

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Doktorské studium biomedicíny
Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Tomáš Kotulák

**Faktory ovlivňující metabolismus glukózy a zánětlivou
reakci u kriticky nemocných pacientů**

Factors affecting glucose metabolism and inflammatory response in critically ill patients

Doktorská disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha 2014

PODĚKOVÁNÍ

Tato disertační práce vznikla pod vedením mého školitele Prof. MUDr. Martina Haluzíka, DrSc. Jeho zkušenosti a pracovitost mi byly příkladem; je mou milou povinností poděkovat mu za odborné vedení, podporu, cenné připomínky a někdy i oprávněné výtky, bez jeho pomoci bych tuto práci realizoval jen velmi obtížně. Dále bych chtěl poděkovat kolektivu Laboratoře pro endokrinologii a metabolismus III. interní kliniky – kliniky endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze, zejména Mgr. Janě Drápalové a MUDr. Miloši Mrázovi, Ph. D.

Můj dík patří také Prof. MUDr. Janu Pirkovi, DrSc., za vytvoření podmínek na pracovišti a všem kolegům z Institutu klinické a experimentální medicíny, kteří mi pomáhali.

V neposlední řadě bych rád poděkoval mé rodině zejména manželce a dětem za tolerantní zázemí pro tvůrčí práci.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.1.2014

MUDr. Tomáš KOTULÁK

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

KOTULÁK, Tomáš. Faktory ovlivňující metabolismus glukózy a zánětlivou reakci u kriticky nemocných pacientů [Factors affecting glucose metabolism and inflammatory response in critically ill patients]. Praha, 2014.127 s., 0 příl. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1.lékařská fakulta. Školitel Haluzík, Martin.

OBSAH:

SOUHRN	5
SUMMARY	7
1 HYPERGLYKÉMIE U PACIENTŮ V KRITICKÉM STAVU	9
1.1 Úvod.....	9
1.2 Patofyziologie	9
2 VLIV HYPERGLYKÉMIE NA ORGANIZMUS.....	10
2.1 Myokard	10
2.2 Imunitní systém a zánět.....	10
2.3 Ledviny	11
2.4 Centrální nervový systém.....	11
3 STRESOVÁ HYPERGLYKÉMIE	12
3.1 Diagnóza	12
3.2 Stresová hyperglykémie a její kontrola u kriticky nemocných.....	13
3.3 Současná doporučení pro kontrolu glykémie v intenzivní péči	16
3.4 Hyperglykémie kriticky nemocných - shrnutí	17
3.5 Nadváha a obezita	19
3.6 Adipokiny a zánětlivá odpověď a inzulinová rezistence	19
3.6.1 Leptin	20
3.6.2 Adiponektin.....	20
3.6.3 Rezistin	21
3.6.4 Chemerin.....	22
3.6.5 Visfatin.....	22
3.7 Fibroblastový růstový faktor 21	23
3.8 Adipocytární fatty acid binding protein.....	24
4 TUKOVÁ TKÁŇ U KRITICKY NEMOCNÝCH	25
5 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	29
6 METODIKA STUDIÍ.....	31
6.1 Metodika studií	31
6.1.1 Kontrola glykémie a terapie inzulinem.....	32
6.1.2 Stanovení mRNA exprese.....	32
6.1.3 Hormonální a biochemická stanovení.....	33
6.1.4 Separace monocytů	34
6.1.5 Izolace proteinů a Western blot	34
6.1.6 Statistické zpracování	35
7 VLASTNÍ VÝSLEDKY	36
7.1 Vliv kardiochirurgického výkonu na cirkulující hladiny FGF-21 a na mRNA expresi FGF-21 v epikardiální tukové tkáni, podkožní tukové tkáni a kosterním svalu.....	36
7.1.1 Výsledky	37
7.2 Posouzení vlivu kardiochirurgické operace s použitím mimotělního oběhu na sérové koncentrace A-FABP a jeho mRNA expresi v epikardiální a podkožní tukové tkáni, kosterním svalu a periferních monocytech	43
7.2.1 Výsledky	44
8 DISKUZE	51
8.1 Fibroblastový růstový factor 21 a kardiochirurgický výkon – vliv na sérové koncentrace FGF-21 a mRNA expresi v epikardiální a podkožní tukové tkáni a kosterním svalu.....	51

