ketoisokapronové na metabolismus bílkovin

KIC, ketoanalog leucinu, vykazuje schopnost ovlivňovat jak syntézu, tak degradaci proteinů. Bylo zjištěno, že po *in vivo* podání KIC byla stimulace proteosyntézy v kosterním svalu potkana stejně intenzivní jako v případě leucinu, a to díky zvýšení fosforylace 4E-BP1 a S6K1. Účinek KIC na proteosyntézu v kosterním svalu však může být způsoben zpětnou přeměnou na leucin, neboť v játrech, kde je nízká aktivita BCAT (enzymu katalyzujícího přeměnu leucinu na KIC a opačně), vykazovala KIC významně nižší účinnost než leucin (*Yoshizawa a kol. 2004*). Proti této domněnce ovšem svědčí fakt, že v kultuře hepatocytů byl pozorován srovnatelný účinek KIC a leucinu na stimulaci proteosyntézy. Za pomoci užití specifických inhibitorů bylo zjištěno, že se na tomto účinku podílí fosfolipáza C a proteinkináza C (*Yagasaki a kol. 2002*).

Již v 80. letech 20. století byl vysloven předpoklad, že leucin ovlivňuje proteolýzu především nepřímo, pomocí svých metabolitů. *Tischler a kol. (1982)* zjistili, že po přidání cykloserinu, inhibitoru transaminace leucinu, vymizel inhibiční účinek leucinu na proteolýzu v inkubovaném kosterním svalu. To potvrzuje také práce *Nakashimy a kol. (2007)*, která ukazuje výraznější pokles myofibrilární proteolýzy v kosterním svalu hladovějících kuřat po podání KIC než po podání leucinu. Na rozdíl od leucinu, KIC snižuje expresi mRNA pro ubikvitin, pokles exprese mRNA pro katepsin B je po podání KIC výraznější než po podání leucinu. V případě snížení exprese mRNA pro C2 podjednotku proteazomu a m-kalpain jsou KIC a leucin stejně účinné. Také na modelu myotubů (mnohojaderné válcovité trubice, vznikající splýváním rostoucích myoblastů, v jejichž sarkoplazmě se postupně tvoří myofibrily) byla prokázána minimálně stejná, ne-li větší účinnost na snížení proteolýzy u KIC než u leucinu (*Mitchell a kol. 2004*).

O tom, jak ovlivňuje KIC metabolismus proteinů u sepse, máme dodnes pouze kusé informace. Inkubace kosterních svalů získaných ze septických potkanů s KIC neprokázala inhibici proteolýzy (*Hasselgren a kol. 1988 a*), stejně tak infúze KIC nevedla k úpravě dusíkové bilance septických potkanů (*Hasselgren a kol. 1988 b*). Naproti tomu byl zjištěn příznivý vliv infúze KIC na přežívání septických potkanů, jež byl dáván do souvislosti se



snížením poměru oxidovaného a redukovaného glutathionu v plazmě (Yonekura a kol. 1993) či zvýšenou produkcí ketoláték (Hirokawa a Walzer 1999).

### 1.3.2.3 Vliv $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrátu na metabolismus bílkovin

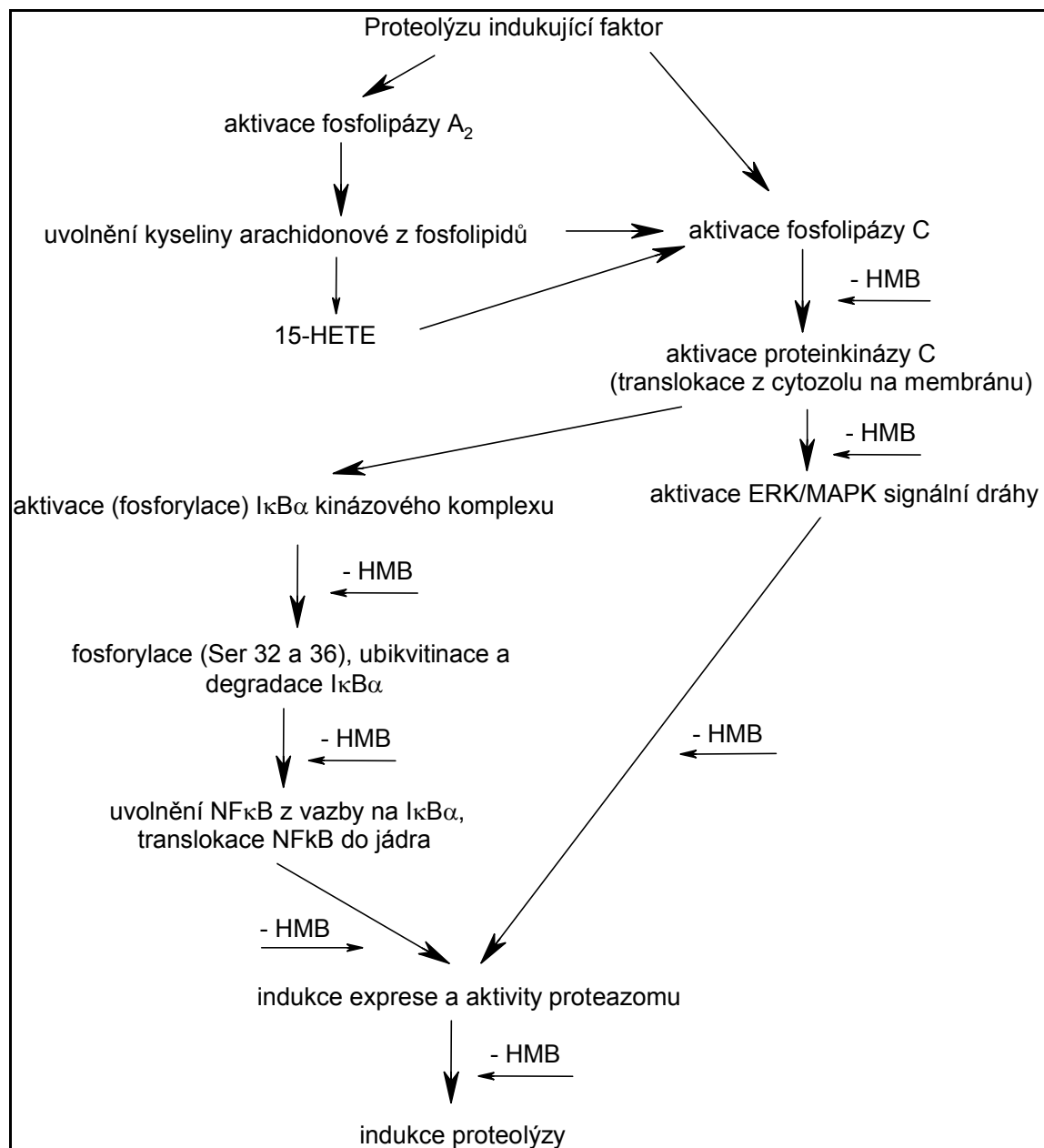
HMB je přirozeným metabolitem leucinu, jenž vykazuje antikatabolické/anabolické (zásah do metabolismu proteinů, lipidů i sacharidů) a protizánětlivé účinky, ovlivňuje imunitní systém či zlepšuje hojení ran. Mechanismus působení HMB nebyl dodnes zcela objasněn. Dlouhou dobu byl vysvětlován teorií spojující jeho účinky se syntézou cholesterolu. HMB může sloužit jako zdroj HMG-CoA, prekurzoru pro syntézu cholesterolu, zejména v situacích, kdy buňka potřebuje jeho zvýšené množství pro syntézu nových nebo poškozených buněčných membrán (Nissen a Abumrad 1997). V recentních pracích je účinek HMB vysvětlován zásahem do různých signálních drah např. NF- $\kappa$ B (Smith a kol. 2004), mTOR (Eley a kol. 2007 b), PKR (Eley a kol. 2008 a) či MAPK (Kornasio a kol. 2009).

HMB stimuluje proteosyntézu obdobnými mechanismy jako leucin. Na modelu kachexie navozené podáním proteolýzu indukujícího faktoru (PIF) (*in vitro* na modelu myotubů) či adenokarcinomem MAC 16 (*in vivo*) bylo zjištěno, že se HMB podílí na fosforylaci mTOR a následně 4E-BP1 a S6K1 a tedy aktivaci proteosyntézy na úrovni iniciace translace. Dalším cílem aktivovaného mTOR je elongační faktor eEF2. Fosforylace eEF2 vede k inhibici jeho aktivity zabráněním jeho interakce s ribozomem. HMB díky fosforylaci (aktivaci) mTOR a S6K1 inhibuje eEF2 kinázu, takže eEF2 zůstává v aktivním (defosforylovaném) stavu. Nezávisle na aktivaci mTOR vyvolává HMB také fosforylaci eIF4G a tedy jeho aktivaci, aktivovaný eIF4G se může vázat na eIF4E, a tak dochází k tvorbě většího množství aktivního komplexu eIF4F. HMB také blokuje aktivaci PKR a následnou fosforylaci eIF2 $\alpha$ , vedoucí k inhibici iniciace translace ve fázi vazby iniciační methionyl tRNA na 40S podjednotku ribozomu (základní schéma popisující mechanismy ovlivnění iniciace translace jsou uvedeny na obr. 2 v kapitole 1.2.2.1 Vliv sepsy na proteosyntézu) (Eley a kol. 2007 b). Na modelu myotubů bylo prokázáno, že HMB účinně brání inhibici proteosyntézy vyvolané angiotensinem II, endotoxinem či kombinací TNF $\alpha$  s INF $\gamma$  (Eley a kol. 2008 b), tyto výsledky však dosud nebyly potvrzeny za podmínek *in vivo*.

Účinky HMB na proteolýzu v izolovaných svalech potkana a kuřete popsal Ostaszewski a kol. (2000). Vlivem HMB došlo k inhibici degradace proteinů, která vykazovala závislost na dávce HMB a typu svalu. Maximální snížení proteolýzy nastalo po

přidání HMB o koncentraci 1 mmol/l do inkubačního média. HMB potlačilo proteolýzu více ve svalech složených z bílých než červených svalových vláken. Na rozdíl od HMB, přídavek leucinu do inkubačního média proteolýzu významně nesnížil. Na modelu myších myotubů byl nalezen příznivý vliv HMB na degradaci proteinů navozenou aplikací PIF. Efekt HMB na PIF indukovanou aktivaci proteazomu a degradaci proteinů byl porovnáván s účinkem ikosapentaenové kyseliny (EPA), známého inhibitoru PIF. Při pokusu byly použity koncentrace 25 a 50  $\mu\text{mol/l}$  u obou zkoušených látek. Při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  bránily HMB i EPA aktivaci celkové proteolýzy, účinek 25  $\mu\text{mol/l}$  HMB byl malý a projevil se jen u nižších hladin PIF. Hodnoty 50  $\mu\text{mol/l}$  EPA a 25 i 50  $\mu\text{mol/l}$  HMB kompletně zabránily PIF indukovanému nárůstu proteolytické aktivity proteazomu. Podobně 50  $\mu\text{mol/l}$  koncentrace HMB i EPA tlumily zvýšenou expresi  $\alpha$ - a  $\beta$ -podjednotek proteazomu, u koncentrace 25  $\mu\text{mol/l}$  nebyla zjištěna změna exprese. Co se týká mechanismu účinku, EPA na rozdíl od HMB mírnila upregulaci cytosolické fosfolipázy A2, a tím také uvolnění arachidonové kyseliny a tvorbu 15-hydroxyikosatetraenové kyseliny. Na druhou stranu HMB i EPA inhibovaly PIF navozenou aktivaci proteinkinázy C, následnou degradaci I $\kappa$ B $\alpha$  ( $\alpha$  podjednotka inhibitoru NF $\kappa$ B) a nukleární akumulaci NF $\kappa$ B. Potlačovaly také fosforylaci p42/44 MAPK (Smith a kol. 2004). Předpokládaný mechanismus účinku HMB na modelu kachexie navozené aplikací PIF je znázorněn na obr. 6. Tlumivý účinek HMB (50  $\mu\text{mol/l}$ ) na proteolýzu na modelu myších myotubů byl potvrzen také po aktivaci degradace proteinů po podání TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , endotoxinu či angiotensinu II. Aplikace těchto látek způsobila aktivaci kaspáz 3 a 8 a následnou autofosforylaci (aktivaci) PKR, která vedla díky aktivaci p38 MAPK ke zvýšené tvorbě reaktivních derivátů molekulového kyslíku (ROS – reactive oxygene species). Je známo, že zvýšená produkce ROS indukuje proteolýzu aktivací ubikvitin-proteazomového systému (Russell a kol. 2007). HMB tyto děje dokázal inhibovat (Eley a kol. 2008 a; Russel a Tisdale 2009). Podobně jako v případě proteosyntézy je ovšem nutné podotknout, že tyto poznatky je nutné porovnat s *in vivo* pokusy.

**Obrázek 6: Předpokládaný mechanismus účinku HMB na modelu kachexie navozené aplikací proteolýzy indukujícího faktoru**



15-HETE –15-hydroxyikosatetraenová kyselina; NFκB – nukleární faktor κB; IκBα – α podjednotka inhibitoru NFκB; ERK – extracelulárními signály regulované kinázy; MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy

V praxi je HMB v současnosti využíván především jako potravní doplněk pro sportovce. Řada studií se zabývala užitím HMB při silovém tréninku, jejich výsledky ovšem nejsou jednoznačné. Zatímco některé studie poukázaly na příznivý vliv suplementace HMB vedoucí ke zvýšené depozici netukové (svalové) hmoty, zvýšení síly, poklesu proteolýzy a plazmatických koncentrací enzymů indikujících poškození svalu (kreatin fosfokináza a laktát dehydrogenáza) (Nissen a kol. 1996; Knitter a kol. 2000; Kraemer a kol. 2009), jiné tyto příznivé účinky vyvrací (Kreider a kol. 1999; Hoffman a kol. 2004; Nunan a kol. 2010). Významný nárůst netukové tělesné hmoty a síly vlivem HMB, doprovázený snížením cvičením navozeného vzrůstu sérové kreatin fosfokinázy a množství dusíku vyloučeného močí ve formě močoviny, prokázala metaanalýza zkoumající vliv dietních suplementů při silovém tréninku (Jowko a kol. 2001). Jiná metaanalýza porovnávající účinek HMB u trénovaných a netrénovaných osob ovšem zjistila pouze malé zvýšení síly u netrénovaných osob, zatímco vliv suplementace HMB u trénovaných jedinců byl zanedbatelný (Rowlands a Thomson 2009).

V posledních letech se zkoumá možnost terapeutického využití HMB při léčbě a prevenci rozvoje kachexie. Účinky HMB byly popsány na modelu kachexie navozené adenokarcinomem MAC16 u myši. Dávka HMB větší než 0,125 g/kg významně snížila pokles tělesné hmotnosti, mírně snížila i rychlost růstu nádoru. Změna v příjmu potravy nebo tekutin nebyla pozorována. Podání HMB nebo kombinace se suboptimální dávkou EPA (0,6 g/kg) mělo mírně nižší účinnost než samotné podání EPA. U všech pokusných skupin byl zjištěn vzrůst vlhké hmotnosti m. soleus oproti kontrole. Degradace proteinů v tomto svalu byla snížena přibližně stejně jak u HMB tak EPA, kombinace nevykazovala synergistický efekt. Analýza tělesné skladby prokázala, že HMB zvýšil množství netukové tkáně. U zvířat s tumorem snižovaly HMB i EPA zvýšenou aktivitu a expresi  $\alpha$ ,  $\beta$  a ATPázových podjednotek proteazomu. Kombinace HMB a EPA snižovala expresi těchto podjednotek výrazněji než v případě jednotlivých látek. HMB na rozdíl od EPA byl schopný kromě snížení degradace proteinů také stimulovat proteosyntézu (Smith a kol. 2005). Suplementace HMB zmírnila u potkanů negativní změny vyvolané rozvojem kachexie indukované karcinosarkomem Walker 256 díky zásahu do intermediárního metabolismu, navíc prodloužila dobu přežití těchto zvířat (Caperuto a kol. 2007).

V klinické praxi se při studiu terapie kachexie používá nejčastěji podání kombinace HMB s některými aminokyselinami (tyto studie však byly provedeny na relativně malém vzorku osob). U pacientů s AIDS či rozvinutým solidním tumorem (nejčastěji gastrointestinální lokalizace) podávání směsi HMB s argininem a glutaminem potlačilo rozvoj

kachexie - bylo pozorováno zvýšení množství netukové (svalové) tkáně a tělesné hmotnosti těchto pacientů (*Clark a kol. 2000; May a kol. 2002*); naproti tomu u pacientů s revmatoidní artritidou nebyla prokázána vyšší účinnost této směsi ve srovnání s placebem (*Marcora a kol. 2005*). U kriticky zraněných osob vedlo podávání směsi HMB s argininem a glutaminem ke zlepšení (negativní) dusíkové bilance, ještě účinnější však bylo podání samotného HMB (*Kuhls a kol. 2007*). Suplementace směsí HMB, argininu a lysinu příznivě ovlivnila sarkopenii (úbytek svalové hmoty ve stáří) – došlo ke zvýšení síly a množství netukové tkáně, vzrostl také obrat proteinů (*Flakoll a kol. 2004; Baier a kol. 2009*). Z výsledků experimentů a několika klinických studií dosud nelze určit přesný mechanismus účinku HMB a zda je jeho podání skutečně efektivní.

## 2. Cíle práce

Hlavními cíli této práce jsou:

- Studium vlivu endotoxinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin v různých typech kosterního svalu a dávkové závislosti těchto změn.
- Posouzení vlivu vybraných metabolitů leucinu (KIC a HMB) na metabolismus bílkovin a aminokyselin a porovnání účinku:
  - za podmínek *in vitro* a *in vivo*;
  - u zdravých potkanů a v proteokatabolických podmínkách;
  - na různé typy kosterních svalů.

### **3. Materiál a metody**

#### **3.1 Pokusná zvířata**

Pokusy byly provedeny na samcích laboratorního potkana kmene Wistar (BioTest Konárovice, ČR), chovaných za standardních světelných a teplotních podmínek (dvanáctihodinový cyklus osvětlení, teplota 22°C, vlhkost vzduchu 55 – 65 %) ve viváriu Lékařské fakulty University Karlovy v Hradci Králové (LF). Před pokusy byli živeni standardní laboratorní dietou (Velaz-Atromin 1320) a vodou *ad libitum*. Pro vyloučení diurnálních rytmů byly pokusy zahajovány mezi sedmou a devátou hodinou ranní. Experimenty byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání LF.

#### **3.2 Endotoxinový/lipopolysacharidový model sepse**

K navození proteokatabolického stavu byl vybrán endotoxinový model sepse, který byl indukován intraperitoneální aplikací endotoxinu/lipopolysacharidu (*E. coli* 0127:B8) v dávce 1-5 mg endotoxinu/kg tělesné hmotnosti (2,5 mg endotoxinu/ml fyziologického roztoku). Kontrolní skupině byl podán fyziologický roztok. Po 24 hodinách od aplikace byla pokusná zvířata využita ke stanovení parametrů metabolismu aminokyselin a bílkovin. Dávka 5 mg/kg endotoxinu byla na základě pokusů zkoumajících závislost množství aplikovaného endotoxinu na metabolismus bílkovin v kosterním svalu vybrána jako nejvhodnější pro další pokusy, neboť vyvolala nejvýznamnější nárůst degradace myofibrilárních proteinů v poměru k proteosyntéze, ale nebyla letální (detailněji viz kapitola 4.1).

### 3.3 Stanovení parametrů metabolismu aminokyselin a bílkovin za podmínek *in vivo*

#### 3.3.1 Metabolismus leucinu a bílkovin za podmínek *in vivo*

Parametry metabolismu leucinu a bílkovin za podmínek *in vivo* byly hodnoceny pomocí infuze značeného leucinu (Wolfe a kol. 1982; Vazquez a kol. 1985), jedné z nevhodnějších metod pro posouzení změn metabolismu proteinů (Rennie a kol. 1994). Do jugulární žíly byla zavedena polyethylenová kanyla, po jejím zavedení bylo zabráněno příjmu potravy pro vyloučení jejího vlivu na sledované parametry. Po 18 hodinách byli potkani umístěni do skleněné metabolické klece a byl jim infundován fyziologický roztok obohacený o L-[1-<sup>14</sup>C] leucin (2,0 μCi/ml). Počáteční dávka v objemu 0,7 ml byla infundována v průběhu 4 min a 35 sekund, následovala udržovací infuze o rychlosti 0,4 ml/h. Ve 210. minutě od zahájení infuze byli potkani usmrceni v celkové anestezii étherem vykrvácením z břišní aorty.

Vydechovaný oxid uhličitý byl vychytáván po dobu 5 minut monoethanolaminem v desetiminutových intervalech mezi 125. a 185. minutou infuze. Průměr ze šesti měření radioaktivity <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> v setrvalém stavu byl použit pro výpočet rychlosti oxidace leucinu. Ve vzorcích krevní plazmy získané bezprostředně po ukončení infuze byla stanovena koncentrace leucinu. Korekční faktor (KF) byl stanoven pomocí infuze [<sup>14</sup>C] bikarbonátu a jeho hodnoty byly vyšší než 90 %. Specifická aktivita, obrat, clearance a oxidace leucinu byly vypočteny pomocí následujících rovnic:

$$\text{Specifická aktivita leucinu (SA}_{\text{Leu}}) \text{ (dpm/}\mu\text{mol)} = \frac{\text{radioaktivita leucinu (dpm/ml)}}{\text{koncentrace leucinu (}\mu\text{mol/ml)}}$$

$$\text{Obrat leucinu (Q}_{\text{Leu}}) \text{ (}\mu\text{mol/h)} = \frac{\text{rychlost infuze (dpm/h)}}{\text{specifická aktivita leucinu (dpm/}\mu\text{mol)}}$$

$$\text{Clearance leucinu (C}_{\text{Leu}}) \text{ (ml/h)} = \frac{\text{obrat leucinu (}\mu\text{mol/h)}}{\text{plazmatická koncentrace leucinu (}\mu\text{mol/ml)}}$$



$$\text{Oxidace leucinu (D}_{\text{Leu}}) \text{ (}\mu\text{mol/h)} = \frac{\text{uvolněný } ^{14}\text{CO}_2 \text{ (dpm/h)}}{\text{specifická aktivita leucinu (dpm}/\mu\text{mol)} \cdot \text{KF}}$$

Byl použit model jednokompartimentového metabolického poolu leucinu reprezentovaného volným leucinem krevní plazmy. Pokud je exogenní příjem (E) leucinu nulový, je obrat leucinu (Q) ukazatelem proteolýzy (B) tak, jak ukazuje rovnice:

$$Q = \text{In} + D = B + E$$

Pomocí této rovnice byly vypočteny hodnoty inkorporace leucinu do proteinů (In), oxidovaná frakce leucinu (OF) a frakce inkorporovaná do bílkovin (IF):

$$\text{OF} = \frac{D \cdot 100}{Q} \quad \text{IF} = \frac{\text{In} \cdot 100}{Q}$$

Oxidace leucinu za podmínek nulového exogenního příjmu potravy odpovídá proteinové bilanci, tedy rozdílu mezi proteolýzou a proteosyntézou. Proteinová bilance vypovídá o metabolismu proteinů lépe než dusíková bilance, která může být významně ovlivněna korekcí deficitu poolu volných aminokyselin (*Walser 1991*).

Analogicky můžeme vypočítat i specifickou aktivitu, obrat a clearance fenylalaninu, ovšem ne jeho oxidaci.

### 3.3.2 Proteosyntéza ve tkáních za podmínek *in vivo*

Vzorky tkání pro stanovení inkorporace leucinu do bílkovin byly odebrány bezprostředně po usmrcení potkana. Vzorek o hmotnosti cca 0,5 gramu byl promyt a homogenizován ve 2% (v/v) kyselině chloristé. Získaný supernatant byl použit pro stanovení specifické aktivity L-[1-<sup>14</sup>C] leucinu. Vzorky byly zbaveny možné kontaminace KIC pomocí 30 % peroxidu vodíku, který vyvolal uvolnění uhlíku karboxylu KIC ve formě oxidu uhličitého. Sediment byl třikrát promyt ve 2% (v/v) kyselině chloristé a následně hydrolyzován ve 2 mol/l hydroxidu sodném. Takto vzniklý hydrolyzát byl použit pro analýzu obsahu bílkovin a stanovení radioaktivity. Frakční syntéza bílkovin byla vypočtena pomocí rovnice odvozené *Garlickem a kol. (1973)*:

$$\frac{\text{Sb}}{\text{Si}} = \frac{\lambda_i}{\lambda_i - K_s} - \frac{1 - e^{-K_s t}}{1 - e^{-\lambda_i t}} - \frac{K_s}{\lambda_i - K_s}$$

kde  $S_b$  je specifická aktivita leucinu vázaného v bílkovinách (dpm/ $\mu$ mol);  $S_i$  - specifická aktivita volného leucinu v dané tkáni;  $\lambda_i$  - rychlostní konstanta nárustu specifické aktivity;  $t$  - doba infuze značené aminokyseliny (den);  $K_s$  – frakce nově syntetizovaných proteinů (%/den). Pro  $\lambda_i$  byla na základě literárních údajů zvolena hodnota 38/den. Analogicky lze vypočítat frakční proteosyntéza i při použití značeného L-[3,4,5- $^3$ H] fenylalaninu. Pro výpočet specifické aktivity aminokyselin vázaných v bílkovinách tkání byly použity následující literární hodnoty: 663 mmol leucinu/g bílkovin a 274 mmol fenylalaninu/g bílkovin (*Welle 1999*).

### **3.4 Stanovení parametrů metabolismu aminokyselin a bílkovin na izolovaných kosterních svalech**

S využitím metody inkubace izolovaného kosterního svalu lze posuzovat vliv různých humorálních i fyzikálních faktorů přímo na metabolismus kosterního svalu (s vyloučením regulačních zásahů v organismu). S cílem posoudit rozdíly v účincích na svaly lišící se ve složení svalových vláken používáme pro inkubaci SOL, tedy sval tvořený převážně z vláken typu I (pomalých, červených vláken), a EDL, sval složený převážně z vláken typu II (rychlých, bílých vláken). Aby byla umožněna dostatečná výměna dýchacích plynů, živin, katabolitů a biologicky aktivních látek mezi buňkami a inkubačním médiem, je nutné použít svaly z mladých zvířat o hmotnosti cca 40-70 g.

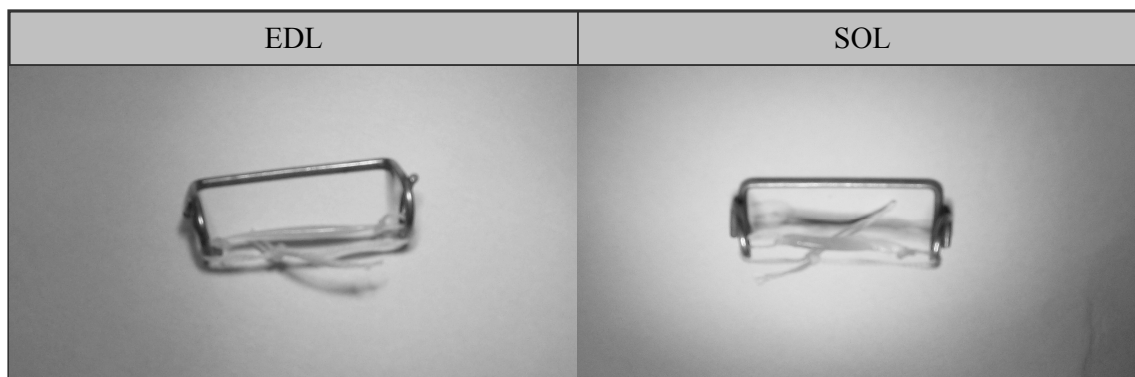
#### **3.4.1 Izolace kosterních svalů**

Izolace kosterních svalů probíhá v celkové anestezii pentobarbitalem (6 mg pentobarbitalu na 100 g tělesné hmotnosti intraperitoneálně) po vykrvení přes abdominální aortu. Z obou zadních končetin se co nejrychleji a nejšetrněji vyjmou svaly SOL a EDL.

Nejdříve je odstraněna kůže ze zadních končetin tak, aby byla odkryta svalovina od kotníků do poloviny steh. Poté je tupou preparací odstraněna povrchová fascie musculus tibialis cranialis (TIB) podél jejího mediálního okraje. Jemnými nůžkami je rozstříženo retinaculum flexorum, a tím uvolněny distální šlachy TIB a EDL. Po této přípravné preparaci jsou flektovány obě zadní končetiny v kyčelních kloubech až do krajní polohy a pomocí lepicí pásky připevněny k operačnímu stolku. Tím je usnadněn přístup ke strukturám na zadní straně

lýtku. Nejdříve je odstraněna povrchová fascie a umístěn podvaz na Achillovu šlachu, která je přestřižena distálně od tohoto podvazu. Pomocí tupé preparace a tahem za Achillovu šlachu je uvolněn m. gastrocnemius a SOL od ostatních struktur. Jemnými nůžkami jsou odstřiženy šlachy flexorů stehna tak, aby byla co nejvíce odkryta proximální šlacha SOL, na kterou je umístěn podvaz, šlacha je co možná nejproximálněji přestřižena. Kombinací tahu, tupé a ostré preparace je oddělen SOL od m. gastrocnemius a rozstřížením distální šlachy je sval úplně uvolněn. Po vyjmutí obou SOL jsou zadní končetiny opět extendovány, pod distální šlachu TIB anterior je umístěn podvaz, který po mediálním odtažení odkryje EDL. Jemnými nůžkami je odstřižena mediálně od proximální šlachy EDL svalovina překrývající její úpon. Poté je podvázána proximální i distální šlacha, rozstřížena a vyjmut sval pomocí tahu a tupé preparace. Vyjmuté svaly jsou okamžitě ponořeny do ledově chladného fyziologického roztoku, ve kterém jsou navázány pomocí ligatur na drátky z inertního materiálu tak, aby byly pod napětím přibližně odpovídajícím klidovému napětí v organismu (*viz obr. 7*) (Maizels a kol. 1977). Potkani byli usmrceni cervikální dislokací.

**Obrázek 7: Izolované svaly navázané na drátek z inertního materiálu**



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus

### 3.4.2 Inkubace izolovaných svalů

Navázané svaly jsou co nejrychleji přeneseny do inkubačních lahvíček (do každé lahvíčky právě jeden sval) s 2,5 ml inkubačního média nasyceného karbogenem (směs 95 % kyslíku a 5% oxidu uhličitého), po uzavření lahvíček je médium karbogenem dosyceno. Inkubační médium odpovídá složením Krebs-Heinseleitovu bikarbonátovému pufru o pH 7,4, modifikovanému o přídavek 6 mmol/l glukózy a 2 mU/ml inzulinu. Další komponenty jsou přidávány v závislosti na měřeném parametru (buďto proteolýza nebo proteosyntéza a oxidace

leucinu). Složení inkubačního média je podrobně popsáno v *tabulce 1*. Svaly jsou preinkubovány v termostaticky kontrolované vodní lázni (37°C) s třepacím zařízením (70 cyklů/minutu), aby byla zajištěna stabilní intramuskulární koncentrace složek přítomných v médiu. Po 30 minutách jsou svaly opláchnuty ve fyziologickém roztoku, krátce osušeny a přeneseny do inkubačních lahvíček obsahujících čerstvý inkubační roztok (identického složení). Viabilita izolovaných svalů byla potvrzena jak v naší laboratoři (*Safránek a kol. 2003*), tak jinými autory (*Fang a kol. 2005*).

**Tabulka 1: Složení inkubačního média**

Kationty	Koncentrace (mmol/l)	Anionty	Koncentrace (mmol/l)	Organické látky	Koncentrace (mmol/l)
K <sup>+</sup>	4,2	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	26,0	Glukóza	6,0
Mg <sup>2+</sup>	0,8	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2,0	Inzulín	40 μU/ml
Na <sup>+</sup>	144,0	Cl <sup>-</sup>	122,8	Aminokyseliny *	3,5
		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,8	Cykloheximid *	0,5

\* - aminokyseliny přítomny v inkubačním médiu pouze při měření proteosyntézy a oxidace leucinu; cykloheximid přítomen pouze při měření proteolýzy

### 3.4.3 Proteosyntéza a oxidace leucinu v izolovaných svaích

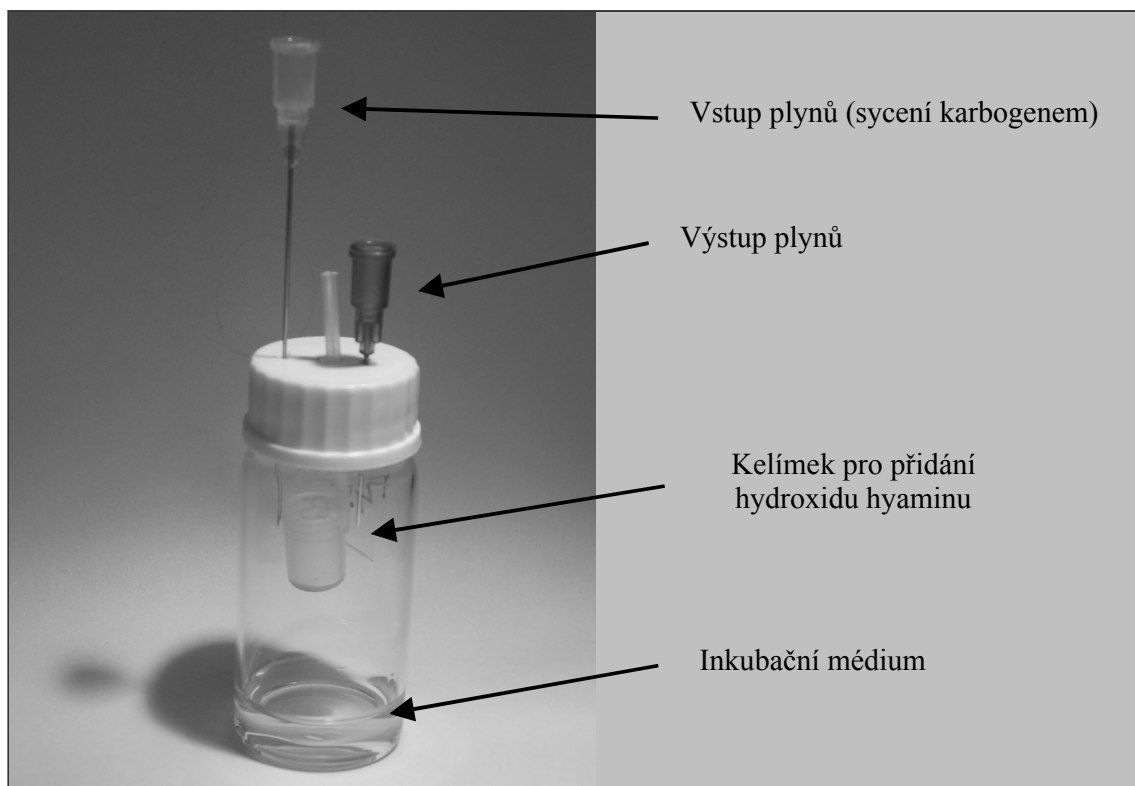
Do inkubačního média pro stanovení proteosyntézy a oxidace leucinu je přidávána směs aminokyselin (aminoplasmal 15 s přidavkem cysteinu, glutaminu, lysinu, serinu, threoninu a tyrozinu), aby výsledné koncentrace přibližně odpovídaly fyziologickým plazmatickým koncentracím. Celková koncentrace aminokyselin v médiu je 3,5 mmol/l. Přesné aminokyselinové složení média je uvedeno v *tabulce 2*. Přidáním aminokyselin do média je dodán základní substrát pro proteosyntézu a zároveň je tak podpořeno udržení intracelulární koncentrace aminokyselin. Médium je dále obohaceno o L-[1-<sup>14</sup>C] leucin v dávce 0,6 μCi/ml. Celková koncentrace značeného a neznačeného leucinu je 150 μmol/l, aby došlo k vyrovnání intracelulární specifické aktivity a specifické aktivity v inkubačním médiu.

Celková délka inkubace svalu je 60 minut. Hodinová inkubace je použita kvůli minimalizaci ovlivnění výsledků degradací proteinů. Přesně po dosažení času inkubace je přidán hydroxid hyaminu do kelímku umístěného nad inkubačním médiem (*viz obr. 8*) a

*Tabulka 2: Koncentrace aminokyselin v inkubačním médiu pro stanovení proteosyntézy a oxidace leucinu*

Aminokyselina	c ( $\mu\text{mol/l}$ )	Aminokyselina	c ( $\mu\text{mol/l}$ )
Alanin	433	Leucin	150
Arginin	159	Lysin	403
Cystein	50	Methionin	66
Fenylalanin	60	Prolin	110
Glutamin	610	Serin	219
Glycin	441	Threonin	182
Histidin	58	Tryptofan	18
Isoleucin	77	Tyrozin	80
Kyselina asparagová	103	Valin	106
Kyselina glutamová	190	<b>Celkem</b>	<b>3515</b>

*Obrázek 8: Inkubační lahvička s kelímkem pro přidání hydroxidu hyaminu*



metabolismus svalu je ukončen přidáním 0,2 ml 35% (v/v) kyseliny chloristé do inkubačního média. Poté se inkubační lahvičky nechají hodinu třepat, aby se dosáhlo kompletní absorpce  $^{14}\text{CO}_2$  do hydroxidu hyaminu. Z inkubačních lahviček jsou vyjmuty kelímky s hydroxidem hyaminu a svaly.

Hydroxid hyaminu v kelímku během vytřepávání vychtá všechny oxid uhličitý přítomný v inkubační lahvičce včetně  $^{14}\text{CO}_2$  vzniklého oxidací L-[1- $^{14}\text{C}$ ] leucinu. Množství vychtaného  $^{14}\text{CO}_2$  je kvantifikováno na scintilačním detektoru a s využitím specifické aktivity leucinu je vyjádřeno jako množství zoxidovaného leucinu v nmol leucinu/g svalu/h. Svaly jsou po vyjmutí z inkubačních lahviček zbaveny podvazů a šlach, omyty v 6 % (v/v) kyselině chloristé, osušeny a zhomogenizovány v 6% (v/v) kyselině chloristé. Homogenát se centrifuguje 5 minut při 12 000 g, sediment je třikrát promyt 1 ml 6 % (v/v) kyselině chloristé, do zpracování se uchovává při  $-30^\circ\text{C}$ . Inkorporace L-[1- $^{14}\text{C}$ ] leucinu do precipitovaných proteinů se stanovuje po hydrolyze v 1 mol/l hydroxidu sodném. Část hydrolyzátu je použita pro stanovení aktivity L-[1- $^{14}\text{C}$ ] leucinu, část pro stanovení koncentrace proteinů. Proteosyntéza je vyjádřena v nmol inkorporovaného leucinu/g proteinu/h.

Při každém experimentu je také měřena v každém svalu aktivita volného L-[1- $^{14}\text{C}$ ] leucinu. Tento parametr dovoluje posoudit, zda mezi experimentálními skupinami nedošlo k rozdílné míře vstupu leucinu do svalu.

#### **3.4.4 Celková a myofibrilární proteolýza v izolovaných svaích**

Inkubační médium pro stanovení proteolýzy je obohaceno o 0,5 mmol/l cykloheximidu (synonyma aktidion, naramycin A), inhibitoru proteosyntézy eukaryotních organismů (váže 80S podjednotku eukaryotního ribosomu). V našich podmínkách inhibicí proteosyntézy znemožníme reinkorporaci aminokyselin, uvolněných při rozpadu bílkovin, do proteinů svalu. Doba inkubace svalu je při tomto stanovení 120 minut, po uplynutí tohoto času je sval vyjmut z inkubačního média. Médium je použito pro stanovení koncentrace tyrozinu (a ostatních aminokyselin) a 3-methylhistidinu. Svaly je možné zamrazit v tekutém dusíku a použít pro stanovení aktivity proteolytických enzymů (chymotrypsin-like aktivita proteazomu nebo aktivita katepsinů B a L).

Tyrozin se v kosterním svalu nesyntetizuje ani nemetabolizuje, a tudíž zůstává intracelulární pool tyrozinu během inkubace konstantní, a tak množství uvolněného tyrozinu odpovídá celkové proteolýze ve svalu. Uvolňování tyrozinu do inkubačního média je

zjišťováno na základě jeho koncentrace a vlhké váhy svalu. Koncentraci tyrozinu stanovujeme pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) po předkolonové derivatizaci s 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidylkarbamátem (viz kapitola 3.4.5 Stanovení koncentrace aminokyselin). Celková proteolýza je vyjádřena v nmol uvolněného tyrozinu/g svalu/h.

3-methylhistidin ( $N_{\epsilon}$ -methyl-L-histidin) vzniká posttranslační methylací histidinu a vyskytuje se specificky v myofibrilárních proteinech (aktinu a myozinu), a proto množství 3-methylhistidinu uvolněné do inkubačního média slouží pro zjištění myofibrilární proteolýzy. Myofibrilární proteolýza je vyjádřena v nmol uvolněného 3-methylhistidinu/g svalu/h. Koncentrace 3-methylhistidinu stanovujeme pomocí HPLC metody založené na reakci s fluorescaminem (4-fenylspiro[furan-2-(3H),1'-naftalan]-3,3'-dion) (Wassner a kol. 1980; Lowell a kol. 1986). Ke 100  $\mu$ l odebraného média (uchovávaného až do vlastního stanovení při  $-30^{\circ}\text{C}$ ) se přidá 75  $\mu$ l 0,2 mol/l borátového pufru o pH 8,5 a 125  $\mu$ l roztoku fluorescaminu v acetonitrilu (2,4 mmol/l v reakční směsi). Po 5 minutách inkubace je směs okyselená přidávkem 20  $\mu$ l 70 % kyseliny chloristé a inkubována 60 minut při  $80^{\circ}\text{C}$ . Poté jsou vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu a neutralizovány 200  $\mu$ l 0,5 mol/l citronanu sodného. Zneutralizovaná reakční směs je analyzována pomocí HPLC (Waters: separační modul 2695, fluorescenční detektor 2475, software Empower 2; Milford, MA, USA).

Chromatografické podmínky:

Nástřík: 50  $\mu$ l vzorku

Kolona: C18 4 x 3 mm (předkolona) + Kromasil C18 (ODS) 150 x 3,2 mm; 5  $\mu$ m (Phenomenex)

Detekce: fluorescence -  $\lambda_{\text{excitační}} = 250 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisní}} = 395 \text{ nm}$

Teplota: kolona –  $37^{\circ}\text{C}$ ; vzorek –  $20^{\circ}\text{C}$

Průtok: 0,7 ml/min

Mobilní fáze:

A – 50 mmol/l hydrogenufosforečnan sodný (pH = 6,5): destilovaná voda:

acetonitril v poměru 20:59:21

B – 70% acetonitril

Gradient:

Čas (min)	% A	% B
0,0	100	0
11,0	100	0
11,5	20	80
17,0	20	80
17,5	100	0
27,0	100	0

### 3.4.5 Stanovení koncentrace aminokyselin

Koncentrace aminokyselin byly stanovovány v plazmě, inkubačním médiu a homogenátu svalů. Plazma byla deproteinována stejným objemem 8% kyseliny sulfosalicylové s přidavkem 100  $\mu\text{mol/l}$  norleucinu jako vnitřního standardu. Deproteinovaná plazma byla neutralizována přidavkem stejného objemu 0,2 mol/l kyseliny borité v 0,2 mol/l hydroxidu sodném. Médium po inkubaci SOL nebo EDL bylo deproteinováno 8% kyselinou sulfosalicylovou s přidavkem 100  $\mu\text{mol/l}$  norleucinu v poměru 9:1 (9 dílů média, 1 díl kyseliny sulfosalicylové). Deproteinované médium bylo neutralizováno přidavkem stejného objemu 0,2 mol/l borátového pufru o pH 8,8. Sval byl homogenizován v 0,4 ml deproteinačního činidla (100  $\mu\text{mol/l}$  norleucinu v 0,34 mol/l kyselině chloristé) a centrifugován 5 minut při 13 400 ot/min. (12 000g). Supernatant byl neutralizován přidavkem stejného objemu 0,2 mol/l kyseliny borité v 0,2 mol/l hydroxidu sodném. Takto upravené vzorky plazmy nebo média byly skladovány až do analýzy při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Stanovení aminokyselin pomocí HPLC (Waters: separační modul 2695, fluorescenční detektor 2475, software Empower 2; Milford, MA, USA) bylo provedeno po předkolonové derivatizaci s 6-aminochinolyln-N-hydroxysukcinimidylkarbamátem. Ke vzorkům byl přidán 0,2 mol/l borátový pufr o pH 8,8 s přidavkem 5 mmol/l EDTA a roztok 6-aminochinolyln-N-hydroxysukcinimidyl karbamátu v acetonitrilu v poměru 1 : 3 : 1. Po promíchání byla směs vložena do termostatu, kde byla inkubována 10 minut při  $55^{\circ}\text{C}$  (Cohen a Michaud 1993; Reverter a kol. 1997).



Chromatografické podmínky:

Nástřik: 5  $\mu$ l vzorku

Kolona: NovaPak C18 (ODS) 150 x 3,9 mm; 4  $\mu$ m (Waters)

Detekce: fluorescence -  $\lambda_{\text{excitační}} = 250$  nm;  $\lambda_{\text{emisní}} = 395$  nm

Teplota: kolona – 37°C; vzorek – 20°C

Průtok: 1 ml/min

Mobilní fáze:

A – acetonitril

B – destilovaná voda

C – pufr o pH 5,75 (140 mmol/l octan sodný, 13 mmol/l kyselina fosforečná, 17 mmol/l triethanolamin, 2,7  $\mu$ mol/l edetan disodný)

Gradient:

Čas (min)	% A	% B	% C
0	0,0	80,0	20,0
1	1,0	79,0	20,0
17	3,0	85,0	12,0
26	6,0	87,0	7,0
30	9,6	80,4	10,0
31	10,5	19,5	70,0
36	15,0	15,0	70,0
45	16,5	13,5	70,0
46	60,0	40,0	0,0
51	0,0	80,0	20,0
60	0,0	80,0	20,0

### 3.5 Stanovení aktivity a exprese proteolytických enzymů

#### 3.5.1 Chymotrypsin-like aktivita proteazomu

Chymotrypsin-like aktivita proteazomu (ChTLA) byla stanovována s využitím specifického fluorogenního substrátu Sukcinyl-leucyl-leucyl-valyl-tyrosyl-4-methylkumaryl-

7-amidu (Suc-LLVY-MCA) a inhibitoru proteazomu MG132 (*Gomes-Marcondes a Tisdale 2002*). Po inkubaci určené pro stanovení proteolýzy je sval (SOL, EDL) homogenizován v 0,4 ml chlazeného 20 mmol/l Tris pufru pH 7,5, obsahujícím 2 mmol/l ATP, 5 mmol/l chloridu hořečnatého a 1 mmol/l dithiotreitolu. Při stanovení ChTLA v jiných tkáních se použije na 100 mg příslušné tkáně 1 ml homogenizačního média. Homogenát se centrifuguje 10 minut při 18 000 g a 4°C. 100 µl odebraného supernatantu se inkubuje v ledové lázni paralelně ve 2 sériích – v jedné s přídavkem 100 µl substrátu Suc-LLVY-MCA (0,05 mmol/l), v druhé s přídavkem 100 µl směsi substrátu Suc-LLVY-MCA (0,05 mmol/l) a inhibitoru MG132 (0,02 mmol/l). Po 1 hodině se zastaví reakce přidáním 1 ml 100 mmol/l octanového pufru o pH 4,3. Poté se ihned stanovuje fluorescence vzorků při excitační vlnové délce 340 nm a emisní vlnové délce 440 nm (Tecan Infinite<sup>TM</sup> 200). Kalibrační křivka byla stanovena pomocí 7-amino-4-methylkumarinu, aktivitu vyjadřujeme v nmol uvolněného 7-amino-4-methylkumarinu/g proteinu/h. Obsah proteinů byl zjištěn metodou dle Lowryho. Výsledná aktivita v daném vzorku se zjistí odečtením aktivity neinhibované a inhibované série.

### 3.5.2 Aktivita katepsinů B a L

Aktivita lysozomálních proteolytických enzymů, katepsinů B a L, byla zjišťována s pomocí specifického fluorogenního substrátu Z-Fenylalanyl-Arginyl-7-amido-4-methylkumarin hydrochloridu (Z-FA-MCA) a inhibitoru Z-Fenylalanyl-Fenylalanyl-fluoromethylketonu (Z-FF-FMK) (*Koohmaria a Kretchmar 1990; Tardy a kol. 2004*). Asi 20 mg vzorku měřené tkáně se zhomogenizuje v 0,6 ml vychlazeného 300 mmol/l octanového pufru o pH 5,0, obsahujícím 4 mmol/l EDTA, 8 mmol/l dithiothreitolu a 0,2 % (v/v) Tritonu X-100. Homogenát se nechá stát 30 min v ledové lázni a poté se centrifuguje 30 min při 18 000 g a 4°C. Další postup se liší v závislosti na typu měřené tkáně. V případě kosterního svalu se 10 µl odebraného supernatantu inkubuje paralelně ve 2 sériích v termostátované vodní lázni (při 37°C) s třepacím zařízením (70 cyklů/minutu) – v jedné s přídavkem 190 µl specifického substrátu Z-FA-MCA (0,04 mmol/l), v druhé s přídavkem 190 µl směsi substrátu Z-FA-MCA (0,04 mmol/l) a inhibitoru Z-FF-FMK (0,1 mmol/l). Při měření jiného typu tkáně, než je kosterní sval, je nutné nejprve odebraný supernatant desetinásobně naředit homogenizačním puffrem. Teprve takto naředěný supernatant lze použít pro inkubaci. Po 15 minutách se zastaví reakce přidáním 1 ml 100 mmol/l octanového pufru o pH 4,3. Následné měření fluorescence vzorku a výpočet aktivity vzorků je shodné se zjišťováním ChTLA.

### 3.5.3 Exprese $\alpha$ -podjednotek proteazomu

Vzorky obsahující 15  $\mu\text{g}$  cytosolických proteinů, připravené naředěním supernatantu získaného ze vzorků pro stanovení ChTLA, byly smíchány s Laemliho vzorkovým pufrům a separovány za využití SDS-PAGE elektroforézy (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného) na 12% gelu. Proteiny byly poté přeneseny na nitrocelulóзовou membránu o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Nespecifická vazebná místa byla přes noc blokována 5% odtučněným mlékem ve fosfátovém pufru při 4°C. Primární protilátky (myší monoklonální protilátky proti  $\alpha 1+2+3+5+6+7$  podjednotkám 20S proteazomu) byly použity v ředění 1:1000, sekundární protilátky konjugované s peroxidázou (kozy IgG protilátky proti myším protilátkám) v ředění 1:4000. Inkubace s protilátkami probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Vizualizace proteinů bylo dosaženo využitím chemiluminiscenční detekce. Denzita proteinů byla následně kvantifikována pomocí GS-800 kalibrovaného denzitometru a softwaru Quantity One v. 4.2.2 (Bio Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA).

## 3.6 Ostatní metody

### 3.6.1 Stanovení bílkovin

Koncentrace proteinů byla měřena dle *Lowryho a kol. (1951)*. Principem metody je tvorba komplexů dvojmocných iontů mědi s dusíkem peptidové vazby za redukce na jednomocné ionty mědi. Ty spolu s radikálovými skupinami cysteinu, tryptofanu a tyrozinu reagují s Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého zbarvení s maximální absorbcí při vlnové délce 730 nm (microplate reader model 680; Bio Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA).

### 3.6.2 Měření radioaktivity

Radioaktivita vzorků byla měřena ve scintilačním roztoku SLD41 pomocí scintilačního počítače radiaktivity LS 6000 (Beckman Instruments, Kalifornie, USA) v Radioizotopových laboratořích LF.

### 3.6.3 Biochemické vyšetření krve

Biochemická vyšetření z krve potkanů byla prováděna na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Plazmatické koncentrace glukózy, lipidů a močoviny byly stanoveny komerčními kity (Boehringer, Mannheim, Německo; Elitech, Sées, Francie; Pliva-Lachema, Brno, ČR).

### 3.6.4 Stanovení poměru suché a vlhké hmotnosti

Poměr suché a vlhké hmotnosti vnitřních orgánů byl vypočítán po stanovení vlhké hmotnosti ihned po vyjmutí orgánu a suché hmotnosti po 3 dnech sušení v sušárně při teplotě 55°C.

## 3.7 Materiál

HMB (vápenatá sůl) byl darován společností Metabolic Technologies, Inc. (Ames, IA, USA). L-[1-<sup>14</sup>C] leucin byl zakoupen od GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Velká Británie); L-[3,4,5-<sup>3</sup>H] fenylalanin od American Radiolabeled Chemical, Inc. (St. Louis, MO, USA), [<sup>14</sup>C] bikarbonát od Du Pont-NEN (Bad Homburg, Německo) lipopolysacharidy z *E. coli* 0127:B8 (endotoxin), aminokyseliny, cykloheximid, Folin-Ciocalteuovo fenolové činidlo, Suc-LLVY-MCA, Z-FA-MCA, Z-FF-FMK a albumin od Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA); Aminoplasma 15 od B. Braun Medicals (Melsungen, Německo); MG132 od Biomol (Hamburg, Německo); osmotické pumpy 2001D od Alzet Osmotic Pumps (Cupertino, CA, USA); myšší monoklonální protilátky proti 20S podjednotkám proteazomu  $\alpha$ 1+2+3+5+6+7 (klon MCP231) a kozí antimyšší protilátky od Abcam (Cambridge, Velká Británie). Zbývající chemikálie byly pořízeny od Sigma

Chemicals (St Louis, MO, USA), Bio-Rad (Hercules, CA, USA), Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK), Waters (Milford, MA, USA) a Pliva Lachema (Brno, ČR).

### **3.8 Statistické zpracování dat**

Data byla zpracována pomocí statistického programu NCSS 2001 a PASS (NCSS Raysville, UT, USA). Jsou uváděna jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba průměru (SEM – standard error mean). Rozdíly byly považovány za statisticky významné při hladině významnosti  $P \leq 0,05$ . Použité testy jsou uvedeny vždy u příslušných výsledků, nejčastěji jde o kombinaci jednocestné analýzy variance (ANOVA) s Tukey-Kramerovým post-hoc testem nebo o nepárový t-test. Parametrické testy byly použity pouze v případě, kdy nebylo vyloučeno normální rozdělení dat.

## 4. Výsledky

### 4.1 Vliv endotoxinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin v kosterním svalu – dávková závislost

Cílem této pilotní studie bylo určit vhodnou dávku endotoxinu, jež není letální a jejíž aplikace potkanům navodí zvýšenou degradaci proteinů kosterního svalu a mohla by sloužit jako model proteokatabolického stavu.

Pokusná zvířata byla rozdělena do 4 experimentálních skupin. Potkanům byl intraperitoneálně injikován endotoxin v dávce 1, 3 a 5 mg/kg tělesné hmotnosti, kontrolní skupině fyziologický roztok. U části zvířat byly po 24 hodinách od aplikace izolovány svaly (EDL a SOL) pro stanovení parametrů metabolismu bílkovin a aminokyselin, odebrány vnitřní orgány (srdce, játra, slezina, ledviny) ke zjištění případných změn ve vlhké a suché hmotnosti těchto orgánů a plazma pro stanovení koncentrace aminokyselin, glukózy, lipidů a močoviny. U další části byla injikována po 24 hodinách od aplikace do vena saphena směs značeného a neznačeného fenylalaninu v objemu 0,5625 ml/ 100 g (50  $\mu$ Ci L-[3,4,5-<sup>3</sup>H] fenylalaninu; 168,75  $\mu$ mol/100 g). Po 10 minutách byla zvířata usmrcena a odebrána plazma a svaly (EDL a SOL) pro stanovení proteosyntézy.

Interval 24 hodin byl zvolen, protože se osvědčil nejen u endotoxinového, ale i obdobných modelů proteokatabolismu (ligace a punkce céka či aplikace terpentýnového oleje) a je dostačující i pro sledování vlivu různých látek na metabolismus proteinů u těchto stavů, v neposlední řadě je také výhodný a praktický pro vlastní zajištění pokusů.