8.2 Vliv kardiochirurgického výkonu na sérové koncentrace A-FABP a mRNA expresi v epikardiální a podkožní tukové tkáni, kosterním svalu a periferních monocytech.....	54
9 ZÁVĚR.....	57
SEZNAM ZKRATEK	58
LITERATURA.....	60
SEZNAM PUBLIKACÍ.....	103

SOUHRN

Hyperglykémie kritických stavů byla považována za adaptivní metabolickou reakci organismu na stresovou situaci, která souvisí s kritickým stavem jak u pacientů s diagnózou diabetu, tak u pacientů bez této diagnózy. Hyperglykémie je vyvolána především periferní inzulínovou rezistencí navozenou faktory působícími kontraregulačně vůči inzulínu na úrovni postreceptorové inzulínové signální kaskády. Samotná hyperglykémie pak může potencovat zvýšení hladin pro-zánětlivých cytokinů, jako je tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) a další.

Kromě místa uložení energie je bílá tuková tkáň také velmi aktivním endokrinním orgánem, reguluje řadu metabolických procesů a také významně ovlivňuje regulaci zánětu. V kritických stavech mění tuková tkáň svou morfolonii, adipocyty se zmenšují a dochází k hojně infiltraci makrofágy. Paradoxně mají kriticky nemocní pacienti s nadváhou a obezitou nižší mortalitu než pacienti s podváhou, normální váhou a morbidní obezitou.

V našich studiích jsme zvolili jako vhodný model stresového stavu pacienty podstupující elektivní kardiochirurgický výkon s použitím mimotělního oběhu a s peroperačně dobře přístupnými zkoumanými tkáněmi k odběru vzorků.

Sledovali jsme expresi mRNA u_ dvou nedávno objevených faktorů s významnou úlohou v regulaci metabolických dějů a zánětu - fibroblastového růstového faktoru-21 (FGF-21) a adipocytárního fatty acid binding proteinu (A-FABP) v epikardiální a podkožní tukové tkáni, v kosterním svalu a myokardu. Dále jsme sledovali dynamiku jejich sérových hladin v perioperačním období s cílem odhalit u kriticky nemocných pacientů jejich možnou úlohu při vzniku hyperglykémie a inzulínové rezistence.

Naše data ukazují výrazný vzestup sérových hladin FGF-21 v průběhu kardiochirurgického výkonu spolu se signifikantním zvýšením mRNA exprese v

epikardiální tukové tkáni. Zároveň jsme také zaznamenali poměrně výraznou expresi FGF-21 mRNA v kosterním svalu, který tak může být jeho významným zdrojem.

V naší druhé studii jsme prokázali pooperačně zvýšenou mRNA expresi A-FABP v periferních monocytech, avšak nikoliv v epikardiální či podkožní tukové tkáni nebo v myokardu a svalové tkáni. Kardiochirurgický výkon vedl k signifikantnímu zvýšení sérových hladin A-FABP.

Obě studie poukazují na možný vliv zkoumaných adipokinů na vznik perioperační stresové odpovědi organismu a rozvoj zánětlivé reakce a inzulínové rezistence.

Klíčová slova: adipocytární fatty acid binding protein; fibroblastový růstový factor-21; tuková tkáň; kosterní sval; kardiochirurgie; inzulínová rezistence

SUMMARY

Hyperglycemia in critically ill patients was considered for many years an adaptive response to stress conditions being present in both patients with and without previous history of diabetes.

Hyperglycemia is caused mainly by peripheral insulin resistance induced by the factors acting counteracting insulin signalling at the postreceptor level. Furthermore, hyperglycemia itself can then increase serum levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (Il-6) and interleukin-8 (Il-8) and others. On the contrary, peripheral insulin resistance induced by pro-inflammatory cytokines may further potentiate hyperglycemia.