Zvířata z kontrolní skupiny přibrala za 24 hodin po aplikaci fyziologického roztoku průměrně 4 gramy, což odpovídá 8 % tělesné hmotnosti. U potkanů, kterým byl aplikován endotoxin o dávce 1 mg/kg, nedošlo k nárůstu tělesné hmotnosti, vyšší dávky endotoxinu způsobily její úbytek, nejvýraznější v případě dávky 5 mg endotoxinu/kg (-2 gramy resp. -4 %). U všech dávek endotoxinu dosáhl rozdíl tělesné hmotnosti 24 hodin po aplikaci statistické významnosti ve srovnání s kontrolou, významně se lišil i při srovnání skupin 1 a 5 mg endotoxinu/kg (*viz tabulka 3*).

**Tabulka 3: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na tělesnou hmotnost pokusných zvířat**

Experimentální skupina	Tělesná hmotnost			
	$m_0$ (g)	$m_{24}$ (g)	$\Delta m$ (g)	$\Delta m$ (%)
Kontrola (n=20)	55 ± 2	59 ± 2	4 ± 0	8 ± 1
Endotoxin 1 mg/kg (n=20)	55 ± 2	55 ± 2	0 ± 1* <sup>K</sup>	0 ± 1* <sup>K</sup>
Endotoxin 3 mg/kg (n=20)	61 ± 4	60 ± 4	-1 ± 1* <sup>K</sup>	-2 ± 1* <sup>K</sup>
Endotoxin 5 mg/kg (n=20)	60 ± 3	58 ± 2	-2 ± 1* <sup>K,1</sup>	-4 ± 1* <sup>K,1</sup>

$m_0$  – hmotnost zvířete v době aplikace endotoxinu/fyziologického roztoku;  $m_{24}$  – hmotnost zvířete 24 hodin po aplikaci endotoxinu/fyziologického roztoku;  $\Delta m$  – změna hmotnosti zvířete ( $m_{24} - m_0$ )

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \*<sup>K</sup> - signifikantní rozdíl vs. Kontrola; \*<sup>1</sup> - signifikantní rozdíl vs.

Endotoxin 1 mg/kg při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Podání endotoxinu významně neovlivnilo vlhkou ani suchou hmotnost sledovaných vnitřních orgánů (játra, ledviny, slezina, srdce) pokusných zvířat, v *tabulce 4* je zaznamenán poměr suché a vlhké hmotnosti těchto orgánů.

**Tabulka 4: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na poměr suché a vlhké hmotnosti vnitřních orgánů**

Experimentální skupina	Poměr suché a vlhké hmotnosti (%)			
	Játra	Ledvina	Slezina	Srdce
Kontrola (n=8)	28,5 ± 0,7	21,3 ± 0,8	21,6 ± 0,4	20,8 ± 0,8
Endotoxin 1 mg/kg (n=8)	27,6 ± 1,1	21,7 ± 0,3	21,1 ± 0,2	20,1 ± 1,1
Endotoxin 3 mg/kg (n=8)	27,6 ± 0,3	22,3 ± 0,6	21,4 ± 0,7	20,6 ± 1,4
Endotoxin 5 mg/kg (n=8)	26,6 ± 1,2	21,4 ± 0,4	21,4 ± 0,8	20,2 ± 1,1

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM.

Po podání endotoxinu v dávce 3 a 5 mg/kg významně vzrostla plazmatická koncentrace celkového cholesterolu (zvýšení o 27, resp. 28 %), koncentrace triacylglycerolů pouze v případě dávky 5 mg/kg (nárůst o 42 %). Plazmatické koncentrace glukózy, močoviny, HDL a LDL cholesterolu se významně mezi jednotlivými skupinami nelišily (viz *tabulka 5*). Změny plazmatických koncentrací aminokyselin jsou znázorněny v *tabulce 6*. Plazmatické koncentrace alaninu, asparaginu, glycinu, methioninu, serinu, threoninu a všech tří BCAA (tedy leucinu, isoleucinu a valinu) oproti kontrolám vzrostly, naproti tomu koncentrace

kyseliny glutamové poklesla. Celková koncentrace aminokyselin v plazmě se významně nezměnila.

**Tabulka 5: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na plazmatickou koncentraci lipidů, glukózy a močoviny**

	Plazmatická koncentrace (mmol/l)			
	Kontrola (n=10)	E 1 mg/kg (n=10)	E 3 mg/kg (n=10)	E 5 mg/kg (n=10)
Glukóza	10,69 ± 0,39	11,12 ± 0,29	10,80 ± 0,08	11,28 ± 0,34
Močovina	6,0 ± 0,4	6,3 ± 0,2	5,9 ± 0,5	6,2 ± 0,4
Celkový cholesterol	1,35 ± 0,08	1,59 ± 0,09	1,72 ± 0,11* <sup>K</sup>	1,73 ± 0,13* <sup>K</sup>
HDL cholesterol	1,02 ± 0,06	1,17 ± 0,03	1,11 ± 0,11	1,10 ± 0,10
LDL cholesterol	0,34 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,41 ± 0,04
Triacylglyceridy	0,53 ± 0,03	0,56 ± 0,07	0,62 ± 0,09	0,75 ± 0,09* <sup>K</sup>

E – endotoxin; HDL – high density lipoproteins; LDL – low density lipoproteins

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \*<sup>K</sup> - signifikantní rozdíl vs. Kontrola.

V EDL vlivem endotoxinu poklesla koncentrace většiny aminokyselin (arginin, citrulin, fenylalanin, glutamin, histidin, kyselina glutamová, lyzin, methionin, prolin, serin, threonin a všechny BCAA), jedinou výjimkou byl alanin, jehož koncentrace naopak vzrostly. Celková koncentrace aminokyselin se však (přes zjevnou tendenci poklesu) významně nezměnila (viz *tabulka 7*). V SOL došlo ke změnám koncentrací aminokyselin v menším rozsahu než v případě EDL – pokles koncentrace kyseliny asparagové, ornitinu a prolinu a zvýšení koncentrace alaninu a glutaminu (viz *tabulka 8*).

Během inkubace svalů EDL zvířat, kterým byl podán endotoxin, docházelo ke zvýšenému uvolňování celé řady aminokyselin (alanin, asparagin, citrulin, fenylalanin, glycin, lyzin, methionin, ornitin, prolin, serin, threonin, tyrozin a všechny BCAA) do inkubačního média, snížené uvolňování do média bylo zjištěno pouze u kyseliny glutamové. Vzrostlo také celkové množství aminokyselin uvolněných do média (viz *tabulka 9*). V SOL byly změny v uvolňování aminokyselin vyvolané vlivem endotoxinu mírnější. Došlo ke zvýšenému uvolňování alaninu, asparaginu, glycinu a serinu do média, snížilo se uvolňování kyseliny asparagové a glutamové a ornitinu. Celkové množství uvolněných aminokyselin se významně nezměnilo (viz *tabulka 10*).



Tabulka 6: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na koncentraci aminokyselin v plazmě

Aminokyselina	Koncentrace aminokyselin v plazmě (μmol/l)			
	Kontrola (n=6)	E 1 mg/kg (n=6)	E 3 mg/kg (n=6)	E 5 mg/kg (n=6)
Alanin	472 ± 49	677 ± 45* <sup>K</sup>	621 ± 56* <sup>K</sup>	677 ± 45* <sup>K</sup>
Arginin	240 ± 16	214 ± 17	234 ± 34	191 ± 15
Asparagin	70 ± 4	90 ± 8* <sup>K</sup>	85 ± 10	83 ± 2
Citrulin	202 ± 24	180 ± 13	247 ± 39* <sup>1</sup>	174 ± 9* <sup>3</sup>
Cystein	82 ± 10	60 ± 4	69 ± 14	69 ± 5
Fenylalanin	64 ± 12	95 ± 14	90 ± 19	68 ± 2
Glutamin	626 ± 36	646 ± 36	617 ± 63	633 ± 51
Glycin	220 ± 31	286 ± 24	328 ± 40* <sup>K</sup>	234 ± 5* <sup>3</sup>
Histidin	81 ± 12	97 ± 10	103 ± 17	89 ± 6
Isoleucin	77 ± 5	108 ± 10* <sup>K</sup>	95 ± 11	94 ± 5
Kyselina asparagová	19 ± 1	16 ± 2	19 ± 2	14 ± 1
Kyselina glutamová	76 ± 8	50 ± 3* <sup>K</sup>	79 ± 9* <sup>1</sup>	59 ± 7* <sup>3</sup>
Leucin	117 ± 12	201 ± 26* <sup>K</sup>	161 ± 21	164 ± 9
Lysin	435 ± 21	444 ± 22	461 ± 51	433 ± 17
Methionin	53 ± 4	73 ± 8* <sup>K</sup>	53 ± 5* <sup>1</sup>	54 ± 3* <sup>1</sup>
Ornitin	120 ± 15	131 ± 26	112 ± 18	98 ± 6
Prolin	369 ± 29	375 ± 14	360 ± 32	342 ± 16
Serin	251 ± 13	344 ± 23* <sup>K</sup>	331 ± 36* <sup>K</sup>	311 ± 13
Threonin	211 ± 18	306 ± 32* <sup>K</sup>	278 ± 34	274 ± 2
Tyrozín	125 ± 11	123 ± 21	110 ± 11	98 ± 6
Valin	152 ± 10	242 ± 25* <sup>K</sup>	197 ± 22	198 ± 11
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	388 ± 43	550 ± 60* <sup>K</sup>	453 ± 52	456 ± 21
<b>AK celkem</b>	4291 ± 99	4889 ± 258	4767 ± 476	4489 ± 163

E – endotoxin; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem; AK – aminokyseliny

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \*<sup>K</sup> - signifikantní rozdíl vs. Kontrola; \*<sup>1</sup> vs. E1; \*<sup>3</sup> vs. E3 při P ≤ 0,05 (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Tabulka 7: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na koncentraci aminokyselin v homogenátu EDL

Aminokyselina	Koncentrace aminokyselin v homogenátu svalu ( $\mu\text{mol/g}$ ) - EDL			
	Kontrola (n=6)	E 1 mg/kg (n=6)	E 3 mg/kg (n=6)	E 5 mg/kg (n=6)
Alanin	2,15 $\pm$ 0,25	3,04 $\pm$ 0,30* <sup>K</sup>	2,20 $\pm$ 0,22* <sup>1</sup>	3,11 $\pm$ 0,15* <sup>K3</sup>
Arginin	0,74 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,03* <sup>K</sup>	0,41 $\pm$ 0,08* <sup>K</sup>	0,26 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>
Asparagin	0,48 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,01
Citrulin	0,55 $\pm$ 0,09	0,28 $\pm$ 0,05* <sup>K</sup>	0,41 $\pm$ 0,11	0,25 $\pm$ 0,02* <sup>K</sup>
Fenylalanin	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>
Glutamin	0,97 $\pm$ 0,11	0,62 $\pm$ 0,08* <sup>K</sup>	0,46 $\pm$ 0,13* <sup>K</sup>	0,54 $\pm$ 0,07* <sup>K</sup>
Glycin	3,76 $\pm$ 0,45	3,83 $\pm$ 0,17	4,49 $\pm$ 0,44	4,30 $\pm$ 0,21
Histidin	0,31 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>	0,26 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>
Isoleucin	0,10 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>	0,08 $\pm$ 0,01
Kys. asparagová	1,01 $\pm$ 0,18	0,92 $\pm$ 0,13	0,79 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,08
Kys. glutamová	3,73 $\pm$ 0,54	3,04 $\pm$ 0,33	2,85 $\pm$ 0,33	2,66 $\pm$ 0,15* <sup>K</sup>
Leucin	0,16 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>	0,12 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>
Lysin	1,54 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,05* <sup>K</sup>	0,88 $\pm$ 0,15* <sup>K</sup>	0,63 $\pm$ 0,04* <sup>K</sup>
Methionin	0,05 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,00* <sup>K</sup>	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>
Ornitin	0,17 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01
Prolin	0,75 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,04* <sup>K</sup>	0,45 $\pm$ 0,08* <sup>K</sup>	0,44 $\pm$ 0,25* <sup>K</sup>
Serin	1,31 $\pm$ 0,16	1,06 $\pm$ 0,08	1,05 $\pm$ 0,11	0,99 $\pm$ 0,08* <sup>K</sup>
Taurin	7,64 $\pm$ 0,53	8,49 $\pm$ 0,58	8,13 $\pm$ 0,55	8,59 $\pm$ 0,39
Threonin	0,70 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>	0,56 $\pm$ 0,04* <sup>K</sup>	0,58 $\pm$ 0,00* <sup>K</sup>
Tyrozín	0,12 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
Valin	0,15 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>	0,12 $\pm$ 0,00* <sup>K</sup>
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	0,41 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,03* <sup>K</sup>	0,32 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>
<b>AK celkem</b>	28 $\pm$ 2	25 $\pm$ 1	26 $\pm$ 3	26 $\pm$ 1

EDL – m. extensor digitorum longus; E – endotoxin; Kys. – kyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem; AK – aminokyseliny

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM. \*<sup>K</sup> - signifikantní rozdíl vs. Kontrola; \*<sup>1</sup> vs. E1; \*<sup>3</sup> vs. E3 při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Tabulka 8: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na koncentraci aminokyselin v homogenátu SOL

Aminokyselina	Koncentrace aminokyselin v homogenátu svalu ( $\mu\text{mol/g}$ ) - SOL			
	Kontrola (n=6)	E 1 mg/kg (n=6)	E 3 mg/kg (n=6)	E 5 mg/kg (n=6)
Alanin	1,14 $\pm$ 0,12	1,49 $\pm$ 0,15	1,55 $\pm$ 0,08* <sup>K</sup>	1,53 $\pm$ 0,15* <sup>K</sup>
Arginin	0,48 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,05
Asparagin	0,48 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,04
Citrulin	0,35 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,06
Fenylalanin	0,07 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
Glutamin	0,38 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,17* <sup>K1</sup>	0,36 $\pm$ 0,03* <sup>3</sup>
Glycin	1,76 $\pm$ 0,09	1,85 $\pm$ 0,11	1,97 $\pm$ 0,12	1,79 $\pm$ 0,14
Histidin	0,20 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,03
Isoleucin	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01
Kys. asparagová	0,98 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,04* <sup>K</sup>	0,66 $\pm$ 0,12* <sup>K1</sup>
Kys. glutamová	3,74 $\pm$ 0,43	4,12 $\pm$ 0,20	3,58 $\pm$ 0,25	3,51 $\pm$ 0,44
Leucin	0,13 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,02
Lysin	0,78 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,12	0,62 $\pm$ 0,10
Methionin	0,03 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01
Ornitin	0,07 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,03* <sup>K</sup>	0,06 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
Prolin	0,49 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,01* <sup>K</sup>	0,38 $\pm$ 0,05* <sup>K</sup>	0,32 $\pm$ 0,03* <sup>K</sup>
Serin	1,22 $\pm$ 0,11	1,18 $\pm$ 0,06	1,37 $\pm$ 0,11	1,16 $\pm$ 0,06
Taurin	5,95 $\pm$ 0,85	7,94 $\pm$ 0,66* <sup>K</sup>	6,87 $\pm$ 0,34	7,34 $\pm$ 0,82
Threonin	0,48 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,03
Tyrozín	0,10 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
Valin	0,11 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	0,31 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,03
<b>AK celkem</b>	21 $\pm$ 2	21 $\pm$ 1	22 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3

SOL – m. soleus; E – endotoxin; Kys. – kyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem; AK – aminokyseliny

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM. \*<sup>K</sup> - signifikantní rozdíl vs. Kontrola; \*<sup>1</sup> vs. E1; \*<sup>3</sup> vs. E3 při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Tabulka 9: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na uvolňování aminokyselin z EDL do inkubačního média

Aminokyselina	Uvolnění aminokyselin do inkubačního média – EDL (nmol AK/g svalu/h)			
	Kontrola (n=12)	E 1 mg/kg (n=12)	E 3 mg/kg (n=12)	E 5 mg/kg (n=12)
Alanin	718 ± 38	1586 ± 120* <sup>K</sup>	1339 ± 121* <sup>K 1</sup>	1686 ± 57* <sup>K 3</sup>
Arginin	252 ± 11	266 ± 15	273 ± 44	260 ± 9
Asparagin	136 ± 6	254 ± 22* <sup>K</sup>	230 ± 21* <sup>K</sup>	249 ± 11* <sup>K</sup>
Citrulin	133 ± 16	118 ± 8	164 ± 11* <sup>K 1</sup>	134 ± 4* <sup>3</sup>
Fenylalanin	180 ± 5	272 ± 19* <sup>K</sup>	249 ± 16* <sup>K</sup>	270 ± 12* <sup>K</sup>
Glutamin	1789 ± 93	1627 ± 89	1676 ± 86	1733 ± 90
Glycin	820 ± 71	1012 ± 60* <sup>K</sup>	1145 ± 74* <sup>K</sup>	1111 ± 57* <sup>K</sup>
Histidin	185 ± 8	208 ± 13	207 ± 8	207 ± 11
Isoleucin	161 ± 4	281 ± 21* <sup>K</sup>	244 ± 17* <sup>K</sup>	265 ± 9* <sup>K</sup>
Kyselina asparagová	64 ± 8	87 ± 14	67 ± 4	96 ± 18
Kyselina glutamová	217 ± 11	147 ± 12* <sup>K</sup>	198 ± 17* <sup>1</sup>	170 ± 15* <sup>K</sup>
Leucin	333 ± 8	552 ± 39* <sup>K</sup>	485 ± 30* <sup>K</sup>	525 ± 18* <sup>K</sup>
Lysin	539 ± 22	595 ± 27	619 ± 31* <sup>K</sup>	610 ± 19* <sup>K</sup>
Methionin	95 ± 4	163 ± 11* <sup>K</sup>	142 ± 11* <sup>K</sup>	156 ± 7* <sup>K</sup>
Ornitin	54 ± 5	76 ± 11	70 ± 8	82 ± 9* <sup>K</sup>
Prolin	531 ± 20	616 ± 43* <sup>K</sup>	586 ± 21	614 ± 15* <sup>K</sup>
Serin	476 ± 28	713 ± 51* <sup>K</sup>	718 ± 52* <sup>K</sup>	753 ± 39* <sup>K</sup>
Taurin	376 ± 55	322 ± 39	286 ± 22	294 ± 41
Threonin	451 ± 33	643 ± 41* <sup>K</sup>	597 ± 35* <sup>K</sup>	640 ± 20* <sup>K</sup>
Tyrozin	162 ± 3	232 ± 17* <sup>K</sup>	217 ± 12* <sup>K</sup>	229 ± 9* <sup>K</sup>
Valin	264 ± 6	427 ± 29* <sup>K</sup>	378 ± 22* <sup>K</sup>	408 ± 13* <sup>K</sup>
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	758 ± 17	1260 ± 88* <sup>K</sup>	1107 ± 68* <sup>K</sup>	1198 ± 40* <sup>K</sup>
<b>AK celkem</b>	8015 ± 318	10136 ± 562* <sup>K</sup>	9926 ± 459* <sup>K</sup>	10516 ± 317* <sup>K</sup>

EDL – m. extensor digitorum longus; E – endotoxin; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem; AK – aminokyseliny

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \*<sup>K</sup> - signifikantní rozdíl vs. Kontrola; \*<sup>1</sup> vs. E1; \*<sup>3</sup> vs. E3 při P ≤ 0,05 (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Tabulka 10: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na uvolňování aminokyselin ze SOL do inkubačního média

Aminokyselina	Uvolnění aminokyselin do inkubačního média – SOL (nmol AK/g svalů/h)			
	Kontrola (n=12)	Kontrola (n=12)	Kontrola (n=12)	Kontrola (n=12)
Alanin	850 ± 101	1051 ± 85	1068 ± 59	1230 ± 101* <sup>K</sup>
Arginin	364 ± 32	320 ± 14	372 ± 38	367 ± 29
Asparagin	190 ± 17	220 ± 13	223 ± 9	245 ± 14* <sup>K</sup>
Citrulin	107 ± 17	80 ± 4	129 ± 13* <sup>1</sup>	96 ± 3
Fenylalanin	257 ± 18	256 ± 13	265 ± 16	283 ± 20
Glutamin	1814 ± 189	1647 ± 87	1749 ± 134	1914 ± 175
Glycin	779 ± 71	867 ± 41	1032 ± 79* <sup>K</sup>	1027 ± 91* <sup>K</sup>
Histidin	230 ± 21	214 ± 10	252 ± 23	235 ± 14
Isoleucin	226 ± 18	245 ± 12	247 ± 17	269 ± 22
Kyselina asparagová	92 ± 13	61 ± 7* <sup>K</sup>	75 ± 9	68 ± 5
Kyselina glutamová	324 ± 54	196 ± 12* <sup>K</sup>	324 ± 54* <sup>1</sup>	270 ± 19
Leucin	448 ± 35	481 ± 24	488 ± 32	530 ± 42
Lysin	596 ± 45	538 ± 26	532 ± 18	612 ± 50
Methionin	136 ± 10	144 ± 7	145 ± 8	155 ± 11
Ornitin	56 ± 4	42 ± 4* <sup>K</sup>	49 ± 4	55 ± 4* <sup>1</sup>
Prolin	542 ± 42	519 ± 22	548 ± 39	563 ± 39
Serin	541 ± 27	657 ± 39* <sup>K</sup>	764 ± 52* <sup>K1</sup>	761 ± 35* <sup>K1</sup>
Threonin	459 ± 35	497 ± 24	508 ± 27	557 ± 35* <sup>K</sup>
Tyrozín	232 ± 53	216 ± 11	226 ± 14	241 ± 18
Valin	376 ± 30	383 ± 19	390 ± 25	422 ± 32
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	1079 ± 86	1109 ± 54	1124 ± 74	1221 ± 96
<b>AK celkem</b>	9362 ± 912	9203 ± 475	9929 ± 748	10514 ± 752

SOL – m. soleus; E – endotoxin; Kys. – kyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem; AK – aminokyseliny

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \*<sup>K</sup> - signifikantní rozdíl vs. Kontrola; \*<sup>1</sup> vs. E1 při P ≤ 0,05 (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Na *obr. 9 a 10* je demonstrován vliv endotoxinu na celkovou, resp. myofibrilární proteolýzu v kosterním svalu. V EDL potkanů, kterým byl podán endotoxin, byl pozorován významný nárůst celkové proteolýzy (více než o 30 %), nezávisle na zvolené dávce. Ovlivnění myofibrilární proteolýzy v EDL jevílo dávkovou závislost – byl pozorován růst myofibrilární proteolýzy se zvyšující se dávkou endotoxinu, pouze dávka 5 mg/kg však vyvolala statisticky významný nárůst (více než dvojnásobný) ve srovnání s kontrolní skupinou. Naproti tomu v SOL nebyly zjištěny mezi jednotlivými skupinami významné rozdíly v proteolýze (pouze tendence vzrůstu myofibrilární proteolýzy).

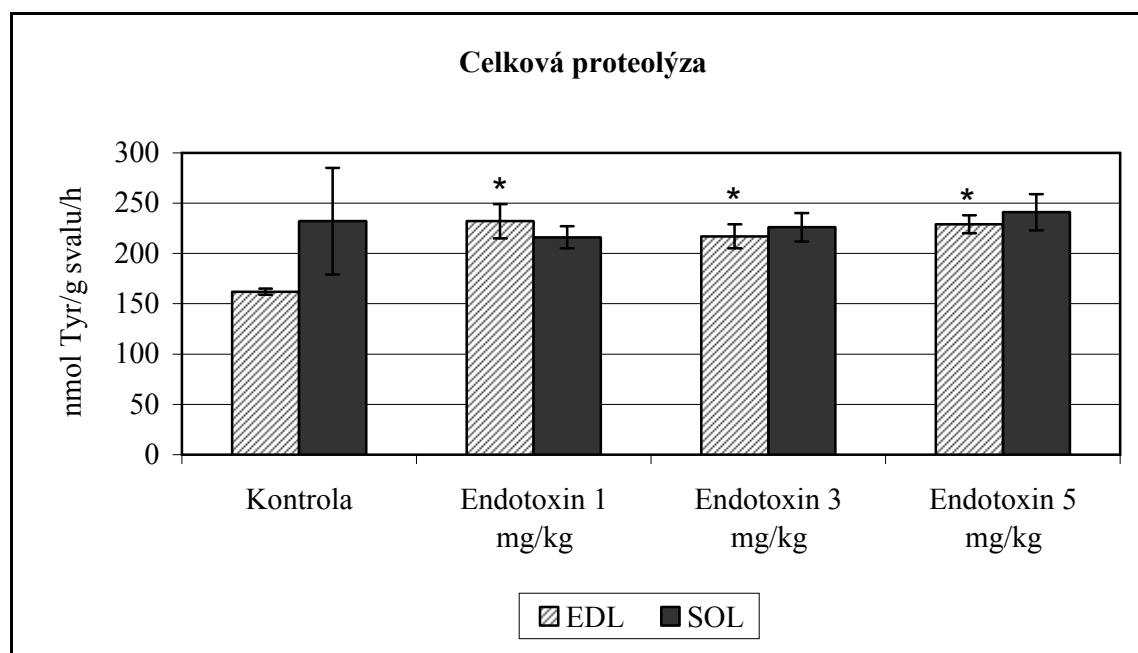
Ačkoliv v SOL nebyl na rozdíl od EDL prokázán vliv endotoxinu na nárůst proteolýzy, bylo v obou těchto svalech zjištěno zvýšení ChTLA proteazomu až o 30 % (viz *obr. 11*). Proteolytická aktivita lysozomálních katepsinů B a L nebyla významně ovlivněna v ani jednom ze svalů (viz *obr. 12*).

Bylo zjištěno také ovlivnění tvorby bílkovin v kosterním svalu po podání endotoxinu. V EDL došlo k nárůstu frakční proteosyntézy u všech sledovaných dávek endotoxinu, naproti tomu v SOL pouze v případě dávky nejnižší, tedy 1 mg/kg (viz *obr. 13*).

Vypočítaný poměr relativní změny myofibrilární proteolýzy a frakční proteosyntézy vykazoval dávkovou závislost (korelační koeficient dosahoval hodnoty 0,97 a 0,99 pro EDL, resp. SOL). Dávka 1 mg endotoxinu/kg vyvolala větší relativní nárůst proteosyntézy než myofibrilární proteolýzy (poměr změny myofibrilární proteolýzy a proteosyntézy nižší než 1), se zvyšující dávkou endotoxinu už nárůst myofibrilární proteolýzy převyšoval nárůst proteosyntézy (poměr změny myofibrilární proteolýzy a proteosyntézy s dávkou endotoxinu roste) (viz *obr. 14*).

Závěr: Na základě výsledků této pilotní studie byla vybrána jako nejvhodnější pro další experimenty dávka 5 mg endotoxinu/kg tělesné hmotnosti.

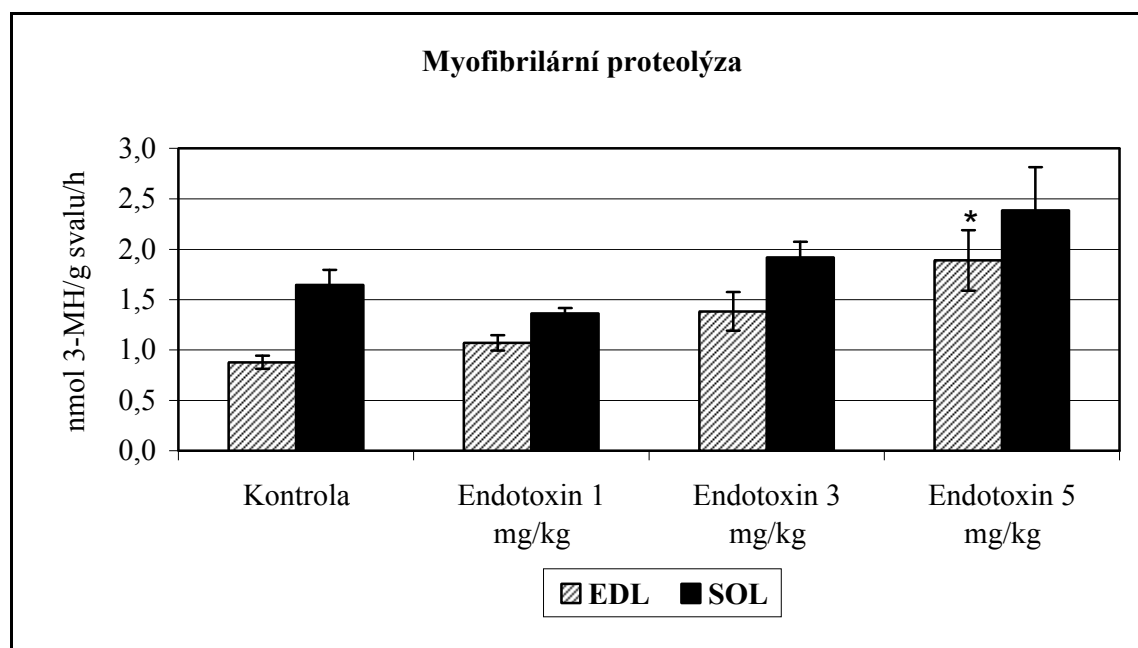
Obrázek 9: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na celkovou proteolýzu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus, Tyr - tyrozin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM (n=12). \* - signifikantní rozdíl vs. Kontrola při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

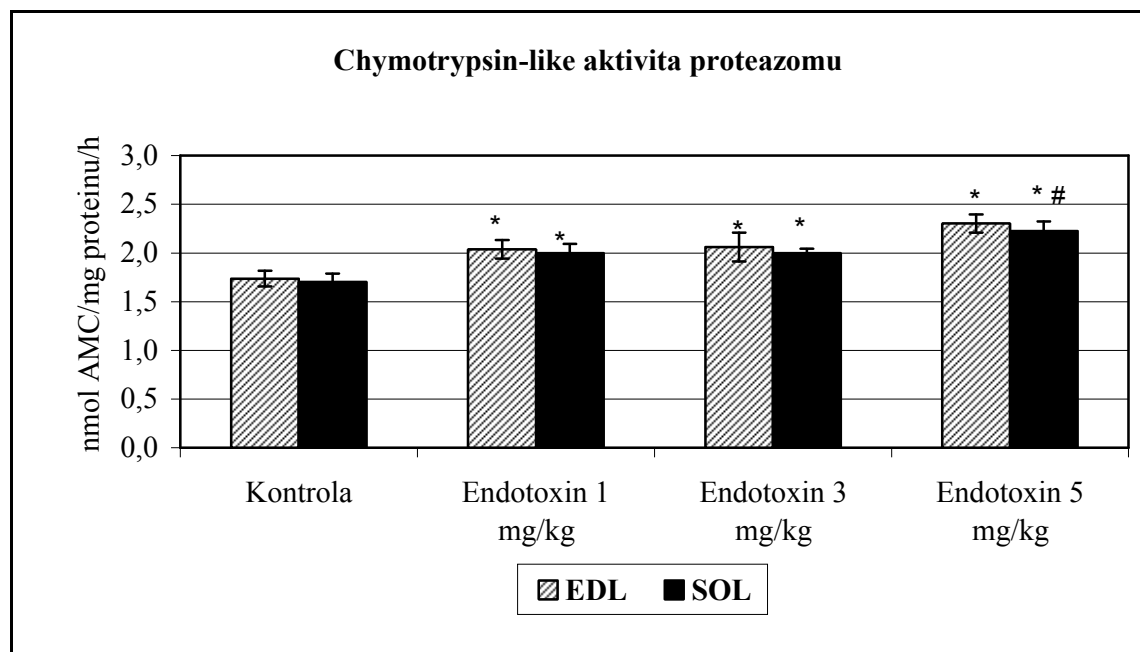
Obrázek 10: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na myofibrilární proteolýzu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; 3-MH – 3-methylhistidin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM (n=8). \* - signifikantní rozdíl vs. Kontrola při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

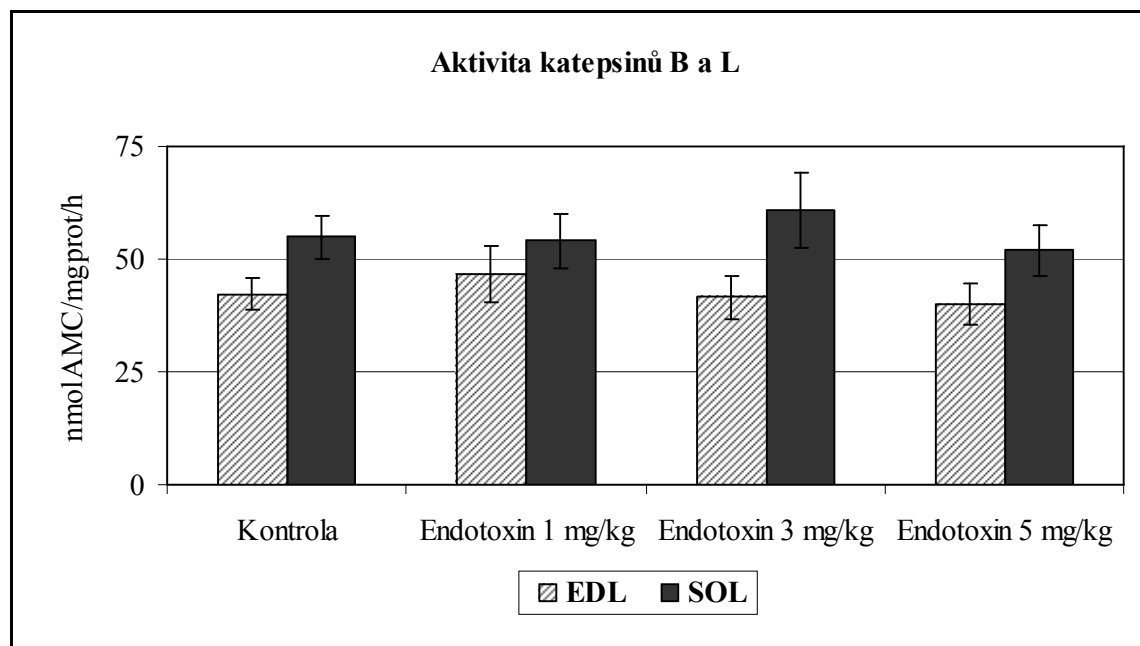
Obrázek 11: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na chymotrypsin-like aktivitu proteazomu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM (n=10). \* - signifikantní rozdíl vs. Kontrola při  $P \leq 0,05$ ; # - signifikantní rozdíl vs. Endotoxin 1 a 3 mg/kg při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Obrázek 12: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na aktivitu katepsinů B a L v kosterním svalu

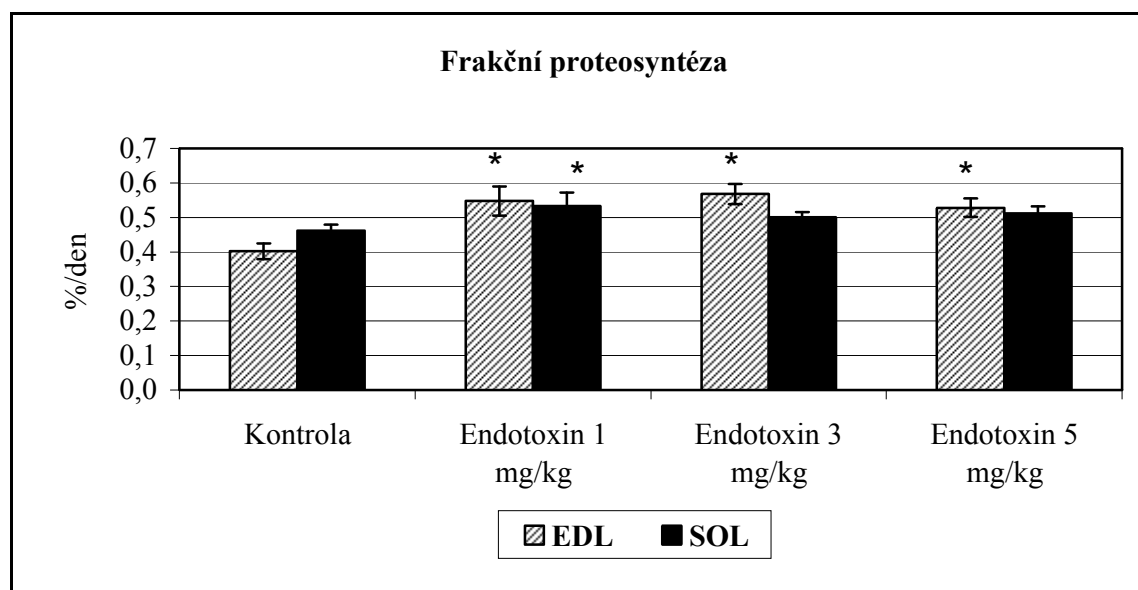


EDL – m. extensor digitorum longus; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM (n=6).



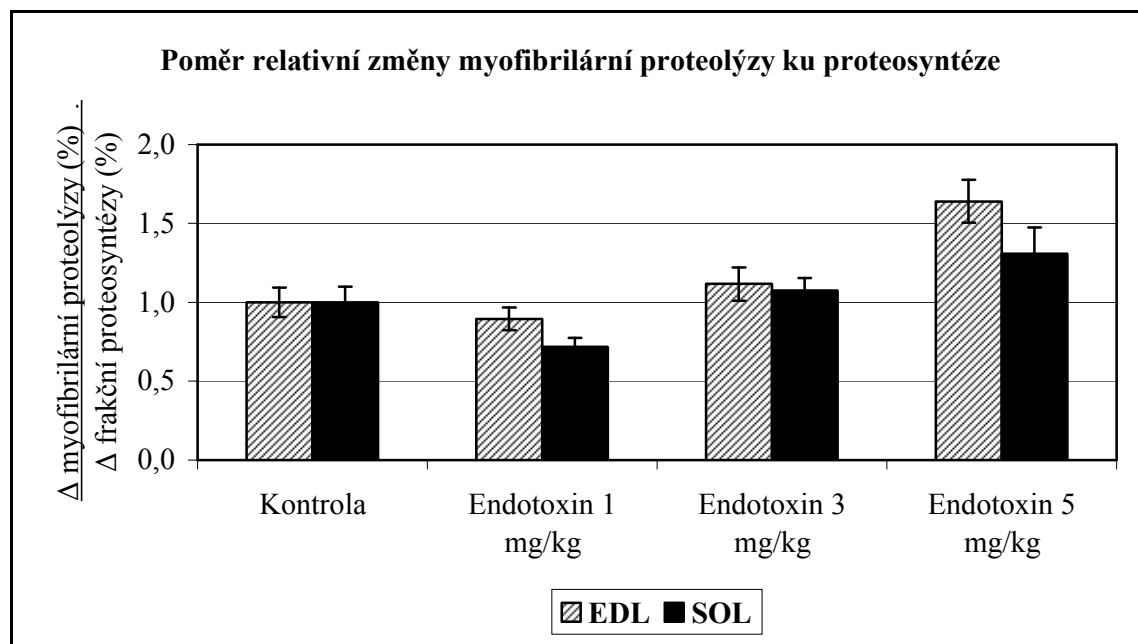
**Obrázek 13: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na frakční proteosyntézu v kosterním svalu**



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM (n=10). \* - signifikantní rozdíl vs. Kontrola při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

**Obrázek 14: Vliv endotoxinu (1-5 mg/kg) na poměr myofibrilární proteolýzy a frakční proteosyntézy v kosterním svalu**



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM (n=8-10).

## **4.2 Vliv metabolitů leucinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin u intaktních zvířat a při zátěžových stavech**

### **4.2.1 Vliv KIC na metabolismus bílkovin a aminokyselin**

#### **4.2.1.1 Vliv KIC na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních a endotoxemických zvířat – studie *in vivo***

Pro tento experiment byly vytvořeny 4 skupiny po 9-10 zvířatech: 1) intaktní; 2) KIC; 3) endotoxin; 4) endotoxin a KIC. Endotoxin byl injikován intraperitoneálně v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti, kontrolní skupině byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (viz kapitola 3.2 *Endotoxinový/lipopolysacharidový model sepse*). KIC byl aplikován pomocí osmotické pumpy, která byla implantována subkutánně do dorsolumbální oblasti v etherové narkóze (dle pokynů výrobce), těsně před aplikací endotoxinu nebo fyziologického roztoku. Osmotická pumpa umožňovala kontinuální uvolňování KIC, celková uvolňovaná dávka byla 0,25 gramu/kg tělesné hmotnosti/den. Po 24 hodinách byly izolovány svaly (EDL, SOL) obou dolních končetin – pravý sval byl vždy využit ke stanovení (celkové a myofibrilární) proteolýzy, ChTLA proteazomu a množství uvolněných aminokyselin do inkubačního média; levý sval ke stanovení proteosyntézy a oxidace leucinu. Současně byly odebrány vzorky dalších tkání (m. tibialis; játra, ledvina, slezina a srdce) ke stanovení ChTLA proteazomu a aktivity lysozomálních katepsinů B a L. Byly také odebrány vzorky plazmy ke stanovení koncentrace glukózy, lipidů, aminokyselin a močoviny.

Podání KIC a endotoxinu významně ovlivnilo plazmatické koncentrace cholesterolu experimentálních zvířat. Koncentrace celkového cholesterolu vzrostla vlivem KIC jak u intaktních, tak endotoxemických potkanů asi o 25 %. Podání endotoxinu vyvolalo nárůst plazmatického HDL cholesterolu o 31 %, kombinace endotoxinu a KIC pak o 81 % ve srovnání s intaktními zvířaty. Koncentrace LDL cholesterolu vzrostla při aplikaci kombinace endotoxinu a KIC oproti intaktním potkanům téměř o polovinu. Ačkoliv byly zjištěny mezi skupinami významné změny koncentrací cholesterolu, nedošlo k významným rozdílům v hodnotách aterogenního indexu. Významně se neměnily ani plazmatické koncentrace glukózy, močoviny nebo triacylglycerolů (viz tabulka 11).

**Tabulka 11: Vliv KIC (0,25 g/kg/den) na plazmatickou koncentraci glukózy, lipidů a močoviny**

	Plazmatická koncentrace			
	Intaktní (n=9)	KIC (n=9)	Endotoxin (n=10)	Endotoxin + KIC (n=10)
Glukóza (mmol/l)	8,46 ± 0,44	8,40 ± 0,28	8,90 ± 0,20	9,04 ± 0,19
Močovina (mmol/l)	7,8 ± 0,6	7,9 ± 0,7	8,9 ± 0,5	7,7 ± 0,3
Triacylglyceroly (mmol/l)	0,48 ± 0,06	0,71 ± 0,12	0,44 ± 0,05	0,50 ± 0,08
Celkový cholesterol (mmol/l)	2,35 ± 0,17	2,93 ± 0,14*	2,52 ± 0,15	2,92 ± 0,06*
HDL cholesterol (mmol/l)	0,88 ± 0,05	1,14 ± 0,07	1,16 ± 0,08*	1,61 ± 0,07* †
LDL cholesterol (mmol/l)	0,48 ± 0,05	0,55 ± 0,07	0,58 ± 0,03	0,70 ± 0,02*
Aterogenní index	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,3	0,9 ± 0,1

KIC –  $\alpha$ -ketoisokaproát

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + KIC vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

Aterogenní index byl vypočítán dle rovnice:

$$\text{Aterogenní index} = \frac{\text{celkový cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

Podání endotoxinu vedlo ke snížení plazmatických koncentrací citrulinu, ornitinu, prolinu a taurinu ve srovnání s intakty. Podání KIC endotoxemickým potkanům vedlo k normalizaci koncentrace prolinu a zvýšení koncentrací glycinu, leucinu a threoninu; v plazmě těchto zvířat byly zjištěny zvýšené koncentrace glycinu, lysinu, threoninu, valinu a celkového množství BCAA ve srovnání s intakty (*viz tabulka 12*).

Podání KIC zdravým potkanům zvýšilo množství uvolněného glutaminu z EDL do inkubačního média. Podání KIC endotoxemickým potkanům snížilo množství uvolněného argininu z EDL oproti endotoxemickým zvířatům a množství uvolněného histidinu oproti intaktním zvířatům (*viz tabulka 13*). KIC významně neovlivnilo uvolňování aminokyselin ze SOL do inkubačního média (*viz tabulka 14*).

Tabulka 12: Vliv KIC (0,25 g/kg/den) na plazmatickou koncentraci aminokyselin

Aminokyselina	Plazmatická koncentrace aminokyselin ( $\mu\text{mol/l}$ )			
	Intaktní (n=9)	KIC (n=9)	Endotoxin (n=10)	Endotoxin + KIC (n=10)
Alanin	556 $\pm$ 47	616 $\pm$ 47	552 $\pm$ 6	618 $\pm$ 46
Arginin	172 $\pm$ 6	132 $\pm$ 20	203 $\pm$ 19	215 $\pm$ 10
Asparagin	61 $\pm$ 2	65 $\pm$ 5	58 $\pm$ 4	61 $\pm$ 3
Citrulin	153 $\pm$ 9	176 $\pm$ 10	101 $\pm$ 6*	118 $\pm$ 7*
Fenylalanin	55 $\pm$ 4	47 $\pm$ 3	61 $\pm$ 5	58 $\pm$ 4
Glutamin	629 $\pm$ 16	663 $\pm$ 48	597 $\pm$ 25	557 $\pm$ 17
Glycin	262 $\pm$ 14	258 $\pm$ 13	283 $\pm$ 17	381 $\pm$ 26* †
Histidin	74 $\pm$ 4	67 $\pm$ 6	68 $\pm$ 4	60 $\pm$ 4
Isoleucin	80 $\pm$ 3	74 $\pm$ 4	82 $\pm$ 3	85 $\pm$ 2
Kyselina glutamová	76 $\pm$ 8	73 $\pm$ 6	57 $\pm$ 4	61 $\pm$ 2
Leucin	130 $\pm$ 8	138 $\pm$ 7	128 $\pm$ 5	152 $\pm$ 3†
Lysin	300 $\pm$ 14	283 $\pm$ 22	345 $\pm$ 21	414 $\pm$ 20*
Methionin	52 $\pm$ 1	56 $\pm$ 5	53 $\pm$ 3	54 $\pm$ 2
Ornitin	101 $\pm$ 11	79 $\pm$ 6	74 $\pm$ 5*	72 $\pm$ 3*
Prolin	316 $\pm$ 18	326 $\pm$ 25	248 $\pm$ 11*	271 $\pm$ 10
Serin	243 $\pm$ 9	226 $\pm$ 9	233 $\pm$ 18	264 $\pm$ 17
Taurin	141 $\pm$ 10	139 $\pm$ 5	101 $\pm$ 8*	110 $\pm$ 8*
Threonin	154 $\pm$ 10	155 $\pm$ 17	173 $\pm$ 10	224 $\pm$ 7* †
Tyrozín	67 $\pm$ 5	65 $\pm$ 4	62 $\pm$ 2	71 $\pm$ 2
Valin	143 $\pm$ 8	135 $\pm$ 8	165 $\pm$ 8	178 $\pm$ 3*
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	354 $\pm$ 18	347 $\pm$ 17	369 $\pm$ 9	417 $\pm$ 5*
<b>AK celkem</b>	3765 $\pm$ 111	3920 $\pm$ 26	3738 $\pm$ 88	4115 $\pm$ 154

KIC –  $\alpha$ -ketoisokaproát; AK – aminokyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + KIC vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

Tabulka 13: Vliv KIC (0,25 g/kg/den) na uvolňování aminokyselin z EDL do inkubačního média

Aminokyselina	Uvolňování aminokyselin - EDL (nmol AK/g svalu/h)			
	Intaktní (n=9)	KIC (n=9)	Endotoxin (n=10)	Endotoxin + KIC (n=10)
Alanin	1085 ± 131	1128 ± 78	1110 ± 73	1189 ± 123
Arginin	212 ± 11	193 ± 12	249 ± 9	210 ± 7†
Asparagin	161 ± 18	152 ± 6	144 ± 8	177 ± 19
Citrulin	127 ± 9	160 ± 9	121 ± 14	105 ± 6
Fenylalanin	196 ± 14	187 ± 5	187 ± 7	209 ± 15
Glutamin	1566 ± 108	1997 ± 89*	1507 ± 107	1356 ± 33
Glycin	799 ± 48	836 ± 51	827 ± 35	1000 ± 79
Histidin	185 ± 12	194 ± 9	162 ± 9	144 ± 4*
Isoleucin	204 ± 18	203 ± 7	190 ± 9	211 ± 17
Kyselina glutamová	141 ± 15	158 ± 16	113 ± 8	120 ± 9
Leucin	387 ± 31	383 ± 12	362 ± 15	398 ± 30
Lysin	392 ± 37	388 ± 15	450 ± 13	479 ± 23
Methionin	111 ± 9	108 ± 3	110 ± 5	118 ± 10
Prolin	438 ± 35	431 ± 20	377 ± 14	403 ± 22
Serin	583 ± 51	490 ± 25	466 ± 35	443 ± 30
Tyrozín	163 ± 11	158 ± 4	153 ± 6	168 ± 12
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	906 ± 73	897 ± 30	848 ± 40	937 ± 71
<b>AK celkem</b>	7697 ± 552	8329 ± 84	7485 ± 295	7376 ± 306

EDL – m. extensor digitorum longus; KIC –  $\alpha$ -ketoisokaproát; AK – aminokyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + KIC vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

Tabulka 14: Vliv KIC (0,25 g/kg/den) na uvolňování aminokyselin z SOL do inkubačního média

Aminokyselina	Uvolňování aminokyselin - SOL (nmol AK/g svalu/h)			
	Intaktní (n=9)	KIC (n=9)	Endotoxin (n=10)	Endotoxin + KIC (n=10)
Alanin	987 ± 71	1042 ± 71	1036 ± 59	1103 ± 28
Arginin	334 ± 15	308 ± 23	341 ± 17	348 ± 11
Asparagin	209 ± 12	205 ± 11	193 ± 11	193 ± 6
Citrulin	119 ± 13	123 ± 10	91 ± 6	92 ± 4
Fenylalanin	239 ± 7	225 ± 9	238 ± 11	233 ± 6
Glutamin	2094 ± 134	2180 ± 141	1792 ± 98	1760 ± 51
Glycin	872 ± 44	912 ± 48	879 ± 41	944 ± 27
Histidin	253 ± 13	241 ± 16	213 ± 12	220 ± 7
Isoleucin	242 ± 5	225 ± 8	240 ± 11	226 ± 6
Kyselina glutamová	376 ± 53	340 ± 42	264 ± 37	290 ± 24
Leucin	450 ± 9	428 ± 16	444 ± 20	432 ± 11
Lysin	501 ± 23	487 ± 24	496 ± 23	531 ± 16
Methionin	134 ± 4	126 ± 5	134 ± 6	132 ± 3
Prolin	487 ± 18	452 ± 17	430 ± 21	425 ± 12
Serin	688 ± 44	636 ± 42	590 ± 34	588 ± 18
Tyrozín	200 ± 6	190 ± 8	193 ± 9	191 ± 5
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	1068 ± 23	1007 ± 39	1011 ± 33	1018 ± 25
<b>AK celkem</b>	9598 ± 498	9407 ± 488	8871 ± 428	9770 ± 173

SOL – m. soleus; KIC –  $\alpha$ -ketoisokaproát; AK – aminokyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM.

Jak dokládají *tabulka 15 a 16*, podání KIC nemělo významný vliv na metabolismus proteinů, tedy (celkovou a myofibrilární) proteolýzu, ChTLA proteazomu, proteosyntézu a oxidaci leucinu v ani jednom ze sledovaných typů kosterního svalu (EDL a SOL).

Podání KIC současně s endotoxinem vedlo ke zvýšení ChTLA ve všech měřených tkáních s výjimkou m. tibialis (játra, ledviny, slezina, srdce) a aktivity lyzozomálních katepsinů B a L v játrech a ledvinách, ve srovnání s tkáněmi intaktních zvířat. K nárůstu ChTLA v ledvinách a aktivity katepsinů B a L v játrech došlo i oproti endotoxickým zvířatům (*viz tabulky 17 a 18*).

**Tabulka 15: Vliv KIC (0,25 g/kg/den) na metabolismus aminokyselin a proteinů v EDL**

	Parametry metabolismu v EDL			
	Intaktní (n=9)	KIC (n=9)	Endotoxin (n=10)	Endotoxin + KIC (n=10)
Celková proteolýza (nmol Tyr/g svalu/h)	163 ± 11	158 ± 4	153 ± 6	168 ± 12
Myofibrilární proteolýza (nmol 3-MH/g svalu/h)	1,08 ± 0,07	1,12 ± 0,09	1,18 ± 0,07	1,36 ± 0,14
ChTLA (nmol AMC/mg proteinu/h)	3,1 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Proteosyntéza (nmol Leu/g proteinu/h)	1123 ± 93	1384 ± 173	1076 ± 66	976 ± 47
Oxidace leucinu (nmol Leu/g svalu/h)	60 ± 5	58 ± 7	71 ± 9	76 ± 7

EDL – m. extensor digitorum longus; KIC –  $\alpha$ -ketoisokaproát; Tyr – tyrozin; 3-MH – 3-methylhistidin; ChTLA – chymotrypsin-like aktivita proteazomu; AMC – 7-amino-4-methylkumarin; Leu - leucin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM.

**Tabulka 16: Vliv KIC (0,25 g/kg/den) na metabolismus aminokyselin a proteinů v SOL**

	Parametry metabolismu v SOL			
	Intaktní (n=9)	KIC (n=9)	Endotoxin (n=10)	Endotoxin + KIC (n=10)
Celková proteolýza (nmol Tyr/g svalu/h)	200 ± 6	190 ± 8	193 ± 9	191 ± 5
Myofibrilární proteolýza (nmol 3-MH/g svalu/h)	1,38 ± 0,11	1,26 ± 0,06	1,25 ± 0,10	1,33 ± 0,08
ChTLA (nmol AMC/mg proteinu/h)	3,8 ± 0,2	4,1 ± 0,3	4,0 ± 0,2	4,3 ± 0,2
Proteosyntéza (nmol Leu/g proteinu/h)	1387 ± 176	1532 ± 173	1511 ± 79	1367 ± 53
Oxidace leucinu (nmol Leu/g svalu/h)	58 ± 5	54 ± 4	60 ± 10	59 ± 6

SOL – m. soleus; KIC –  $\alpha$ -ketoisokaproát; Tyr – tyrozin; 3-MH – 3-methylhistidin; ChTLA – chymotrypsin-like aktivita proteazomu; AMC – 7-amino-4-methylkumarin; Leu - leucin  
Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM.

**Tabulka 17: Vliv KIC (0,25 g/kg/den) na chymotrypsin-like aktivitu proteazomu ve tkáních**

Tkáň	Chymotrypsin-like aktivita proteazomu (nmol AMC/mg proteinu/h)			
	Intaktní (n=9)	KIC (n=9)	Endotoxin (n=10)	Endotoxin + KIC (n=10)
Játra	5,4 ± 0,2	6,1 ± 0,8	7,9 ± 0,3	10,1 ± 1,1*
Ledviny	6,9 ± 0,4	8,1 ± 0,5	9,5 ± 0,4	14,3 ± 1,7* †
M. tibialis	4,0 ± 0,1	4,7 ± 0,5	3,4 ± 0,1	4,7 ± 0,5
Slezina	7,5 ± 0,4	8,7 ± 1,0	9,1 ± 0,2	11,6 ± 0,7*
Srdce	5,1 ± 0,2	5,4 ± 0,5	6,1 ± 0,3	7,7 ± 0,8*

KIC –  $\alpha$ -ketoisokaproát; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + KIC vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)



Tabulka 18: Vliv KIC (0,25 g/kg/den) na aktivitu katepsinů B a L ve tkáních

Tkáň	Aktivita katepsinů B a L (nmol AMC/mg proteinu/h)			
	Intaktní (n=9)	KIC (n=9)	Endotoxin (n=10)	Endotoxin + KIC (n=10)
Játra	217 ± 27	243 ± 25	220 ± 35	335 ± 27* †
Ledviny	655 ± 69	825 ± 33	925 ± 56	1084 ± 119*
M. tibialis	34 ± 8	44 ± 7	40 ± 8	54 ± 7
Slezina	168 ± 45	126 ± 28	214 ± 38	200 ± 24
Srdce	131 ± 12	168 ± 50	85 ± 18	138 ± 21

KIC –  $\alpha$ -ketoisokaproát; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + KIC vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

## 4.2.2 Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin

### 4.2.2.1 Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních zvířat – studie *in vivo*

K pokusu byli použiti samci potkana o hmotnosti cca 260 gramů, kteří byli rozděleni do 2 experimentálních skupin (n=8-9). První skupině byl podán HMB v dávce 0,1 g/kg tělesné váhy (polovina dávky) pomocí kanyly zavedené do krční žíly, stejné množství HMB bylo podáno subkutánně. Kontrolní skupina obdržela místo HMB odpovídající množství fyziologického roztoku. Po 18 hodinách hladovění byl potkanům umístěným do metabolické klece infundován fyziologický roztok obohacený o L-[1-<sup>14</sup>C] leucin (2,0  $\mu$ Ci/ml) a L-[3,4,5-<sup>3</sup>H] fenylalanin (10,0  $\mu$ Ci/ml), v případě pokusné skupiny také o HMB v dávce 0,1 g/kg tělesné váhy. Počáteční dávka v objemu 0,7 ml byla infundována v průběhu 4 min a 35 sekund, následovala udržovací infuze o rychlosti 0,4 ml/h. Podmínky a metody stanovení celotělového metabolismu proteinů a aminokyselin jsou blíže popsány v kapitole 3.3.1 *Metabolismus leucinu a bílkovin za podmínek in vivo*. Ve 210. minutě od zahájení infuze byli potkani usmrceni v celkové anestezii étherem vykrvácením z břišní aorty. Ihned poté byly odebrány vzorky plazmy ke stanovení koncentrace glukózy, lipidů, aminokyselin a močoviny

a vzorky tkání (m. gastrocnemius, játra, ledviny, slezina, srdce, tenké a tlusté střevo) ke stanovení proteosyntézy a ChTLA.

Aplikace HMB vyvolala pokles celotělového obratu proteinů, tedy snížení celotělové proteolýzy i proteosyntézy, byl zjištěn také pokles clearance leucinu. Změny proteinové bilance a oxidace leucinu pozorovány nebyly. Při použití infuze L-[3,4,5-<sup>3</sup>H] fenylalaninu nebyly sledovány rozdíly v proteolýze ani clearance fenylalaninu (*viz tab. 19*).

Po podání HMB vzrostla plazmatická koncentrace celkového cholesterolu o 14 %, zatímco koncentrace HDL a LDL cholesterolu, triacylglycerolů, močoviny nebo glukózy se významně nelišily (*viz tab. 20*). Po podání HMB také vzrostly plazmatické koncentrace citrulinu, leucinu a souhrnného množství BCAA, poklesly naopak koncentrace alaninu, glutaminu, kyseliny glutamové a serinu (*viz tab. 21*).

Ve svalu (m. gastrocnemius) zvířat, kterým byl aplikován HMB jsme zjistili pokles ChTLA téměř o 50 % ve srovnání s intaktními zvířaty. V ostatních měřených tkáních nebyly pozorovány významné změny ChTLA (*viz tab. 22*).

V játrech zvířat, kterým byl podán HMB, vzrostla frakční proteosyntéza zjišťovaná pomocí L-[1-<sup>14</sup>C] leucinu i L-[3,4,5-<sup>3</sup>H] fenylalaninu. Frakční proteosyntéza zjišťovaná pomocí L-[1-<sup>14</sup>C] leucinu poklesla v ledvinách, slezině, srdci a tlustém střevu zvířat, kterým byl podán HMB, pokud však byla stanovena pomocí L-[3,4,5-<sup>3</sup>H] fenylalaninu, klesla významně pouze v tlustém střevu (*viz tab. 23*).

**Tabulka 19: Vliv HMB (0,3 g/kg/den) na celotělový metabolismus aminokyselin a proteinů**

	<b>Intaktní (n=9)</b>	<b>HMB (n=8)</b>
Proteolýza (μmol leucinu/kg/h)	172 ± 9	144 ± 8*
Proteosyntéza (μmol leucinu/kg/h)	107 ± 8	84 ± 5*
Proteinová bilance (μmol leucinu/kg/h)	-65 ± 4	-60 ± 4
Oxidace leucinu (μmol leucinu/kg/h)	65 ± 4	60 ± 4
Zoxidovaná frakce leucinu (%)	38 ± 2	42 ± 1
Clearance leucinu (ml/kg/h)	1053 ± 36	870 ± 52*
Proteolýza (μmol fenylalaninu/kg/h)	51 ± 3	44 ± 1
Clearance fenylalaninu (ml/kg/h)	749 ± 20	668 ± 24

HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při P ≤ 0,05 (nepárový t-test)

**Tabulka 20: Vliv HMB (0,3 g/kg/den) na plazmatickou koncentraci glukózy, lipidů a močoviny**

	<b>Plazmatická koncentrace</b>	
	<b>Intaktní (n=9)</b>	<b>HMB (n=8)</b>
Glukóza (mmol/l)	9,13 ± 0,30	8,69 ± 0,40
Močovina (mmol/l)	5,3 ± 0,4	5,0 ± 0,3
Triacylglyceroly (mmol/l)	1,21 ± 0,11	1,35 ± 0,29
Celkový cholesterol (mmol/l)	2,04 ± 0,08	2,33 ± 0,08*
HDL cholesterol (mmol/l)	1,43 ± 0,08	1,53 ± 0,08
LDL cholesterol (mmol/l)	0,22 ± 0,02	0,29 ± 0,04
Aterogenní index	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1

HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při P ≤ 0,05 (nepárový t-test)

Aterogenní index byl vypočítán dle rovnice:

$$\text{Aterogenní index} = \frac{\text{celkový cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

Tabulka 21: Vliv HMB (0,3 g/kg/den) na plazmatickou koncentraci aminokyselin

Aminokyselina	Plazmatická koncentrace aminokyselin (μmol AK/l)	
	Intaktní (n=9)	HMB (n=8)
Alanin	366 ± 23	301 ± 14*
Arginin	140 ± 7	131 ± 8
Asparagin	51 ± 2	48 ± 2
Citrulin	57 ± 2	68 ± 4*
Fenylalanin	68 ± 3	66 ± 2
Glutamin	677 ± 37	574 ± 25*
Glycin	273 ± 18	273 ± 23
Histidin	67 ± 3	66 ± 3
Isoleucin	94 ± 5	113 ± 9
Kyselina glutamová	71 ± 3	54 ± 4*
Leucin	164 ± 9	219 ± 12*
Lysin	366 ± 14	383 ± 27
Methionin	48 ± 1	44 ± 1
Ornitin	44 ± 2	53 ± 2
Prolin	120 ± 5	105 ± 6
Serin	224 ± 10	190 ± 12*
Taurin	123 ± 8	138 ± 9
Threonin	201 ± 10	180 ± 12
Tyrozín	62 ± 5	53 ± 3
Valin	168 ± 12	202 ± 18
<b>Odvozené hodnoty</b>		
<b>BCAA</b>	424 ± 18	522 ± 18*
<b>AK celkem</b>	3469 ± 117	3339 ± 84

HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát; AK – aminokyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$  (nepárový t-test)

**Tabulka 22: Vliv HMB (0,3 g/kg/den) na chymotrypsin-like aktivitu proteazomu ve tkáních**

Tkáň	Chymotrypsin-like aktivita proteazomu (nmol AMC/mg proteinu/h)	
	Intaktní (n=9)	HMB (n=8)
Játra	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2
Ledviny	3,5 ± 0,3	2,7 ± 0,2
M. gastrocnemius	3,5 ± 0,5	1,9 ± 0,2*
Slezina	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Srdce	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Tenké střevo	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2
Tlusté střevo	0,9 ± 0,3	0,5 ± 0,1

HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při P ≤ 0,05 (nepárový t-test)

**Tabulka 23: Vliv HMB (0,3 g/kg/den) na proteosyntézu ve tkáních**

Tkáň	Frakční proteosyntéza (%/den)			
	L-[1- <sup>14</sup> C] leucin		L-[3,4,5- <sup>3</sup> H] fenylalanin	
	Intaktní (n=9)	HMB (n=8)	Intaktní (n=9)	HMB (n=8)
Játra	2,97 ± 0,26	3,81 ± 0,28*	5,34 ± 0,32	7,09 ± 0,56*
Ledviny	5,63 ± 0,22	4,59 ± 0,28*	3,31 ± 0,29	2,97 ± 0,19
M. gastrocnemius	0,35 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,52 ± 0,04	0,45 ± 0,03
Slezina	4,32 ± 0,52	2,76 ± 0,24*	7,53 ± 0,72	5,93 ± 0,42
Srdce	1,19 ± 0,12	0,79 ± 0,08*	1,59 ± 0,16	1,34 ± 0,08
Tenké střevo	6,28 ± 0,83	4,58 ± 0,70	10,30 ± 1,12	8,63 ± 1,20
Tlusté střevo	6,32 ± 0,97	3,91 ± 0,75*	10,54 ± 1,67	6,63 ± 0,79*

HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při P ≤ 0,05 (nepárový t-test)

#### 4.2.2.2 Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin endotoxemických zvířat – studie *in vivo*

K pokusu byli použiti potkani rozděleni do 4 skupin po 9-10 zvířatech: 1) intaktní; 2) HMB; 3) endotoxin; 4) endotoxin a HMB. Endotoxin byl injikován intraperitoneálně v dávce 5mg/kg tělesné hmotnosti, kontrolní skupině byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (*viz kapitola 3.2 Endotoxinový/lipopolysacharidový model sepse*). HMB byl aplikován pomocí osmotické pumpy, která byla implantována subkutánně do dorsolumbální oblasti v etherové narkóze (dle pokynů výrobce), těsně před aplikací endotoxinu nebo fyziologického roztoku. Osmotická pumpa umožňovala kontinuální uvolňování HMB, celková uvolněná dávka byla 0,5 gramu/kg tělesné hmotnosti/den. Po 24 hodinách byly izolovány svaly (EDL, SOL) obou dolních končetin – pravý sval byl vždy využit ke stanovení (celkové a myofibrilární) proteolýzy, ChTLA proteazomu, exprese  $\alpha$  podjednotek 20S proteazomu a množství uvolněných aminokyselin do inkubačního média, levý sval ke stanovení proteosyntézy a oxidace leucinu. Současně byly odebrány vzorky dalších tkání (m. tibialis; játra, ledvina, slezina, srdce, tenké a tlusté střevo) ke stanovení ChTLA proteazomu a aktivity lysozomálních katepsinů B a L. Byly také odebrány vzorky plazmy ke stanovení koncentrace glukózy, lipidů, aminokyselin a močoviny.

Jak podání HMB, tak endotoxinu ovlivnilo plazmatické koncentrace živin (*viz tab. 24*). Aplikace endotoxinu vyvolala pokles glykemie (průměrné snížení glykémie o 13 % oproti intaktním zvířatům), naopak podání HMB zvyšovalo hodnoty glykemie (u zdravých zvířat vzrůst o 14 %, u endotoxemických na hodnoty nelišící se od zdravých zvířat). Koncentrace močoviny vzrostly po podání endotoxinu téměř dvojnásobně, vlivem HMB však došlo k jejich normalizaci. Koncentrace triacylglycerolů vzrostly jak díky podání endotoxinu (o 111 %), tak HMB (o 72 %), aditivní účinek endotoxinu a HMB ovšem pozorován nebyl. Plazmatické hladiny celkového a LDL cholesterolu se mezi pokusnými skupinami nelišily, u endotoxemických zvířat však došlo k třetinovému poklesu koncentrace HDL cholesterolu, což vedlo také ke zvýšení hodnot aterogenního indexu u těchto zvířat.

*V tab. 25* je možné porovnat rozdíly v plazmatických koncentracích jednotlivých aminokyselin mezi pokusnými skupinami. Koncentrace kyseliny glutamové a taurinu poklesly oproti intaktním zvířatům jak vlivem aplikace endotoxinu, tak HMB. Po podání endotoxinu vzrostly koncentrace asparaginu, fenylalaninu, histidinu, methioninu, threoninu a všech tří

**Tabulka 24: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na plazmatickou koncentraci glukózy, lipidů a močoviny**

	Plazmatická koncentrace			
	Intaktní (n=10)	HMB (n=10)	Endotoxin (n=9)	Endotoxin + HMB (n=9)
Glukóza (mmol/l)	8,55 ± 0,18	9,77 ± 0,48*	7,43 ± 0,21*	7,83 ± 0,40
Močovina (mmol/l)	6,4 ± 0,5	7,1 ± 0,3	11,9 ± 3,0*	6,8 ± 0,7†
Triacylglyceroly (mmol/l)	0,57 ± 0,03	0,98 ± 0,13*	1,20 ± 0,24*	1,08 ± 0,13*
Celkový cholesterol (mmol/l)	2,97 ± 0,17	3,46 ± 0,13	3,07 ± 0,28	2,99 ± 0,11
HDL cholesterol (mmol/l)	1,42 ± 0,05	1,38 ± 0,06	0,93 ± 0,07*	1,13 ± 0,06*
LDL cholesterol (mmol/l)	0,53 ± 0,06	0,62 ± 0,05	0,73 ± 0,06	0,72 ± 0,08
Aterogenní index	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,4 ± 0,3*	1,7 ± 0,2

HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + HMB vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

Aterogenní index byl vypočítán dle rovnice:

$$\text{Aterogenní index} = \frac{\text{celkový cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

BCAA (tedy isoleucinu, leucinu a valinu) oproti intaktním zvířatům. U zvířat, kterým byl aplikován endotoxin i HMB, jsme pozorovali zvýšení koncentrací argininu, fenylalaninu, methioninu, threoninu a valinu oproti intaktním zvířatům; koncentrace glycinu a lysinu dosahovaly vyšších hodnot nejen v porovnání s intaktními, ale i endotoxemickými zvířaty, koncentrace valinu byla vyšší než u intaktních, ale nižší než u endotoxemických zvířat.

Aplikace endotoxinu zvýšila hodnoty celkové proteolýzy v kosterních svalech ve srovnání s intaktními zvířaty (cca o třetinu v SOL, více než dvojnásobně v EDL). Zatímco podání HMB zdravým potkanům neovlivnilo degradaci proteinů v žádném ze sledovaných svalů, podání endotoxemickým zvířatům vyvolalo snížení celkové proteolýzy – v SOL na hodnoty nelišící se od svalů intaktních potkanů, v EDL sice na hodnoty asi o dvě třetiny vyšší než u svalů intaktních zvířat, nicméně významně nižší než u svalů endotoxemických zvířat (viz obr. 15).

Tabulka 25: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na plazmatickou koncentraci aminokyselin

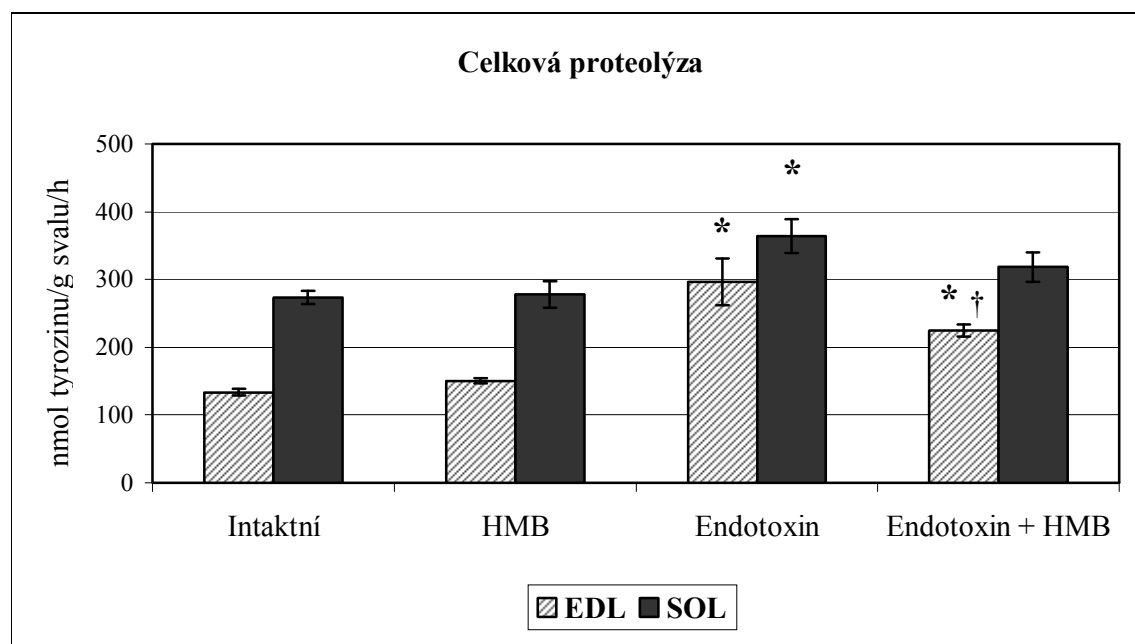
Aminokyselina	Plazmatická koncentrace aminokyselin ( $\mu\text{mol AK/l}$ )			
	Intaktní (n=9)	HMB (n=9)	Endotoxin (n=8)	Endotoxin + HMB (n=8)
Alanin	598 $\pm$ 15	535 $\pm$ 57	626 $\pm$ 89	678 $\pm$ 52
Arginin	116 $\pm$ 11	128 $\pm$ 17	172 $\pm$ 17	188 $\pm$ 16*
Asparagin	66 $\pm$ 2	72 $\pm$ 3	93 $\pm$ 10*	86 $\pm$ 5
Citrulin	134 $\pm$ 6	165 $\pm$ 8	136 $\pm$ 24	105 $\pm$ 7
Fenylalanin	52 $\pm$ 2	45 $\pm$ 3	89 $\pm$ 5*	83 $\pm$ 2*
Glutamin	610 $\pm$ 32	609 $\pm$ 33	584 $\pm$ 21	625 $\pm$ 25
Glycin	184 $\pm$ 11	182 $\pm$ 12	213 $\pm$ 13	299 $\pm$ 14*†
Histidin	64 $\pm$ 2	66 $\pm$ 5	83 $\pm$ 5*	77 $\pm$ 2
Isoleucin	86 $\pm$ 4	93 $\pm$ 4	114 $\pm$ 10*	105 $\pm$ 4
Kyselina glutamová	91 $\pm$ 4	72 $\pm$ 4*	69 $\pm$ 8*	59 $\pm$ 2*
Leucin	137 $\pm$ 8	131 $\pm$ 6	209 $\pm$ 23*	175 $\pm$ 10
Lysin	345 $\pm$ 12	363 $\pm$ 11	392 $\pm$ 40	492 $\pm$ 15*†
Methionin	49 $\pm$ 1	52 $\pm$ 2	70 $\pm$ 5*	62 $\pm$ 2*
Ornitin	72 $\pm$ 4	102 $\pm$ 10	91 $\pm$ 13	65 $\pm$ 2
Prolin	283 $\pm$ 9	318 $\pm$ 8	293 $\pm$ 39	275 $\pm$ 19
Serin	264 $\pm$ 4	218 $\pm$ 11	305 $\pm$ 40	313 $\pm$ 18
Taurin	160 $\pm$ 10	121 $\pm$ 4*	92 $\pm$ 11*	88 $\pm$ 10*
Threonin	166 $\pm$ 7	175 $\pm$ 13	249 $\pm$ 29*	255 $\pm$ 18*
Tyrozín	62 $\pm$ 2	67 $\pm$ 5	72 $\pm$ 9	68 $\pm$ 2
Valin	153 $\pm$ 7	156 $\pm$ 8	289 $\pm$ 27*	213 $\pm$ 20*†
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	373 $\pm$ 18	379 $\pm$ 13	593 $\pm$ 62*	493 $\pm$ 24
<b>AK celkem</b>	3638 $\pm$ 84	3667 $\pm$ 82	4371 $\pm$ 424	4300 $\pm$ 177

HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát; AK – aminokyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + HMB vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)



Obrázek 15: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na celkovou proteolýzu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=9-10). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + HMB vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

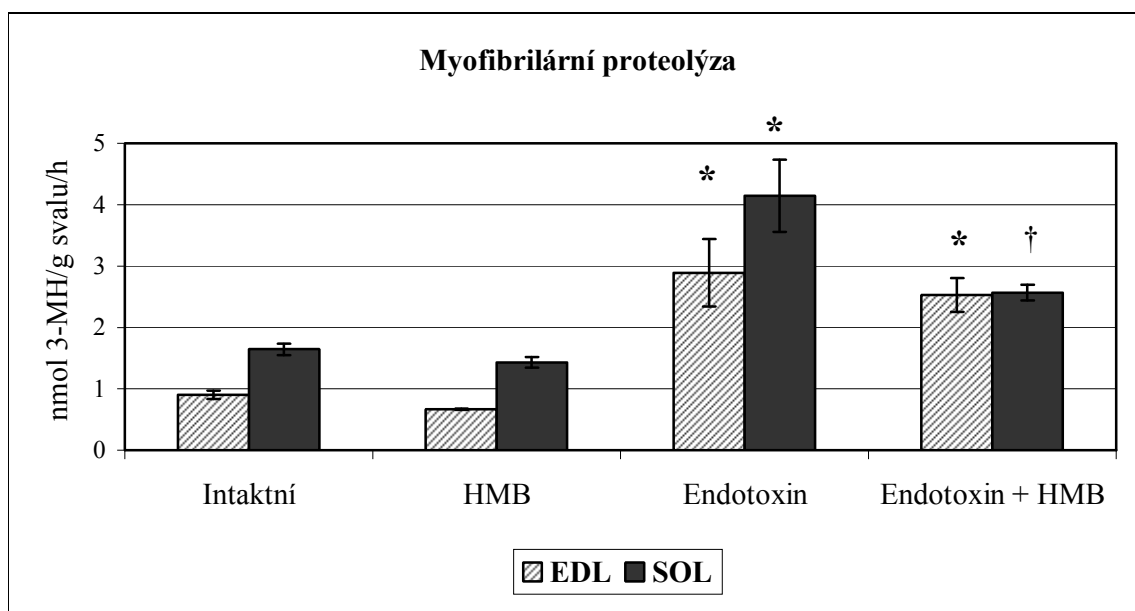
Aplikace endotoxinu způsobila více než zdvojnásobení degradace myofibrilárních proteinů v SOL a více než ztrojnásobení v EDL oproti svalům intaktních zvířat. Podání HMB snížilo významně myofibrilární proteolýzu pouze v SOL endotoxemických potkanů, v EDL nevyvolalo významné změny. Ty nebyly zjištěny ani po podání HMB zdravým zvířatům (viz obr. 16).

ChTLA významně vzrostla v obou typech svalů endotoxemických zvířat (více než trojnásobný nárůst ChTLA v EDL, asi dvoutřetinový v SOL) ve srovnání se svaly intaktních zvířat. Podání HMB endotoxemickým potkanům vyvolalo pokles ChTLA v EDL na hodnoty významně se nelišící od hodnot intaktních zvířat, v SOL sice poklesla ChTLA oproti endotoxemickým potkanům, ale stále byla o 40 % vyšší než u intaktních zvířat. Podání HMB intaktním potkanům významně ChTLA neovlivnilo (viz obr. 17).

Jak je možné vidět na reprezentativním příkladu blotu (viz obr. 18),  $\alpha$  podjednotky 20S proteazomu jsou detekovány jako 2 pásy odpovídající přibližně velikosti 29 a 32 kilodaltonů. V expresi  $\alpha$  podjednotek 20S proteazomu nebyly mezi jednotlivými skupinami zjištěny významné změny ani v EDL ani v SOL (viz obr. 19).

Nebyly zjištěny významné rozdíly v proteolytické aktivitě lysozomálních katepsinů B a L v m. tibialis mezi jednotlivými experimentálními skupinami (viz obr. 20).

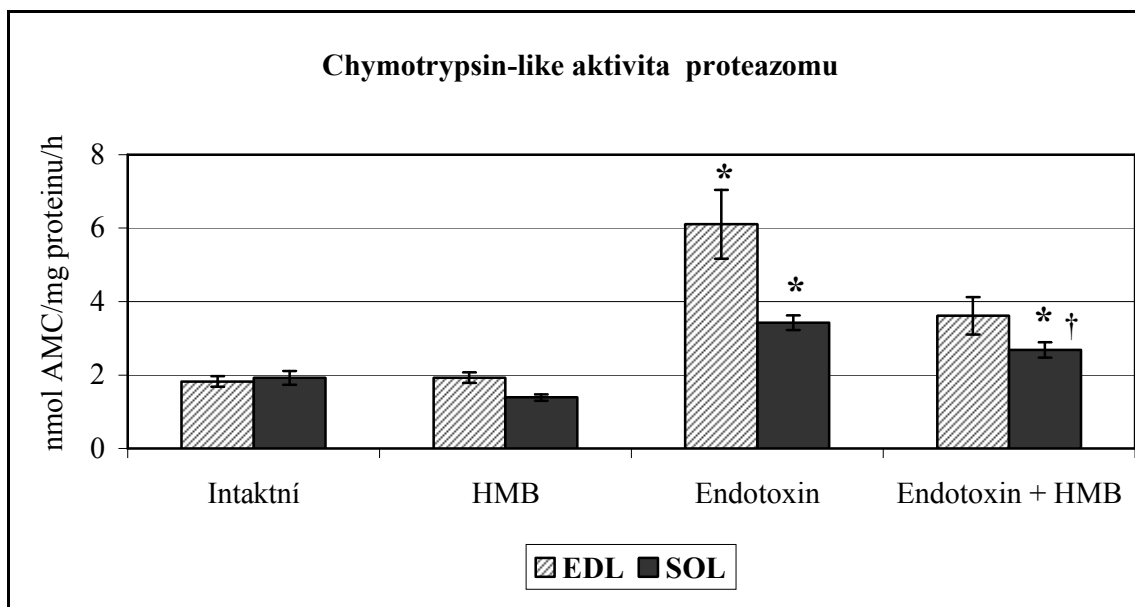
Obrázek 16: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na myofibrilární proteolýzu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát; 3-MH – 3-methylhistidin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=9-10). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + HMB vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

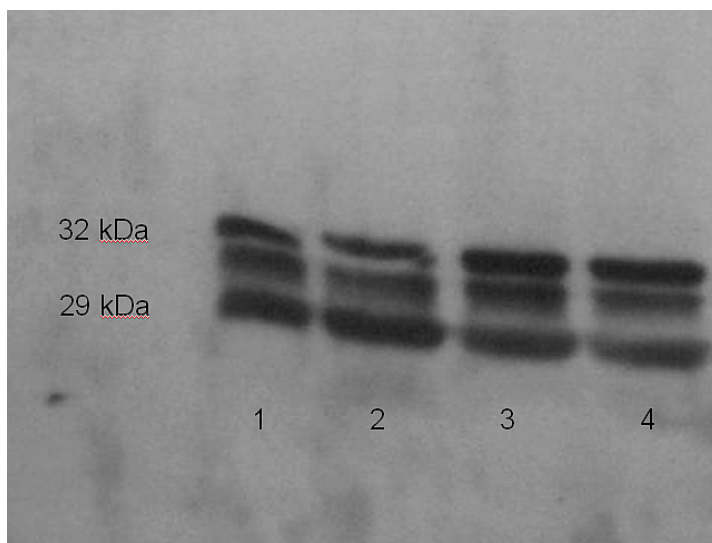
Obrázek 17: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na chymotrypsin-like aktivitu proteazomu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

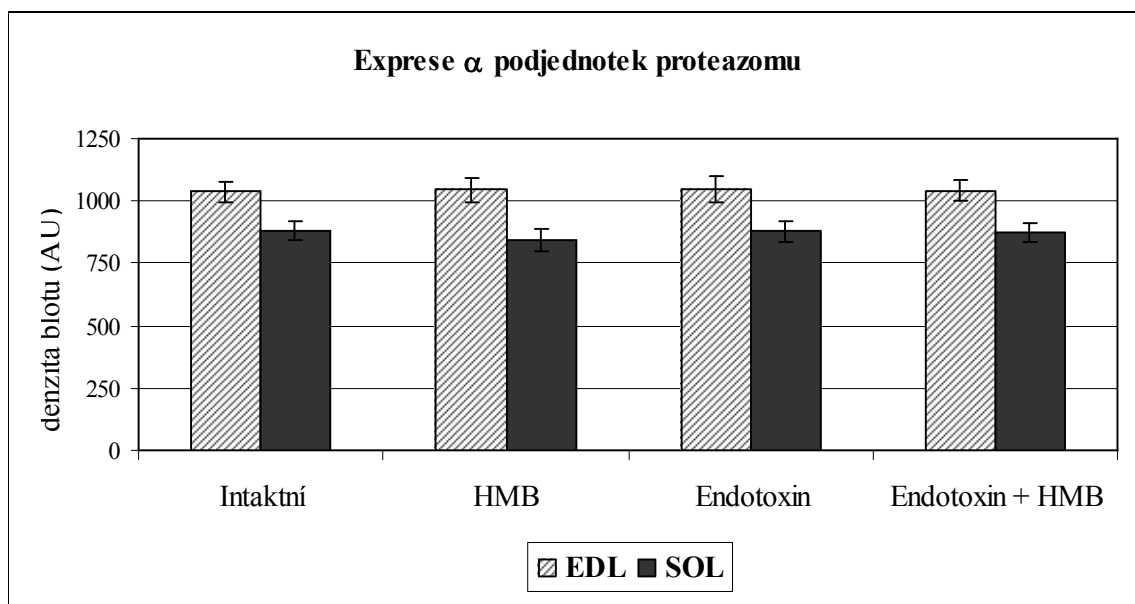
Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=9-10). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + HMB vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

Obrázek 18: Exprese  $\alpha$  podjednotek 20S proteazomu v SOL – příklad blotu



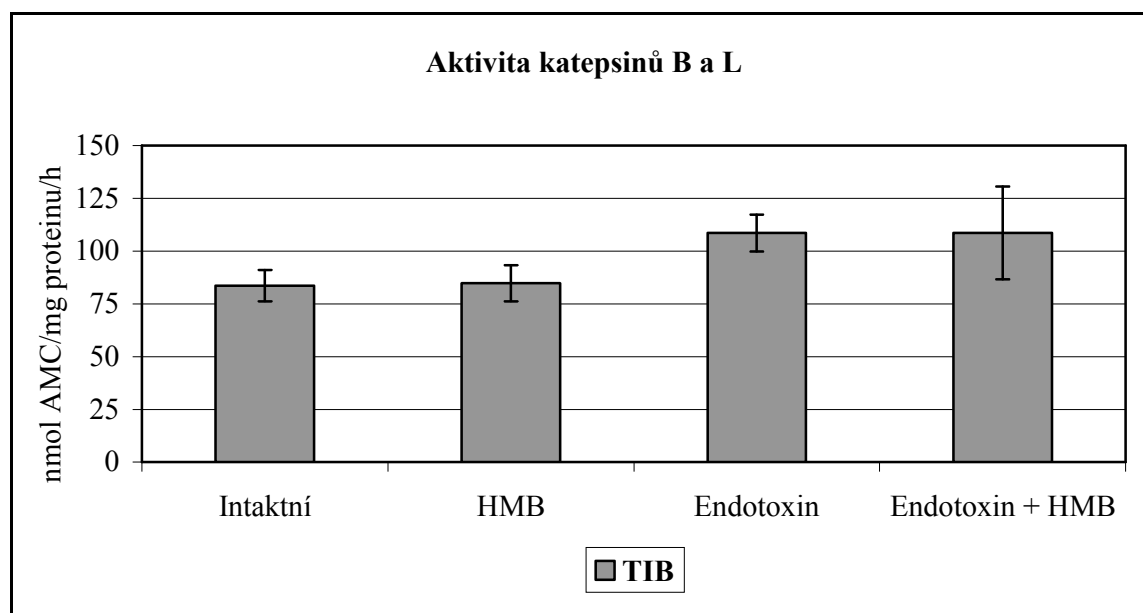
Dráhy: 1 – Intaktní; 2 –HMB; 3 – Endotoxin; 4 – Endotoxin + HMB;  
HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát

Obrázek 19: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na expresi  $\alpha$  podjednotek 20S proteazomu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát  
Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=9-10).

Obrázek 20: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na aktivitu katepsinů B a L v kosterním svalu



TIB – m. tibialis; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=8-10).

Podání endotoxinu způsobilo zvýšené uvolňování téměř všech aminokyselin z EDL do inkubačního média (vzrostlo i celkové množství uvolněných aminokyselin), pouze koncentrace glutaminu, kyseliny glutamové a taurinu v médiu nebyly zvýšeny v porovnání s intaktními zvířaty. U zdravých potkanů vrostlo vlivem HMB uvolňování kyseliny glutamové a taurinu do média, u endotoxemických se snížilo uvolňování tyrozinu do média (viz tab. 26).

Podání endotoxinu způsobilo zvýšené uvolňování argininu, fenylalaninu, glycinu, methioninu, threoninu, tyrozinu i BCAA ze SOL do inkubačního média oproti intaktním zvířatům, vzrostlo i celkové množství uvolněných aminokyselin. Podání HMB endotoxemickým potkanům zvýšilo množství uvolněného alaninu do média oproti intaktním zvířatům, na druhou stranu množství uvolněného fenylalaninu, methioninu, tyrozinu a BCAA se již na rozdíl od endotoxemických nelišilo od hodnot intaktních potkanů (viz tab. 27).

V EDL endotoxemických zvířat byl pozorován pokles syntézy proteinů o 31 % oproti svalům intaktních potkanů, podání HMB neovlivnilo proteosyntézu ani u endotoxemických, ani u zdravých zvířat. V SOL nebyly zjištěny významné změny proteosyntézy mezi jednotlivými skupinami (viz obr. 21).

Tabulka 26: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na uvolňování aminokyselin z EDL do inkubačního média

Aminokyselina	Uvolňování aminokyselin - EDL (nmol AK/g svalu/h)			
	Intaktní (n=10)	HMB (n=10)	Endotoxin (n=8)	Endotoxin + HMB (n=8)
Alanin	830 ± 56	996 ± 60	1689 ± 139*	1599 ± 46*
Arginin	145 ± 8	173 ± 7	326 ± 26*	285 ± 10*
Asparagin	134 ± 5	141 ± 5	345 ± 38*	291 ± 14*
Fenylalanin	157 ± 5	171 ± 4	356 ± 41*	284 ± 12*
Glutamin	1493 ± 77	1441 ± 36	1527 ± 141	1477 ± 46
Glycin	539 ± 37	561 ± 31	1208 ± 103*	1214 ± 32*
Histidin	140 ± 9	151 ± 7	250 ± 27*	207 ± 9*
Isoleucin	186 ± 7	199 ± 6	372 ± 44*	322 ± 15*
Kyselina glutamová	142 ± 13	236 ± 10*	135 ± 13	133 ± 17
Leucin	305 ± 13	334 ± 12	690 ± 82*	586 ± 26*
Lysin	361 ± 15	456 ± 13	747 ± 91*	661 ± 24*
Methionin	94 ± 4	102 ± 3	235 ± 29*	187 ± 8*
Serin	479 ± 25	507 ± 37	847 ± 55*	735 ± 25*
Taurin	163 ± 28	307 ± 46*	244 ± 35	278 ± 35
Threonin	301 ± 13	342 ± 11	690 ± 59*	615 ± 20*
Tyrozín	133 ± 4	150 ± 4	297 ± 35*	225 ± 9*†
Valin	257 ± 10	281 ± 9	575 ± 61*	477 ± 20*
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	748 ± 30	814 ± 27	1637 ± 187*	1385 ± 61*
<b>AK celkem</b>	6592 ± 321	7486 ± 217	11832 ± 998*	10714 ± 291*

EDL – m. extensor digitorum longus; HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát; AK – aminokyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + HMB vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

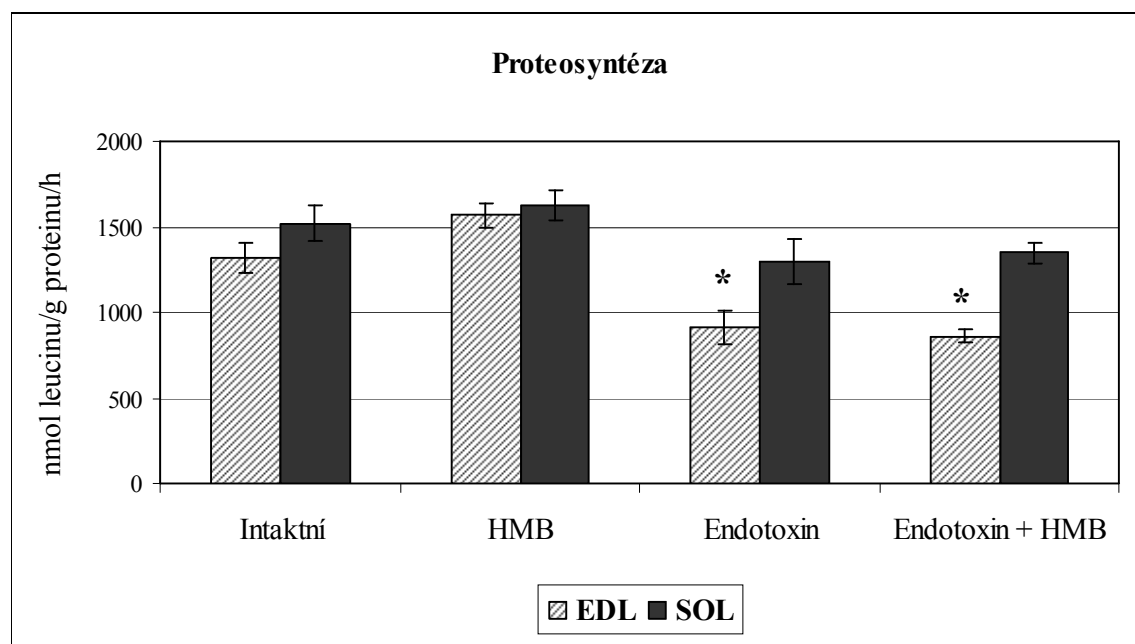
Tabulka 27: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na uvolňování aminokyselin z SOL do inkubačního média

Aminokyselina	Uvolňování aminokyselin - SOL (nmol AK/g svalu/h)			
	Intaktní (n=10)	HMB (n=10)	Endotoxin (n=9)	Endotoxin + HMB (n=9)
Alanin	1325 ± 72	1336 ± 76	1559 ± 100	1770 ± 87*
Arginin	366 ± 20	399 ± 39	537 ± 24*	498 ± 33*
Asparagin	296 ± 13	307 ± 31	378 ± 20	361 ± 19
Fenylalanin	325 ± 13	328 ± 24	445 ± 28*	383 ± 24
Glutamin	2608 ± 114	2479 ± 150	2328 ± 129	2608 ± 114
Glycin	889 ± 45	886 ± 48	1537 ± 98*	1516 ± 56*
Histidin	300 ± 12	311 ± 32	342 ± 24	330 ± 18
Isoleucin	337 ± 10	339 ± 21	415 ± 24*	392 ± 22
Kyselina glutamová	462 ± 32	524 ± 49	354 ± 42	442 ± 57
Leucin	630 ± 20	626 ± 38	810 ± 46*	742 ± 41
Lysin	676 ± 29	783 ± 65	807 ± 41	799 ± 41
Methionin	195 ± 8	191 ± 13	270 ± 12*	233 ± 15
Serin	876 ± 49	876 ± 115	1020 ± 80	1052 ± 71
Taurin	724 ± 106	668 ± 123	805 ± 147	1082 ± 228
Threonin	527 ± 25	529 ± 48	806 ± 50*	755 ± 30*
Tyrozín	274 ± 10	278 ± 20	364 ± 25*	319 ± 22
Valin	514 ± 17	517 ± 35	689 ± 41*	620 ± 33
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	1481 ± 46	1481 ± 94	1914 ± 110*	1754 ± 96
<b>AK celkem</b>	12273 ± 512	12415 ± 948	15411 ± 772*	15677 ± 759*

SOL – m. soleus; HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát; AK – aminokyselina; aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

Obrázek 21: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na proteosyntézu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát

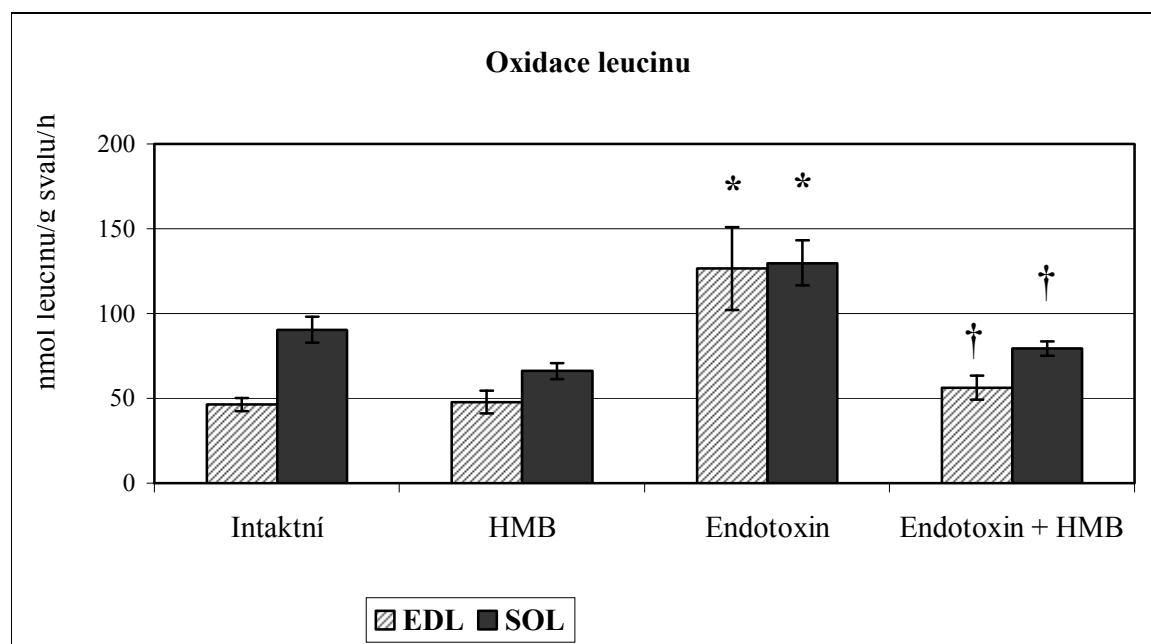
Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=9-10). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

Oxidace leucinu byla u endotoxemických zvířat významně zvýšena oproti intaktním (v EDL téměř trojnásobný nárůst, v SOL zvýšení téměř o polovinu). Podání HMB zdravým potkanům nemělo významný vliv na oxidaci leucinu, podání endotoxemickým ji snížilo až na hodnoty intaktních zvířat v obou typech svalu (viz obr. 22).

Tab. 28 ukazuje změny proteolytické aktivity proteazomu měřené jako ChTLA v jednotlivých tkáních. V játrech a slezině jsme pozorovali asi třetinové zvýšení ChTLA vlivem endotoxemie, v ledvinách došlo ke zvýšení asi o 20 % jak vlivem endotoxemie, tak HMB (aditivní účinek však pozorován nebyl). V srdci ani tenkém a tlustém střevu jsme významné změny ChTLA mezi experimentálními skupinami nezjistili.

Změny proteolytické aktivity lysozomálních katepsinů B a L vyjadřuje tab. 29. Podání HMB zdravým zvířatům vedlo téměř ke třetinovému snížení aktivity katepsinů v ledvinách, naproti tomu podání HMB endotoxemickým potkanům vedlo ke zvýšení aktivity katepsinů v srdci více než dvojnásobně. Po aplikaci endotoxinu vzrostla dvojnásobně aktivita katepsinů v tenkém střevě, podání HMB vedlo k normalizaci hodnot.

Obrázek 22: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na oxidaci leucinu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=9-10). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$ ; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + HMB vs. Endotoxin při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

Tabulka 28: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na chymotrypsin-like aktivitu proteazomu ve tkáních

Tkáň	Chymotrypsin-like aktivita proteazomu (nmol AMC/mg proteinu/h)			
	Intaktní (n=10)	HMB (n=10)	Endotoxin (n=9)	Endotoxin + HMB (n=9)
Játra	2,8 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,2*	3,6 $\pm$ 0,2*
Ledviny	4,2 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2*	5,0 $\pm$ 0,1*	5,3 $\pm$ 0,1*
Slezina	3,9 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1	5,6 $\pm$ 0,2*	5,3 $\pm$ 0,2*
Srdce	2,8 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,2
Tenké střevo	3,1 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 0,6	5,1 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 0,8
Tlusté střevo	6,7 $\pm$ 2,7	5,9 $\pm$ 2,0	1,9 $\pm$ 0,8	4,3 $\pm$ 1,9

HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=9-10). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)



Tabulka 29: Vliv HMB (0,5 g/kg/den) na aktivitu katepsinů B a L ve tkáních

Tkáň	Aktivita katepsinů B a L (nmol AMC/mg proteinu/h)			
	Intaktní (n=10)	HMB (n=10)	Endotoxin (n=9)	Endotoxin + HMB (n=9)
Játra	540 ± 35	538 ± 51	525 ± 84	717 ± 137
Ledviny	4910 ± 301	3363 ± 354*	5189 ± 366	4510 ± 450
Slezina	391 ± 70	457 ± 67	608 ± 102	712 ± 161
Srdce	228 ± 38	381 ± 83	357 ± 79	541 ± 83*
Tenké střevo	1395 ± 135	1326 ± 160	2780 ± 412*	1625 ± 228†
Tlusté střevo	905 ± 207	786 ± 139	1071 ± 226	495 ± 163

HMB – β-hydroxy-β-methylbutyrát; AMC – 7-amino-4-methylkumarin

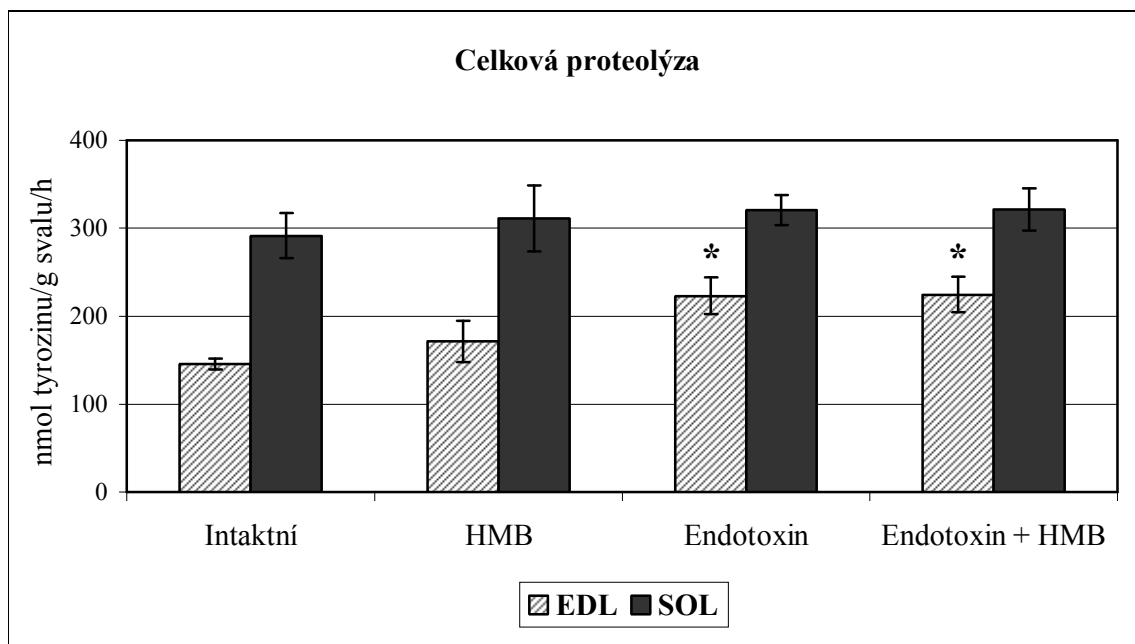
Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM (n=9-10). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při P ≤ 0,05; † - signifikantní rozdíl Endotoxin + HMB vs. Endotoxin při P ≤ 0,05 (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test)

#### 4.2.2.3 Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních a endotoxemických zvířat – studie *in vitro*

Potkanům byl intraperitoneálně injikován endotoxin v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti nebo stejný objem fyziologického roztoku (viz kapitola 3.2 *Endotoxinový/lipopolysacharidový model sepse*). Po 24 hodinách byly odebrány svaly (EDL, SOL) a využity ke stanovení (celkové a myofibrilární) proteolýzy a množství uvolněných aminokyselin do inkubačního média nebo ke stanovení proteosyntézy a oxidace leucinu. Výsledná koncentrace HMB v inkubačním médiu byla 2 mmol/l. Tato dávka byla zvolena dle studie *Ostaszewského a kol. (2000)* a předběžných testů. Vždy byly odebrány oba kontralaterální svaly – k pravému svalu bylo přidáno příslušné inkubační médium obohacené o HMB, k levému svalu médium neobsahující HMB. V každé skupině bylo alespoň 6 zvířat.

Přidání 2 mmol/l HMB do média rychlost degradace proteinů neovlivnilo v ani jednom typu sledovaných svalů. Podání endotoxinu vedlo k asi 50% zvýšení celkové (viz obr. 23) a asi 70% nárůstu myofibrilární (viz obr. 24) proteolýzy v EDL ve srovnání se svaly intaktních zvířat, v SOL nebyly pozorovány významné změny proteolýzy vlivem endotoxemie.

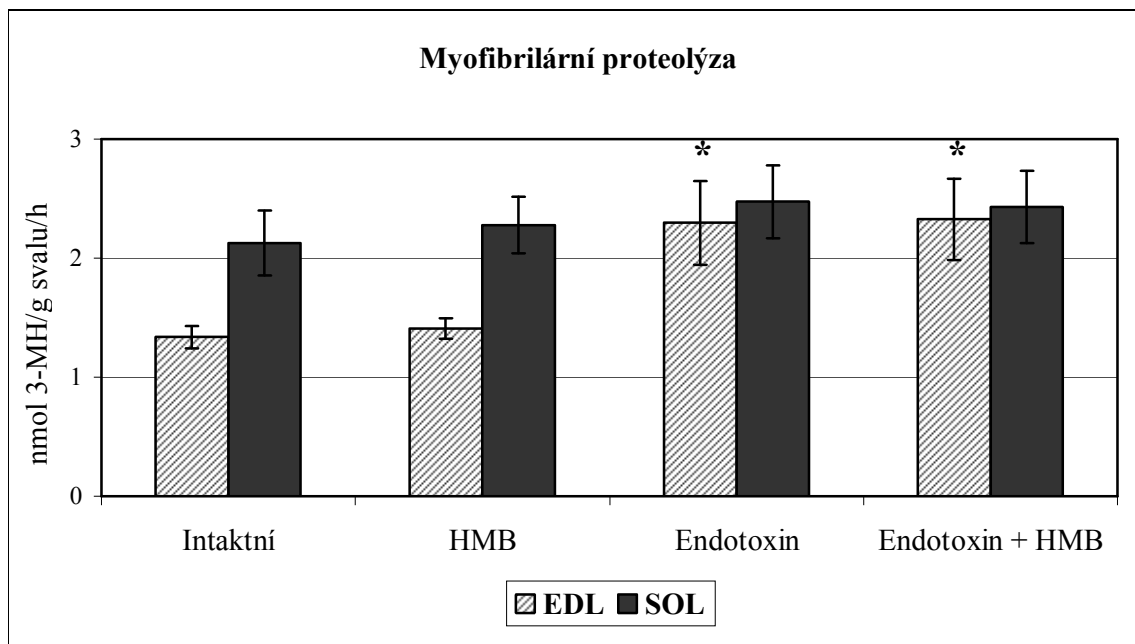
Obrázek 23: Vliv HMB (2 mmol/l) na celkovou proteolýzu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=6). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Obrázek 24: Vliv HMB (2 mmol/l) na myofibrilární proteolýzu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; 3-MH – 3-methylhistidin; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát

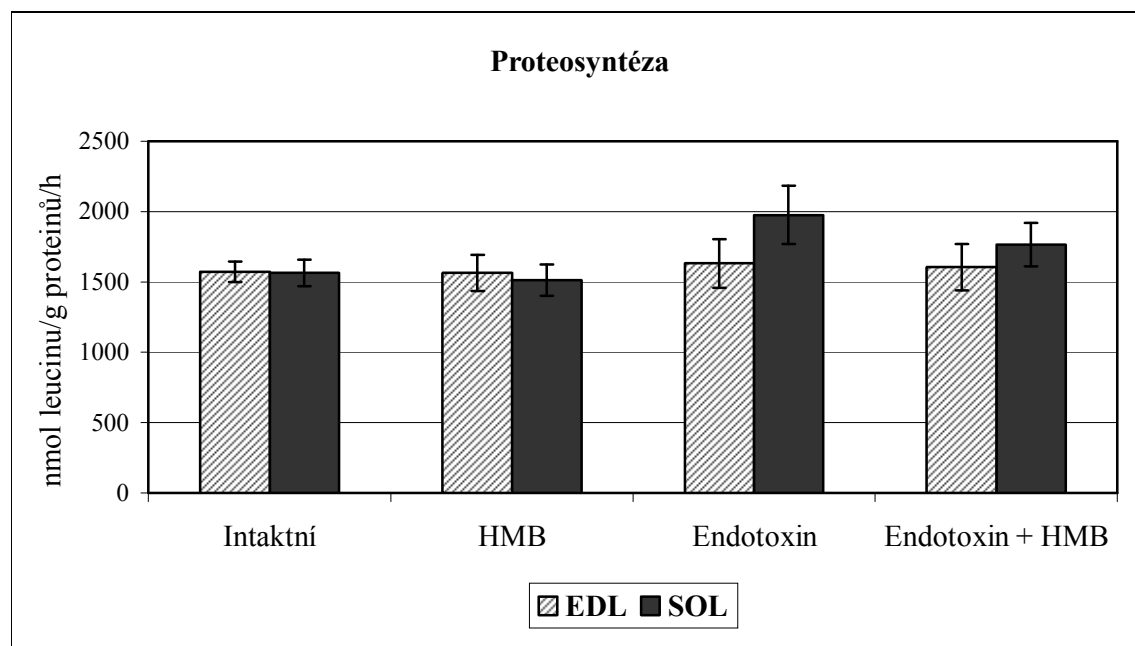
Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=6). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Proteosyntéza v kosterním svalu nebyla přidáním 2 mmol/l HMB do inkubačního média významně ovlivněna jak u intaktních, tak u endotoxemických zvířat. Ani podání endotoxinu nevyvolalo významnou změnu tohoto parametru, ač v SOL endotoxemických zvířat byla sledována tendence zvýšení proteosyntézy (viz obr. 25).

Přidání 2 mmol/l HMB do inkubačního média snížilo oxidaci leucinu v SOL intaktních zvířat o 23 %. Naopak ve svalech endotoxemických zvířat vedlo k více než 50% nárůstu oxidace leucinu v SOL a 70% nárůstu v EDL ve srovnání s intaktními potkany. Zvýšení oxidace leucinu vlivem endotoxinu nedosáhlo statistické významnosti (viz obr. 26).

Množství uvolněných aminokyselin do média záviselo na typu svalu, ve kterém bylo stanovováno. Vlivem endotoxemie došlo ke zvýšenému uvolňování většiny aminokyselin (jmenovitě alaninu, asparaginu, fenylalaninu, glycinu, methioninu, serinu, threoninu, tyrozinu a všech tří BCAA) do média z EDL ve srovnání s intaktními zvířaty, vyšší bylo i celkové množství uvolněných aminokyselin (viz tab. 30); v případě SOL podání endotoxinu významně neovlivnilo uvolňování žádné ze stanovovaných aminokyselin (viz tab. 31). Přidání 2 mmol/l HMB do média nevedlo ke změnám v uvolňování aminokyselin do média v ani jednom typu svalu.

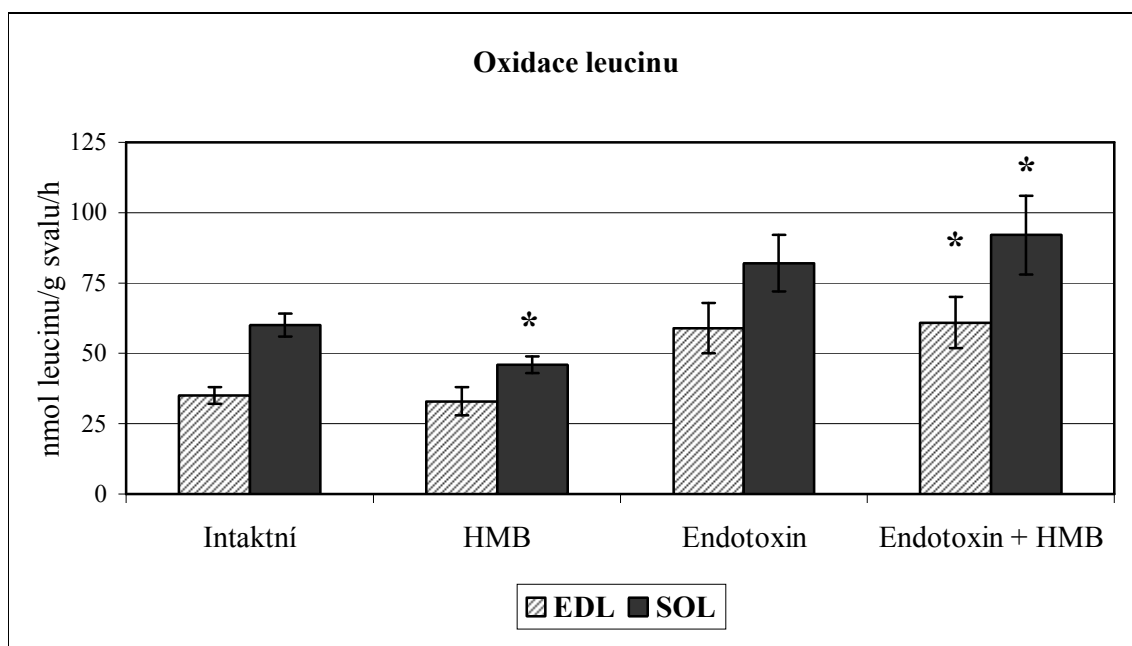
Obrázek 25: Vliv HMB (2 mmol/l) na proteosyntézu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát;

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=7).

Obrázek 26: Vliv HMB (2 mmol/l) na oxidaci leucinu v kosterním svalu



EDL – m. extensor digitorum longus; SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát;

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=7). \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Tabulka 30: Vliv HMB (2 mmol/l) na uvolňování aminokyselin z EDL do inkubačního média

Aminokyselina	Uvolňování aminokyselin - EDL (nmol AK/g svalu/h)			
	Intaktní (n=6)	HMB (n=6)	Endotoxin (n=6)	Endotoxin + HMB (n=6)
Alanin	865 ± 88	928 ± 82	1683 ± 149*	1648 ± 141*
Arginin	206 ± 14	270 ± 53	258 ± 16	261 ± 14
Asparagin	138 ± 6	175 ± 26	279 ± 34*	283 ± 32*
Citrulin	151 ± 8	153 ± 5	136 ± 9	132 ± 11
Fenylalanin	182 ± 6	211 ± 29	284 ± 29*	286 ± 25*
Glutamin	1627 ± 76	1920 ± 148	1481 ± 102	1575 ± 43
Glycin	760 ± 27	908 ± 85	1081 ± 47*	1061 ± 51*
Histidin	126 ± 6	153 ± 20	185 ± 21	178 ± 16
Isoleucin	172 ± 6	201 ± 27	269 ± 15*	272 ± 30*
Kyselina glutamová	187 ± 20	208 ± 44	173 ± 19	146 ± 15
Leucin	331 ± 12	384 ± 49	495 ± 28*	508 ± 50*
Lysin	492 ± 23	550 ± 39	607 ± 67	624 ± 59
Methionin	103 ± 5	121 ± 16	187 ± 20*	187 ± 18*
Prolin	394 ± 12	451 ± 44	496 ± 25	506 ± 28
Serin	541 ± 22	614 ± 54	772 ± 35*	772 ± 42*
Threonin	365 ± 21	397 ± 28	605 ± 39*	604 ± 38*
Tyrozín	146 ± 6	171 ± 23	223 ± 21*	224 ± 20*
Valin	296 ± 12	341 ± 40	443 ± 27*	456 ± 42*
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	800 ± 29	926 ± 115	1207 ± 69*	1237 ± 122*
<b>AK celkem</b>	7065 ± 192	8154 ± 726	9657 ± 613*	9723 ± 581*

EDL – m. extensor digitorum longus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát; AK – aminokyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. \* - signifikantní rozdíl vs. Intaktní při  $P \leq 0,05$  (jednocestná ANOVA + Tukey-Kramerův test).

Tabulka 31: Vliv HMB (2 mmol/l) na uvolňování aminokyselin z SOL do inkubačního média

Aminokyselina	Uvolňování aminokyselin - SOL (nmol AK/g svalu/h)			
	Intaktní (n=6)	HMB (n=6)	Endotoxin (n=6)	Endotoxin + HMB (n=6)
Alanin	1487 ± 175	1578 ± 210	1518 ± 98	1676 ± 87
Arginin	494 ± 82	535 ± 60	472 ± 27	526 ± 43
Asparagin	340 ± 47	361 ± 45	375 ± 50	395 ± 29
Citrulin	190 ± 30	183 ± 19	132 ± 5	140 ± 13
Fenylalanin	365 ± 31	392 ± 49	410 ± 21	407 ± 29
Glutamin	2515 ± 233	2827 ± 357	2361 ± 217	2716 ± 202
Glycin	1296 ± 124	1264 ± 126	1415 ± 74	1341 ± 87
Histidin	282 ± 29	303 ± 39	263 ± 21	294 ± 18
Isoleucin	351 ± 27	375 ± 45	398 ± 23	365 ± 20
Kyselina glutamová	612 ± 93	545 ± 74	329 ± 62	423 ± 65
Leucin	652 ± 53	700 ± 38	738 ± 40	687 ± 38
Lysin	896 ± 108	1002 ± 134	771 ± 35	839 ± 71
Methionin	210 ± 18	225 ± 28	237 ± 17	242 ± 19
Prolin	699 ± 65	740 ± 84	672 ± 38	691 ± 36
Serin	1092 ± 118	1096 ± 142	1002 ± 58	1055 ± 47
Threonin	600 ± 60	628 ± 81	748 ± 52	748 ± 41
Tyrozín	292 ± 25	311 ± 38	321 ± 17	321 ± 24
Valin	578 ± 46	626 ± 76	636 ± 32	635 ± 41
<b>Odvozené hodnoty</b>				
<b>BCAA</b>	1581 ± 126	1700 ± 204	1771 ± 94	1687 ± 99
<b>AK celkem</b>	12949 ± 1272	13690 ± 1635	12795 ± 729	13503 ± 800

SOL – m. soleus; HMB –  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát; AK – aminokyselina; BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM.

## 5. Diskuze

### 5.1 Vliv endotoxinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin

Výsledky pilotní studie, jejímž cílem bylo vybrat vhodnou dávku endotoxinu k vyvolání proteokatabolického stavu v kosterním svalu, potvrdily předpoklad, že účinky endotoxinu závisí na zvolené dávce. Již 24 hodin po aplikaci endotoxinu byl patrný nižší přírůstek tělesné hmotnosti ve srovnání s intaktními zvířaty. Nejvýraznější úbytek tělesné hmotnosti byl sledován při podání dávky 5 mg/kg. Porovnání poměru suché a vlhké hmotnosti různých orgánů neprokázalo mezi jednotlivými skupinami významné rozdíly, takže se na ztrátě tělesné váhy podílela spíše ztráta bílkovin, tuků či glykogenu a ne dehydratace organismu, ač je často popisována po podání endotoxinu (*Nemzek a kol. 2008*).

Hyperlipidemie po podání endotoxinu byla pozorována i v pracích jiných autorů (*Roelfsema a kol. 2001; Casanovas a kol. 2009*). Bylo popsáno, že je způsobena inhibicí aktivity lipoproteinové lipázy na posttranslační úrovni – nitrací tyrozinových zbytků tohoto enzymu oxidem dusnatým. Skutečnost, že zvýšení koncentrací celé řady aminokyselin bylo pozorováno zejména při podání dávky 1 mg endotoxinu/kg, lze vysvětlit rozdílnou odpovědí kosterního svalu a viscerálních tkání. U vyšších koncentrací endotoxinu bylo zřejmě viscerálními tkáněmi utilizováno větší množství aminokyselin uvolněných z bílkovin svalu pro tvorbu bílkovin, např. proteinů akutní fáze nebo cytokinů. Zvýšená produkce cytokinů je známa a byla doložena jak po podání endotoxinu (*Dehoux a kol. 2003*), tak u modelů sepse (*Safranek a kol. 2006 a; Lustig a kol. 2007*), v naší práci jsme se stanovením cytokinů nezabývali.

Podání endotoxinu vyvolalo v kosterním svalu proteokatabolický stav (nejvíce rozvinutý při nejvyšší dávce endotoxinu). Byl pozorován nárůst jak celkové, tak myofibrilární proteolýzy. Zatímco celková proteolýza vzrostla nezávisle na dávce endotoxinu, ovlivnění myofibrilární proteolýzy v kosterním svalu jevílo dávkovou závislost (stejně jako u změny tělesné hmotnosti jsme maximální nárůst myofibrilární proteolýzy zaznamenali při dávce 5 mg/kg). V souladu s aktivací proteolýzy bylo pozorováno také zvýšené uvolňování většiny aminokyselin ze svalu do inkubačního média, snížená koncentrace glutaminu ve svalu a zvýšená oxidace leucinu, jev popisovaný charakteristicky při nemocech doprovázených ztrátou proteinů (*Yoshida a kol. 1991; Holecek a kol. 1997*). Na rozdíl od proteolýzy jsme u

proteosyntézy pozorovali nejednoznačné výsledky – v závislosti na použité metodice stanovení. Zatímco v případě stanovení frakční proteosyntézy *in vivo* (pomocí infuze izotopu leucinu) jsme pozorovali indukci syntézy proteinů, v případě stanovení v uspořádání *in vitro* (na izolovaném svalu) v rámci studie s HMB byla zjištěna inhibice proteosyntézy vlivem endotoxinu. V literatuře je většinou popisována po podání endotoxinu inhibice proteosyntézy (Lang a kol. 2007), nicméně existují i práce dokládající její nárůst (Holecek a kol. 1997).

Stanovení aktivit hlavních intracelulárních proteolytických systémů, ubikvitin-proteazomového a lysozomálního, prokázalo, že příčinou proteokatabolického stavu v kosterním svalu, navozeného podáním endotoxinu, je aktivace proteazomového systému. Naše výsledky se shodují se soudobými představami, že proteazomový systém hraje klíčovou úlohu při aktivaci intracelulární proteolýzy za mnoha katabolických stavů, jako jsou sepse (Fischer a kol. 2000), nádory (Khal a kol. 2005), popáleniny (Chai a kol. 2002), chronická onemocnění ledvin (Rajan a Mitch 2008) nebo denervační atrofie (Wing a kol. 1995). Jelikož spolu se změnou aktivity proteazomu nebyly zjištěny změny v expresi  $\alpha$ -podjednotek proteazomu (známka nezměněné exprese proteazomu jako celku), předpokládáme, že jsou uvedené změny způsobeny ovlivněním katalytické aktivity proteazomu. To je v souladu s pozorováním, že změny proteolytické aktivity a transkripce různých složek proteazomu na úrovni mRNA ne vždy korelují se změnami exprese na úrovni proteinu (Hobler a kol. 1999). Práce na jiných modelech proteokatabolického stavu ovšem ukazují, že na regulaci proteolytické aktivity proteazomu se mohou také podílet změny exprese jeho složek (Smith a kol. 2004). Regulace aktivity proteazomu je tedy komplexní jev a za různých podmínek se mohou na ní podílet různé mechanismy. Aktivace proteazomu vlivem aplikace endotoxinu se neomezovala pouze na kosterní sval, ale sledovali jsme ji i v jiných tkáních např. játrech, ledvinách nebo slezině. Pokud bychom ovšem zohlednili kvantitativní hledisko, pak k nejintenzivnější aktivaci došlo v kosterním svalu, zejména ve svalech s převahou bílých, rychlých vláken.

Z porovnání dávkové závislosti endotoxinu na sledované parametry metabolismu bílkovin a aminokyselin je patrné, že dávka 5 mg/kg vyvolává po 24 hodinách nejvýraznější změny mnoha z těchto parametrů např. pokles tělesné hmotnosti, nárůst myofibrilární proteolýzy, zvýšené uvolňování aminokyselin z kosterního svalu či poměr relativní změny myofibrilární proteolýzy a proteosyntézy. Tato dávka byla tudíž zvolena jako nejvhodnější k vyvolání proteokatabolického stavu v kosterním svalu potkana a použita v dalších experimentech.



## **5.2 Vliv metabolitů leucinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin**

### **5.2.1 Vliv KIC na metabolismus bílkovin a aminokyselin**

#### 5.2.1.1 Vliv KIC na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních a endotoxemických zvířat – studie *in vivo*

Vzhledem k tomu, že KIC je v organismu metabolizován na HMG-koenzym A, prekurzor pro syntézu cholesterolu, není úplně překvapivé zjištění, že podání KIC navodilo zvýšení plazmatických koncentrací cholesterolu u zdravých i endotoxemických zvířat (*Nissen a Abumrad 1997*). Zvýšená plazmatická koncentrace leucinu mohla být způsobena reaminací podaného KIC.

V souladu s tím, že podání KIC významně neovlivnilo žádný z námi sledovaných parametrů metabolismu proteinů, bez ohledu na typ kosterního svalu, nebyly pozorovány ani změny v uvolňování aminokyselin ze svalu do inkubačního média (až na výjimku glutaminu a argininu). Existují práce jiných autorů popisující ovlivnění metabolismu proteinů vlivem KIC, a to jak zásahem do proteosyntézy, tak proteolýzy v kosterním svalu (*Yoshizawa a kol. 2004; Nakashima a kol. 2007*). V těchto pracích ovšem, na rozdíl od našeho experimentu, nebyly stanovovány parametry metabolismu proteinů přímo, na jejich ovlivnění bylo poukázáno pomocí stanovení exprese složek proteolytických systémů na úrovni mRNA nebo fosforylace faktorů podílejících se na iniciaci translace.

Mechanismus zvýšení aktivity proteolytických systémů v mimosvalové tkáni – jak ubikvitin-proteazomového (měřeno jako ChTLA), tak lysozomálního (měřeno jako aktivita katepsinů B a L) – při aplikaci kombinace KIC s endotoxinem neznáme. Neboť tento jev dosud nebyl popsán a podání samotného KIC ani endotoxinu proteolytickou aktivitu významně neovlivnilo. Navíc práce zabývající se vlivem KIC na proteolýzu se omezují především na kosterní sval, případně játra.

## 5.2.2 Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin

### 5.2.2.1 Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin intaktních zvířat – studie *in vivo*

Zvýšení plazmatické koncentrace cholesterolu po podání HMB lze vysvětlit tím, že HMB je v organismu metabolizován na HMG-koenzym A. Toto tvrzení dále posiluje fakt, že podobný nárůst plazmatické koncentrace cholesterolu jsme popsali i při podávání KIC, prekurzoru HMB. Navíc již dříve bylo pomocí radioizotopových metod prokázáno, že HMB slouží jako prekurzor pro syntézu cholesterolu (*Bloch a kol. 1954*). Naproti tomu výsledky toxicitní studie neprokazují, že by mělo podávání HMB vliv na hladiny základních živin či výskyt nežádoucích účinků (*Baxter a kol. 2005*).

Hlavním mechanismem, který se podílí na přibývání svalové tkáně po podání HMB, je spíše pokles proteolýzy a ne nárůst proteosyntézy, neboť jsme po aplikaci HMB zaznamenali snížení celotělového obratu proteinů (pokles proteolýzy i proteosyntézy). Výsledky této studie jsou v souladu s prací *Ostaszewského a kol. (2000)*, kde přidání HMB do inkubačního média snížilo proteolýzu v izolovaných svalech, ale nezpůsobilo nárůst proteosyntézy. HMB zřejmě nemá vliv na aktivitu BCKD, klíčového enzymu metabolismu BCAA, protože neovlivnilo oxidaci leucinu (KIC, tedy prekurzor HMB zvyšuje aktivitu BCKD díky inhibici BCKD kinázy).

Jelikož kosterní sval tvoří velkou část zásoby proteinů organismu, reflektují změny celotělového obratu proteinů vlivem HMB zejména zásah do metabolismu proteinů v kosterním svalu. Tuto hypotézu podporuje zjištění, že HMB způsobuje pokles aktivity ubikvitin-proteazomového proteolytického systému (nejdůležitějšího systému zodpovědného za degradaci intracelulárních proteinů) v kosterním svalu. Naproti tomu v jiných tkáních jsme změny aktivity tohoto systému nezaznamenali. Příčinu poklesu aktivity proteazomu výhradně v kosterním svalu neznáme. Jedním z možných vysvětlení mohou být rozdíly mezi jednotlivými tkáněmi v aktivitě enzymů podílejících se na syntéze a metabolismu HMB. Např. vysoká aktivita BCAT v kombinaci s nízkou aktivitou BCKD ve svalu může vést k přeměně většího množství KIC na HMB pomocí KIC-dioxygenázy. Bohužel na rozdíl od BCAT a BCKD, chybí práce detailně se zabývající tkáňovými rozdíly v aktivitě KIC dioxygenázy.

V souladu s poklesem celotělové proteosyntézy jsme zjistili po podání HMB pokles proteosyntézy v téměř všech měřených tkáních (srdce, ledviny, slezina, tlusté střevo). Na poklesu proteosyntézy se mohla podílet snížená dostupnost některých aminokyselin, způsobená poklesem proteolýzy v kosterním svalu. Tomu odpovídají snížené plazmatické koncentrace alaninu, glutaminu, kyseliny glutamové a serinu (naproti tomu plazmatické koncentrace citrulinu, leucinu a sumy všech BCAA vzrostly). Jedinou tkání, ve které jsme pozorovali zvýšení proteosyntézy, byla játra. Mechanismus zvýšení proteosyntézy v jaterní tkáni není znám, stejně tak zda dochází ke stimulaci tvorby některé selektivní skupiny proteinů.

#### 5.2.2.2 Vliv HMB na metabolismus bílkovin a aminokyselin endotoxemických zvířat – studie *in vivo*

Z výsledků vyplývá, že podání HMB septickým potkanům zmírnilo degradaci proteinů (celková i myofibrilární proteolýza), aktivovanou aplikací endotoxinu, zatímco pokles proteosyntézy významně neovlivnilo. Poklesu myofibrilární proteolýzy odpovídala inhibice proteolytické aktivity proteazomu (stanovena jako ChTLA), zatímco aktivita lysozomálních enzymů významně ovlivněna nebyla. Proto můžeme soudit, že hlavním mechanismem tlumivého účinku HMB na proteolýzu je právě inhibice ubikvitin-proteazomového systému. Podobné závěry vplynuly i z práce provedené na kosterním svalu myši s tumorem indukovanou proteolýzou (adenokarcinom MAC16) (Smith a kol. 2005).

O mechanismu, jakým aplikace HMB snížila oxidaci leucinu (indikující oxidaci všech tří BCAA) ve svalech endotoxemických zvířat, můžeme pouze spekulovat, je to nový poznatek. Klíčový enzym oxidace BCAA, BCKD je alostericky aktivována KIC (Brosnan a Brosnan 2006). Vznik KIC z leucinu je katalyzován BCAT, která je aktivována svým substrátem, leucinem (detailní popis viz kapitola 1.3.1 *Metabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem*). Domníváme se, že podáním HMB vyvolaný pokles proteolýzy a snížené uvolňování leucinu (i dalších BCAA) z proteinů svalu způsobuje snížení dostupnosti KIC a pokles oxidace BCAA. Hypotézu o nepřímém vlivu HMB na oxidaci BCAA podporuje také fakt, že podání HMB zdravým zvířatům oxidaci leucinu významně neovlivnilo.

### 5.2.2.3 Vliv HMB na metabolismus bílkovin v kosterním svalu – studie *in vitro*

Neprokázali jsme přímý vliv HMB na metabolismus proteinů, protože přidání HMB o koncentraci 2 mmol/l do inkubačního média neovlivnilo proteolýzu a proteosyntézu v kosterním svalu intaktních a endotoxemických zvířat ani uvolňování aminokyselin z inkubovaných svalů do média. Náš závěr je v rozporu se studií *Ostaszewského a kol. (2000)*, ve které byla popsána inhibice proteolýzy ve svalech intaktních zvířat po přidání HMB do inkubačního média. Nelze ovšem vyloučit možnost, že by se přímý vliv HMB na metabolismus bílkovin prokázal až po delším působení. Pozorovali jsme snížení oxidace leucinu v SOL zdravých zvířat a případná změna koncentrace leucinu by mohla metabolismus bílkovin ovlivnit.

## 5.3 Porovnání metabolismu bílkovin mezi EDL a SOL – vliv endotoxinu a metabolitů leucinu

Mezi svaly lišícími se ve složení svalových vláken jsou patrné rozdíly v metabolismu proteinů. Z porovnání námi zkoumaných svalů, EDL (sval složený převážně z bílých, rychlých vláken) a SOL (sval složený převážně z červených, pomalých vláken), vyplývá, že v SOL je vyšší obrat proteinů než v EDL (vyšší rychlost jak proteolýzy, tak proteosyntézy). Účinek endotoxinu byl však výraznější v EDL než v SOL – byla pozorována intenzivnější aktivace proteolýzy i oxidace leucinu a zároveň intenzivnější inhibice proteosyntézy. Vyšší senzitivita svalů obsahujících převážně bílá, rychlá vlákna byla popsána také na jiných modelech zánětu např. aplikace terpentýnového oleje (*Muthny a kol. 2008*) nebo ligace a punkce caeca (*Tiao a kol. 1997 b; Safranek a kol. 2006 b*). Příčinou odlišného ovlivnění různých typů svalu je zřejmě rozdílná senzitivita vůči mediátorům produkovaných v průběhu sepse, ať už jde o glukokortikoidy (*Larbaud a kol. 2001*) nebo cytokiny (*Fang a kol. 1995*).

Zatímco rozdíly účinku KIC na různé svaly prokázány nebyly, je z našich výsledků patrné, že účinek HMB významně závisel na typu svalu. Je ovšem nutné vzít v potaz, že ani samotné podání KIC významně neovlivnilo metabolismus proteinů, a tak se potenciální rozdíl v účinku na jednotlivé svaly zřejmě neměl možnost projevit. Tuto hypotézu potvrzuje také to, že rozdíly v účinku HMB se projevíly u septických zvířat a ne u zdravých. Ačkoliv aplikace HMB endotoxemickým potkanům vyvolala výraznější pokles většiny parametrů degradace

proteinů (celková proteolýza, ChTLA, oxidace leucinu) v EDL, výraznější útlum myofibrilární proteolýzy jsme pozorovali v SOL. Vzhledem k tomu, že myofibrilární proteiny jsou obzvláště citlivé k degradaci vlivem sepse (*Hasselgren a Fischer 1998*), zdá se, že více prospěšný bude účinek HMB u sepse ve svalech obsahujících vyšší množství červených, pomalých vláken než ve svalech obsahujících převahu bílých, rychlých vláken. Protože jsou červená, pomalá vlákna důležitou a podstatnou složkou dýchacích svalů (*Polla, 2004*), které jsou životně důležité při závažném onemocnění, může mít toto zjištění i praktický dopad.

## 6. Závěry

- 1) Prokázali jsme rozvoj proteokatabolického stavu po podání endotoxinu v kosterním svalu, nejvýrazněji se změny metabolismu bílkovin projevily u dávky 5 mg endotoxinu/kg tělesné hmotnosti. Vůči účinku endotoxinu byl více senzitivní EDL.
- 2) Neprokázali jsme vliv KIC na metabolismus bílkovin v kosterním svalu.
- 3) Potvrdili jsme pokles celotělového obratu bílkovin po podání HMB u zdravých zvířat a příznivý účinek na metabolismus bílkovin kosterního svalu v proteokatabolických podmínkách. Přímý účinek HMB na kosterní sval však zjištěn nebyl. Prokázali jsme rozdílný účinek HMB na svaly lišící se ve složení svalových vláken.

Pro závěr číslo 1 svědčí, že podání endotoxinu vyvolalo:

- pokles tělesné hmotnosti zvířat úměrný dávce endotoxinu (maximum u dávky 5 mg/kg tělesné hmotnosti)
- nárůst plazmatické koncentrace triacylglycerolu, celkového cholesterolu, močoviny a celé řady aminokyselin a pokles koncentrace glukózy, HDL cholesterolu, kyseliny glutamové a taurinu
- stimulaci celkové i myofibrilární proteolýzy v kosterním svalu (absolutně i relativně ve srovnání se změnami proteosyntézy) (maximum u dávky 5 mg/kg tělesné hmotnosti)
- nárůst oxidace leucinu v kosterním svalu
- zvýšené uvolňování aminokyselin ze svalu do inkubačního média
- stimulaci proteolytické aktivity proteazomu v kosterním svalu i mimosvalové tkáni (v játrech, ledvinách a slezině)
- vzrůst aktivity katepsinů B a L v tenkém střevě
- intenzivnější inhibici proteosyntézy a aktivaci proteolýzy a oxidace leucinu v EDL

Pro závěr číslo 2 svědčí, že podání KIC:

- nemělo významný vliv na proteosyntézu v kosterním svalu zdravých ani endotoxemických zvířat
- nemělo významný vliv na proteolýzu v kosterním svalu zdravých ani endotoxemických zvířat

Pro závěr číslo 3 svědčí, že:

- podání HMB zdravým potkanům vyvolalo:
  - nárůst plazmatické koncentrace celkového cholesterolu, citrulinu a leucinu a pokles koncentrace alaninu, glutaminu, kyseliny glutamové a serinu
  - pokles celotělového obratu bílkovin (inhibice proteosyntézy i proteolýzy) a clearance leucinu
  - inhibice proteosyntézy v ledvinách, slezině, srdci a tlustém střevě a stimulace proteosyntézy v játrech
  - útlum proteolytické aktivity proteazomu v kosterním svalu
  
- podání HMB endotoxemickým potkanům vyvolalo:
  - pokles plazmatické koncentrace močoviny
  - snížení celkové i myofibrilární proteolýzy v kosterním svalu
  - inhibici proteolytické aktivity proteazomu v kosterním svalu
  - útlum oxidace leucinu v kosterním svalu
  - výraznější pokles hodnot většiny parametrů degradace proteinů v EDL a větší pokles myofibrilární degradace v SOL
  
- přidání HMB do inkubačního média:
  - nemá vliv na metabolismus proteinů v kosterním svalu u zdravých ani endotoxemických zvířat (neovlivnilo proteolýzu ani proteosyntézu)
  - snížilo oxidaci leucinu v SOL zdravých zvířat

## 7. Literatura

1. **Adib-Conquy M, Cavaillon JM.** Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3723-33.
2. **Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.** Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303-10.
3. **Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B; CUB-Réa Network.** Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(2):165-72.
4. **Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS.** Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J Nutr.* 2000;130(2):139-45, a.
5. **Anthony JC, Reiter AK, Anthony TG, Crozier SJ, Lang CH, MacLean DA, Kimball SR, Jefferson LS.** Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. *Diabetes.* 2002;51(4):928-36.
6. **Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR.** Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 2000;130(10):2413-9, b.
7. **Baier S, Johannsen D, Abumrad N, Rathmacher JA, Nissen S, Flakoll P.** Year-long changes in protein metabolism in elderly men and women supplemented with a nutrition cocktail of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), L-arginine, and L-lysine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2009;33(1):71-82.
8. **Baxter JH, Carlos JL, Thurmond J, Rehani RN, Bultman J, Frost D.** Dietary toxicity of calcium beta-hydroxy-beta-methyl butyrate (CaHMB). *Food Chem Toxicol.* 2005;43(12):1731-41.
9. **Bloch K, Clark LC, Harary I.** Utilization of branched chain acids in cholesterol synthesis. *J Biol Chem.* 1954;211(2):687-99.
10. **Bolster DR, Vary TC, Kimball SR, Jefferson LS.** Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *J Nutr.* 2004;134:1704-10.



11. **Bottinelli R, Reggiani C.** Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol.* 2000;73(2-4):195-262.
12. **Breuille D, Voisin L, Contrepois M, Arnal M, Rose F, Obled C.** A sustained rat model for studying the long-lasting catabolic state of sepsis. *Infect Immun.* 1999;67(3):1079-85.
13. **Brosnan JT, Brosnan ME.** Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr.* 2006;136(1 Suppl):207S-11S.
14. **Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M.** Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(10):854-65.
15. **Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE.** IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 2004;119(2):285-98.
16. **Caperuto EC, Tomatieli RV, Colquhoun A, Seelaender MC, Costa Rosa LF.** Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation affects Walker 256 tumor-bearing rats in a time-dependent manner. *Clin Nutr.* 2007;26(1):117-22.
17. **Carre JE, Singer M.** Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777(7-8):763-71.
18. **Casanovas A, Carrascal M, Abián J, López-Tejero MD, Llobera M.** Lipoprotein lipase is nitrated *in vivo* after lipopolysaccharide challenge. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(11):1553-60.
19. **Clark RH, Feleke G, Din M, Yasmin T, Singh G, Khan FA, Rathmacher JA.** Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24(3):133-9.
20. **Cohen SA, Michaud DP.** Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1993;211(2):279-87
21. **Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS.** Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr* 2005;135:376-82.

22. **Dehoux MJ, van Beneden RP, Fernández-Celemín L, Lause PL, Thissen JP.** Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection. *FEBS Lett.* 2003;544(1-3):214-7.
23. **Delano MJ, Moldawer LL.** The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. *Nutr Clin Pract.* 2006;21(1):68-81.
24. **Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE.** Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest.* 2004;113(1):115-23.
25. **Dyson A, Singer M.** Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med.* 2009;37(1 Suppl):S30-7.
26. **Eckle I, Seitz R, Egbring R, Kolb G, Havemann K.** Protein C degradation *in vitro* by neutrophil elastase. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1991;372(11):1007-13.
27. **Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukherji P, Tisdale MJ.** Signaling pathways initiated by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293:E923–E931, b.
28. **Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ.** Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(6):E1409-16, b.
29. **Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ.** Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem J.* 2007;407(1):113-20, a.
30. **Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ.** Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(6):E1417-26, a.
31. **Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD.** Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008;27(6):793-9.
32. **Fang CH, James HJ, Ogle C, Fischer JE, Hasselgren PO.** Influence of burn injury on protein metabolism in different types of skeletal muscle and the role of glucocorticoids. *J Am Coll Surg.* 1995;180(1):33-42.

33. **Fang CH, Li BG, James JH, King JK, Evenson AR, Warden GD, Hasselgren PO.** Protein breakdown in muscle from burned rats is blocked by insulin-like growth factor I and glycogen synthase kinase-3beta inhibitors. *Endocrinology*. 2005;146(7):3141-9.
34. **Fang CH, Li BG, Tiao G, Wang JJ, Fischer JE, Hasselgren PO.** The molecular regulation of protein breakdown following burn injury is different in fast- and slow-twitch skeletal muscle. *Int J Mol Med*. 1998;1(1):163-9.
35. **Fischer D, Gang G, Pritts T, Hasselgren PO.** Sepsis-induced muscle proteolysis is prevented by a proteasome inhibitor *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270 (1):215-21.
36. **Flakoll P, Sharp R, Baier S, Levenhagen D, Carr C, Nissen S.** Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. *Nutrition*. 2004;20(5):445-51.
37. **Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  decreases insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in C2C12 myoblasts via a Jun N-terminal kinase pathway. *Endocrinology* 2003;144:1770–1779.
38. **Garlick PJ, Millward DJ, James WP.** The diurnal response of muscle and liver protein synthesis *in vivo* in meal-fed rats. *Biochem J*. 1973;136(4):935-45.
39. **Goll DE, Netti G, Mares SW, Thompson VF.** Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci*. 2008;86(14 Suppl):E19-35.
40. **Gomes-Marcondes MC, Tisdale MJ.** Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett*. 2002;180(1):69-74.
41. **Hancock WW, Grey ST, Hau L, Akalin E, Orthner C, Sayegh MH, Salem HH.** Binding of activated protein C to a specific receptor on human mononuclear phagocytes inhibits intracellular calcium signaling and monocyte-dependent proliferative responses. *Transplantation*. 1995;60(12):1525-32.
42. **Harper AE, Miller RH, Block KP.** Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1984;4:409-54.
43. **Hasselgren PO, Fischer JE.** Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg*. 2001;233(1):9-17.

44. **Hasselgren PO, Fischer JE.** Sepsis: stimulation of energy-dependent protein breakdown resulting in protein loss in skeletal muscle. *World J Surg* 1998;22(2):203-8.
45. **Hasselgren PO, James JH, Warner BW, Hummel RP 3rd, Fischer JE.** Protein synthesis and degradation in skeletal muscle from septic rats. Response to leucine and alpha-ketoisocaproic acid. *Arch Surg.* 1988;123(5):640-4, a.
46. **Hasselgren PO, LaFrance R, Pedersen P, James JH, Fischer JE.** Infusion of a branched-chain amino acid-enriched solution and alpha-ketoisocaproic acid in septic rats: effects on nitrogen balance and skeletal muscle protein turnover. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1988;12(3):244-9, b.
47. **Hasselgren PO, Menconi MJ, Fareed MU, Yang H, Wei W, Evenson A.** Novel aspects on the regulation of muscle wasting in sepsis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):2156-68.
48. **Hasselgren PO, Tricoli JV, Wiczorek D, Steigerwald KA, Angerås U, Hall-ANGERÅS M, Fischer JE.** Reduced levels of mRNA for myofibrillar proteins in skeletal muscle from septic rats. *Life Sci.* 1991;49(10):753-60.
49. **Herningtyas EH, Okimura Y, Handayaningsih AE, Yamamoto D, Maki T, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K.** Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogen-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(10):1115-20.
50. **Hirokawa M, Walser M.** Enteral infusion of sodium 2-ketoisocaproate in endotoxic rats. *Crit Care Med.* 1999;27(2):373-9.
51. **Hobler SC, Williams A, Fischer D, Wang JJ, Sun X, Fischer JE, Monaco JJ, Hasselgren PO.** Activity and expression of the 20S proteasome are increased in skeletal muscle during sepsis. *Am J Physiol.* 1999;277(2 Pt 2):R434-40.
52. **Hoffman JR, Cooper J, Wendell M, Im J, Kang J.** Effects of beta-hydroxy beta-methylbutyrate on power performance and indices of muscle damage and stress during high-intensity training. *J Strength Cond Res.* 2004;18(4):747-52.
53. **Holecek M, Sprongl L, Skopec F, Andrys C, Pecka M.** Leucine metabolism in TNF-alpha- and endotoxin-treated rats: contribution of hepatic tissue. *Am J Physiol* 1997;273:E1052-8.
54. **Holecek M, Sprongl L, Tichy M, Pecka M.** Leucine metabolism in rat liver after a bolus injection of endotoxin. *Metabolism.* 1998; 47:681-5.

55. **Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE.** Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol.* 2000;1(6):496-501.
56. **Chai J, Wu Y, Sheng ZZ.** Role of ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle wasting in rats with endotoxemia. *Crit Care Med.* 2003;31(6):1802-7.
57. **Jowko E, Ostaszewski P, Jank M, Sacharuk J, Zieniewicz A, Wilczak J, Nissen S.** Creatine and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. *Nutrition.* 2001;17(7-8):558-66.
58. **Kadlcikova J, Holecek M, Safranek R, Tilser I, Kessler BM.** Effects of proteasome inhibitors MG132, ZL3VS and AdaAhx3L3VS on protein metabolism in septic rats. *Int J Exp Pathol.* 2004;85(6):365-71.
59. **Khal J, Hine AV, Fearon KC, Dejong CH, Tisdale MJ.** Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:2196-206.
60. **Kimball SR, Jefferson LS.** New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):500S-507S.
61. **Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A.** HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med.* 2008;14(7-8):476-84.
62. **Knitter AE, Panton L, Rathmacher JA, Petersen A, Sharp R.** Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle damage after a prolonged run. *J Appl Physiol.* 2000;89(4):1340-4.
63. **Koohmaraie M, Kretchmar DH.** Comparisons of four methods for quantification of lysosomal cysteine proteinase activities. *J Anim Sci.* 1990;68(8):2362-70.
64. **Kornasio R, Riederer I, Butler-Browne G, Mouly V, Uni Z, Halevy O.** Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(5):755-63.
65. **Kraemer WJ, Hatfield DL, Volek JS, Fragala MS, Vingren JL, Anderson JM, Spiering BA, Thomas GA, Ho JY, Quann EE, Izquierdo M, Häkkinen K, Maresh CM.** Effects of amino acids supplement on physiological adaptations to resistance training. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(5):1111-21.

66. **Krarup A, Chattopadhyay P, Bhattacharjee AK, Burge JR, Ruble GR.** Evaluation of surrogate markers of impending death in the galactosamine-sensitized murine model of bacterial endotoxemia. *Lab Anim Sci.* 1999;49(5):545-50.
67. **Kreider RB, Ferreira M, Wilson M, Almada AL.** Effects of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation during resistance-training on markers of catabolism, body composition and strength. *Int J Sports Med.* 1999;20(8):503-9.
68. **Kuhls DA, Rathmacher JA, Musngi MD, Frisch DA, Nielson J, Barber A, MacIntyre AD, Coates JE, Fildes JJ.** Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation in critically ill trauma patients. *J Trauma.* 2007;62(1):125-31; discussion 131-2.
69. **Lang CH, Frost RA, Vary TC.** Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(2):E453-9.
70. **Lang CH, Frost RA.** Differential effect of sepsis on ability of leucine and IGF-I to stimulate muscle translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(4):E721-30.
71. **Lang CH, Frost RA.** Endotoxin disrupts the leucine-signaling pathway involving phosphorylation of mTOR, 4E-BP1, and S6K1 in skeletal muscle. *J Cell Physiol.* 2005;203(1):144-55.
72. **Larbaud D, Balage M, Taillandier D, Combaret L, Grizard J, Attaix D.** Differential regulation of the lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-dependent and ubiquitin/proteasome-dependent proteolytic pathways in fast-twitch and slow-twitch rat muscle following hyperinsulinaemia. *Clin Sci (Lond).* 2001;101(6):551-8.
73. **Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL.** Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004;18(1):39-51.
74. **Levi M, van der Poll T.** Recombinant human activated protein C: current insights into its mechanism of action. *Crit Care.* 2007;11 Suppl 5:S3.
75. **Lowell BB, Ruderman NB, Goodman MN.** Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism.* 1986;35(12):1121-7.

76. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
77. **Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, Maier S, Gründling M, Grisk O, Wendt M, Heidecke CD, Lehmann C.** Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock.* 2007;28(1):59-64.
78. **Macallan DC, Cook EB, Preedy VR, Griffin GE.** The effect of endotoxin on skeletal muscle protein gene expression in the rat. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28(5):511-20.
79. **Maizels EZ, Ruderman NB, Goodman MN, Lau D.** Effect of acetoacetate on glucose metabolism in the soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat. *Biochem J.* 1977;162(3):557-68.
80. **Marcora S, Lemmey A, Maddison P.** Dietary treatment of rheumatoid cachexia with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, glutamine and arginine: a randomised controlled trial. *Clin Nutr.* 2005;24(3):442-54.
81. **Matsuda N, Hattori Y.** Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci.* 2006;101(3):189-98.
82. **May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN.** Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am J Surg.* 2002;183(4):471-9.
83. **Mitchell JC, Evenson AR, Tawa NE.** Leucine inhibits proteolysis by the mTOR kinase signaling pathway in skeletal muscle. *J Surg Res.* 2004; 121(2):311.
84. **Morley JE, Thomas DR, Wilson MM.** Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(4):735-43.
85. **Muthny T, Kovarik M, Sispera L, Tilser I, Holecek M.** Protein metabolism in slow- and fast-twitch skeletal muscle during turpentine-induced inflammation. *Int J Exp Pathol.* 2008;89(1):64-71.
86. **Nakashima K, Ishida A, Yamazaki M, Abe H.** Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336(2):660-6.

87. **Nakashima K, Yakabe Y, Ishida A, Yamazaki M, Abe H.** Suppression of myofibrillar proteolysis in chick skeletal muscles by alpha-ketoisocaproate. *Amino Acids*. 2007;33(3):499-503.
88. **Nawroth PP, Stern DM.** Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1986;163(3):740-5.
89. **Nemzek JA, Hugunin KM, Opp MR.** Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med*. 2008;58(2):120-8.
90. **Nissen S, Sharp R, Ray M, Rathmacher JA, Rice D, Fuller JC Jr, Connelly AS, Abumrad N.** Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol*. 1996;81(5):2095-104.
91. **Nissen SL, Abumrad NN.** Nutritional role of the leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -methylbutyrate (HMB). *J Nutr Biochem*. 1997;8(6):300-311.
92. **Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X.** Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med*. 2002;30(9):2022-9.
93. **Nunan D, Howatson G, van Someren KA.** Exercise-induced muscle damage is not attenuated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate and alpha-ketoisocaproic acid supplementation. *J Strength Cond Res*. 2010;24(2):531-7.
94. **Ostaszewski P, Kostiuk S, Balasinska B, Jank M, Papet I, Glomot F.** The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens *in vitro*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 2000;84:1-8.
95. **Otero-Anton E, González-Quintela A, Lopez-Soto A, López-Ben S, Llovo J, Perez LF.** Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res*. 2001;33(2):77-9.
96. **Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, van der Spoel HJ, Zandstra DF.** Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med*. 2001;27(1):84-90.
97. **Penner CG, Gang G, Wray C, Fischer JE, Hasselgren PO.** The transcription factors NF-kappaB and AP-1 are differentially regulated in skeletal muscle during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1331-6.



98. **Penner G, Gang G, Sun X, Wray C, Hasselgren PO.** C/EBP DNA-binding activity is upregulated by a glucocorticoid-dependent mechanism in septic muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282(2):R439-44.
99. **Pette D, Peuker H, Staron RS.** The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol Scand.* 1999;166(4):261-77.
100. **Polla B, D'Antona G, Bottinelli R, Reggiani C.** Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity. *Thorax.* 2004;59(9):808-17.
101. **Poylin V, Fareed MU, O'Neal P, Alamdari N, Reilly N, Menconi M, Hasselgren PO.** The NF-kappaB inhibitor curcumin blocks sepsis-induced muscle proteolysis. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:317851.
102. **Pruznak AM, Kazi AA, Frost RA, Vary TC, Lang CH.** Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose nucleoside prevents leucine-stimulated protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 2008;138(10):1887-94.
103. **Rajan VR, Mitch WE.** Muscle wasting in chronic kidney disease: the role of the ubiquitin proteasome system and its clinical impact. *Pediatr Nephrol* 2008;23:527-35.
104. **Remick DG, Ward PA.** Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock.* 2005;24 Suppl 1:7-11.
105. **Rennie MJ, Smith K, Watt PW.** Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):E298-307.
106. **Reverter M, Lundh T, Lindberg JE.** Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;696(1):1-8.
107. **Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W.** Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science.* 2002;296(5574):1880-2.
108. **Rivero JL, Talmadge RJ, Edgerton VR.** Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 1998;19(7):733-42.
109. **Roelfsema V, Thomas GB, Lin H, Breier BH, Maxwell L, Oliver MH, Heineman E, Clark RG, Gluckman PD.** The metabolic effects of endotoxin are

- differentially affected by the pattern of GH administration in the rat. *J Endocrinol.* 2001;171(1):173-81.
110. **Rowlands DS, Thomson JS.** Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation during resistance training on strength, body composition, and muscle damage in trained and untrained young men: a meta-analysis. *J Strength Cond Res.* 2009;23(3):836-46.
111. **Russell ST, Eley H, Tisdale MJ.** Role of reactive oxygen species in protein degradation in murine myotubes induced by proteolysis-inducing factor and angiotensin II. *Cell Signalling,* 2007;19(8):1797-806.
112. **Russell ST, Tisdale MJ.** Mechanism of attenuation by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate of muscle protein degradation induced by lipopolysaccharide. *Mol Cell Biochem.* 2009;330(1-2):171-9.
113. **Sabourin PJ, Bieber LL.** The mechanism of alpha-ketoisocaproate oxygenase. Formation of beta-hydroxyisovalerate from alpha-ketoisocaproate. *J Biol Chem.* 1982;257(13):7468-71.
114. **Safranek R, Holecek M, Kadlcikova J, Sprongl L, Mislanova C, Kukan M, Chladek J.** Effect of acute acidosis on protein and amino acid metabolism in rats. *Clin Nutr.* 2003;22(5):437-43.
115. **Safranek R, Holecek M, Sispera L, Muthny T.** Aspects of protein and amino acid metabolism in a model of severe glutamine deficiency in sepsis. *Ann Nutr Metab.* 2006;50(4):361-7, b.
116. **Safranek R, Ishibashi N, Oka Y, Ozasa H, Shirouzu K, Holecek M.** Modulation of inflammatory response in sepsis by proteasome inhibition. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(5):369-72, a.
117. **Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA.** Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther.* 2001;81(11):1810-6.
118. **Shimizu S, Gabazza EC, Taguchi O, Yasui H, Taguchi Y, Hayashi T, Ido M, Shimizu T, Nakagaki T, Kobayashi H, Fukudome K, Tsuneyoshi N, D'Alessandro-Gabazza CN, Izumizaki M, Iwase M, Homma I, Adachi Y, Suzuki K.** Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1416-26.
119. **Shimomura Y, Obayashi M, Murakami T, Harris RA.** Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of

- activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001;4(5):419-23.
120. **Singleton KD, Wischmeyer PE.** Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res*. 2003;35(6):486-91.
121. **Smith HJ, Mukerji P, Tisdale MJ.** Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res*. 2005;65:277-283.
122. **Smith RJ, Wilmore WW.** Glutamine nutrition and requirements. *JPEN*. 1990;14 (Supplement):94-99.
123. **Smith HJ, Wyke SM, Tisdale MJ.** Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate. *Cancer Res*. 2004;64(23):8731-8735.
124. **Soukup T, Jirmanová I.** Regulation of myosin expression in developing and regenerating extrafusal and intrafusal muscle fibers with special emphasis on the role of thyroid hormones. *Physiol Res*. 2000;49(6):617-33.
125. **Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM.** A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1998;68(1):72-81.
126. **Sweatt AJ, Wood M, Suryawan A, Wallin R, Willingham MC, Hutson SM.** Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286(1):E64-76.
127. **Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC.** Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med*. 2004;32(7):1460-9.
128. **Tardy C, Autefage H, Garcia V, Levade T, Andrieu-Abadie N.** Mannose 6-phosphorylated proteins are required for tumor necrosis factor-induced apoptosis: defective response in I-cell disease fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004;279(51):52914-23.
129. **Taylor FB Jr, Dahlback B, Chang AC, Lockhart MS, Hatanaka K, Peer G, Esmon CT.** Role of free protein S and C4b binding protein in regulating the coagulant response to Escherichia coli. *Blood*. 1995;86(7):2642-52.

130. **Taylor FB Jr, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang AC, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT.** The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood*. 2000;95(5):1680-6.
131. **Tiao G, Fagan J, Roegner V, Lieberman M, Wang JJ, Fischer JE, Hasselgren PO.** Energy-ubiquitin-dependent muscle proteolysis during sepsis in rats is regulated by glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1996;97(2):339-48.
132. **Tiao G, Hobler S, Wang JJ, Meyer TA, Luchette FA, Fischer JE, Hasselgren PO.** Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 1997;99(2):163-8, a.
133. **Tiao G, Lieberman M, Fischer JE, Hasselgren PO.** Intracellular regulation of protein degradation during sepsis is different in fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol*. 1997;272(3 Pt 2):R849-56, b.
134. **Tisdale MJ.** Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:340-8.
135. **Tischler ME, Desautels M, Goldberg AL.** Does leucine, leucyl-tRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle? *J Biol Chem*. 1982;257(4):1613-21.
136. **Van Koeving M, Nissen S.** Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate *in vivo*. *Am J Physiol*. 1992;262(1 Pt 1):E27-31.
137. **Vary TC, Kimball SR.** Sepsis-induced changes in protein synthesis: differential effects on fast- and slow-twitch muscles. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 1):C1513-9.
138. **Vary TC.** IGF-I stimulates protein synthesis in skeletal muscle through multiple signaling pathways during sepsis *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2006;290:313-321.
139. **Vazquez JA, Morse EL, Adibi SA.** Effect of dietary fat, carbohydrate, and protein on branched-chain amino acid catabolism during caloric restriction. *J Clin Invest*. 1985;76(2):737-43.
140. **Walser M.** Misinterpretation of nitrogen balances when glutamine stores fall or are replenished. *Am J Clin Nutr*. 1991;53(6):1337-8.

141. **Wang H, Zhu S, Zhou R, Li W, Sama AE.** Therapeutic potential of HMGB1-targeting agents in sepsis. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e32.
142. **Wassner SJ, Schlitzer JL, Li JB.** A rapid, sensitive method for the determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1980;104(2):284-9.
143. **Welle S.** Methods for studying protein metabolism in humans. In: Welle, S. (Ed.), *Human Protein Metabolism.* Springer-Verlag, New York, 1999:29-71
144. **Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A.** Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol.* 2005;78(2):325-37.
145. **White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP, Smith OP.** Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol.* 2000;110(1):130-4.
146. **Wing SS, Haas AL, Goldberg AL.** Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem J.* 1995;307:639-45.
147. **Wolfe RR, Goodenough RD, Wolfe MH, Royle GT, Nadel ER.** Isotopic analysis of leucine and urea metabolism in exercising humans. *J Appl Physiol.* 1982;52(2):458-66.
148. **Wusteman M, Wight DG, Elia M.** Protein metabolism after injury with turpentine: a rat model for clinical trauma. *Am J Physiol.* 1990;259(6 Pt 1):E763-9.
149. **Yagasaki K, Morisaki-Tsuji N, Miura A, Funabiki R.** Possible involvement of phospholipase C and protein kinase C in stimulatory actions of L-leucine and its keto acid, alpha-ketoisocaproic acid, on protein synthesis in RLC-16 hepatocytes. *Cytotechnology.* 2002;40(1-3):151-4.
150. **Yonekura T, Matsusue S, Walser M.** Ketoisocaproate infusion improves survival from experimental sepsis by an antioxidant mechanism. *Circ Shock.* 1993;41(4):213-20.
151. **Yoshida S, Lanza-Jacoby S, Stein TP.** Leucine and glutamine metabolism in septic rats. *Biochem J.* 1991;276:405-9

152. **Yoshizawa F, Sekizawa H, Hirayama S, Yamazaki Y, Nagasawa T, Sugahara K.** Tissue-specific regulation of 4E-BP1 and S6K1 phosphorylation by alpha-ketoisocaproate. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2004;50(1):56-60.
153. **Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer K.** Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun*. 1998;66(5):2300-9.

## 8. Souhrn

Proteokatabolismus a ztráta svalové hmoty jsou základními znaky charakterizujícími komplexní metabolický syndrom, zvaný kachexie. Ta je závažnou komplikací celé řady onemocnění, na jejichž patogenezi se často podílí systémová zánětová odpověď a endotoxemie.

Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (leucin, isoleucin a valin) nejsou pouze významným substrátem pro tvorbu bílkovin, ale podílejí se také na regulaci metabolismu bílkovin, biosyntézy a sekrece inzulínu a slouží jako zdroj aminoskupiny při tvorbě alaninu a glutaminu ve svalu. Proteoanabolickou aktivitu vykazují kromě leucinu také některé jeho metabolity, kyselina  $\alpha$ -ketoisokapronová (KIC) a  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrát (HMB), a tudíž některé ze známých účinků leucinu mohou být navozeny těmito metabolity. V poslední době je pozornost zaměřena na HMB, užívaný jako potravní doplněk pro sportovce, ale zkoumaný také pro své potenciální využití v terapii kachexie.

Cílem našich experimentů bylo: 1) studium vlivu endotoxinu na metabolismus bílkovin a aminokyselin u různých typů kosterního svalu a dávkové závislosti těchto změn; 2) posouzení vlivu vybraných metabolitů leucinu (KIC a HMB) na metabolismus bílkovin a aminokyselin – u různých typů kosterních svalů; za podmínek *in vitro* a *in vivo*; u zdravých potkanů a v proteokatabolických podmínkách.

Pokusy byly provedeny na potkanech kmene Wistar. S cílem posoudit rozdíly v účincích na svaly lišící se ve složení svalových vláken jsme použili m. soleus (SOL), sval tvořený převážně z vláken typu I (pomalých, červených vláken), a m. extensor digitorum longus (EDL), sval složený převážně z vláken typu II (rychlých, bílých vláken). Jako hlavní parametry metabolismu bílkovin sloužily celková a myofibrilární proteolýza, proteosyntéza, oxidace leucinu, proteolytická aktivita proteazomu či katepsinů B a L a exprese  $\alpha$ -podjednotek proteazomu.

Aplikace endotoxinu navodila proteokatabolismus v kosterním svalu zvýšením proteolýzy, a to zejména stimulací proteolytické aktivity proteazomu. Vůči účinku endotoxinu byl více senzitivní EDL než SOL. Proteolytická aktivita proteazomu byla stimulována nejen ve svalu, ale i v dalších tkáních. Jako nejvhodnější k vyvolání proteokatabolismu ve svalu byla stanovena dávka 5 mg endotoxinu/kg tělesné hmotnosti.

Nebyl prokázán vliv KIC na námi sledované parametry metabolismu proteinů u zdravých ani septických zvířat. Podání HMB zdravým potkanům vedlo k poklesu celotělového obratu proteinů (pokles proteosyntézy i proteolýzy) a proteolytické aktivity proteazomu v kosterním svalu; podání septickým zvířatům mírnilo nárůst proteolýzy v kosterním svalu a proteolytickou aktivitu proteazomu. Výraznější pokles hodnot většiny parametrů degradace proteinů byl pozorován v EDL, naproti tomu myofibrilární proteolýza klesla výrazněji v SOL. Tyto výsledky ukazují na příznivý vliv HMB na metabolismus bílkovin kosterního svalu u potkana v proteokatabolickém stavu indukovaném aplikací endotoxinu.



## 9. Summary

Protein catabolism and muscle wasting are basic features characterizing the complex metabolic syndrome, called cachexia, which is a severe complication of many diseases, in whose pathogenesis are often participant the systemic inflammatory response and endotoxemia.

Branched-chain amino acids (leucine, isoleucine and valine) are not only an important substrate for protein synthesis, but they are also involved in the regulation of protein metabolism, insulin synthesis and secretion, and serve as the source of amino group in the alanine and glutamine formation in the muscle. Not only leucine but also some of its metabolites,  $\alpha$ - ketoisocaproic acid (KIC) and  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB), have protein anabolic activity and thus some of leucine effects could be induced by these metabolites. In the last years there is paid attention to the HMB, which is used as a supplement for athletes and tested for its potential use in cachexia treatment.

The aim of our experiments was to study: 1) endotoxin-induced effect on metabolism of proteins and amino acids in different types of skeletal muscle and the dose dependence of these changes; 2) effects of selected leucine metabolites (KIC and HMB) on the metabolism of proteins and amino acids – in different types of skeletal muscle; under *in vivo* and *in vitro* conditions; in healthy rats and in the endotoxin model of sepsis.

The Wistar rats were used in our experiments. We used two types of skeletal muscles with the aim of assessment of differences in effects on muscles varying in muscle fibre composition – m. soleus (SOL) composed mostly of type I (slow-twitch, red) fibres and m. extensor digitorum longus (EDL) composed mostly of type II (fast-twitch, white) fibres. As the main parameters of protein metabolism we used the total and myofibrillar proteolysis, protein synthesis, leucine oxidation, proteolytic activity of proteasome and cathepsins B and L and proteasome  $\alpha$ -subunits expression.

The endotoxin application induced the protein catabolism in skeletal muscle due to the increase in proteolysis and it was especially caused by proteasome proteolytic activity stimulation. EDL was more sensitive against the endotoxin effect than SOL. The proteasome proteolytic activity was stimulated not only in the skeletal muscle, but also in other tissues. The dose 5 mg of endotoxin/kg of body weight was the most suitable for protein catabolism development in skeletal muscle.

We have not demonstrated the effect of KIC on the measured parameters of protein metabolism in healthy and septic animals. HMB treatment of healthy rats lead to the decrease in the whole-body protein turnover and the proteasome proteolytic activity in skeletal muscle; treatment of septic rats attenuated the increase in skeletal muscle protein degradation and proteasome proteolytic activity. More intensive decline of values of the most parameters of protein degradation was observed in EDL; on the other hand the myofibrillar proteolysis decreased more dramatically in SOL. These results demonstrate the positive effect of HMB on rat skeletal muscle protein metabolism in protein catabolic state induced by endotoxin treatment.