White adipose tissue represents in addition to its energy storage function also a very active endocrine active organ. In addition to regulation of a number of metabolic processes it also significantly modulates the inflammatory response. In critically ill patients, adipose tissue changes its morphology, i.e. the adipocytes are shrinking and adipose tissue is abundantly infiltrated by macrophages. Paradoxically, overweight and obese critically ill patients have lower mortality than underweight, lean and morbidly obese subjects.

In our studies, we selected population of the patients undergoing elective major cardiac surgery with extracorporeal circulation as a suitable model of stress conditions, and examined tissues which were easily accessible for the sampling.

We measured mRNA expression of two recently discovered factors with an important role in the regulation of metabolic pathways and inflammation - fibroblast growth factor -21 (FGF-21) and adipose fatty acid binding protein (A-FABP) in epicardial and subcutaneous adipose tissue, skeletal and cardiac muscle and their serum levels in perioperative period to identify their possible role in the development of hyperglycemia and insulin resistance in critically ill patients.

We demonstrated marked increase in FGF-21 serum levels during cardiac surgery with significant increase of its mRNA expression in epicardial adipose tissue. At the same time, we have also seen a relatively strong FGF-21 mRNA expression in skeletal muscle suggesting its possible role as an additional source of FGF-21.

Data from our second study demonstrated that cardiac surgery increased A-FABP mRNA expression in peripheral monocytes but not in epicardial and subcutaneous adipose tissue, cardiac or skeletal muscle. Cardiac surgery significantly increased in A-FABP serum levels.

Both studies suggested possible influence of investigated adipokines on the development of stress response, inflammatory response and insulin resistance after cardiac surgery.

Key words: adipocyte fatty acid binding protein; fibroblast growth factor-21; adipose tissue; skeletal muscle; cardiac surgery; insulin resistance

1 HYPERGLYKÉMIE U PACIENTŮ V KRITICKÉM STAVU

1.1 Úvod

Hyperglykémie u pacientů v kritickém stavu byla považována za adaptivní metabolickou odpověď organismu, který se ocitl ve stresové situaci. Již v druhé polovině devatenáctého století popisuje hyperglykémii u hemoragického šoku významný francouzský fyziolog Claude Bernard. Někdy bývá také nazývána “stresovým diabetem” (McCowen et al. 2001). Jedná se o kombinaci zvýšené endogenní produkce glukózy a inzulínové rezistence. V poslední dekádě problematika prodělala výrazný vývoj od dřívější představy o protektivním vlivu hyperglykémie v kritickém stavu, přes nutnost velmi těsné kontroly glykémie (spojenou s nebezpečím epizod těžké hypoglykémie), po pohled na terapii hyperglykémie ve světle posledních velkých klinických studií (Van Den Berghe et al. 2001, Van Den Berghe et al. 2006, Finfer et al. 2009).

1.2 Patofyziologie

Stresová hyperglykémie je důsledkem zvýšených hladin kortizolu, cytokinů, růstového hormonu, katecholaminů a glukagonu vedoucích k stimulaci endogenní produkce glukózy prostřednictvím glykogenolýzy a glukoneogenezy (McCowen et al. 2001, Gustavson et al. 2003, Watt et al. 2001). Dále zde hraje roli změna její renální exkrece a tubulární resorpce. Zároveň dochází k inzulínové rezistenci, která je vyjádřena nedostatečnou supresí jaterní produkce glukózy a nedostatečným vstupem glukózy do buněk a její následnou sníženou utilizací v tukové a svalové tkáni; dochází rovněž k inhibici syntézy glykogenu ve svalech. Zvýšení lipolýzy v tukové tkáni vede ke vzestupu

hladiny cirkulujících volných mastných kyselin (FFA), které mohou potencovat inzulínovou rezistenci na úrovni postreceptorové signální kaskády (Dresner et al. 1999). Je snížen insulin-dependentní vstup glukózy do buněk a klesá translokace glukózového transportéru-4 na buněčnou membránu (GLUT-4) (Lang et al. 1990). Zároveň je zvýšen non-inzulín dependentní transport glukózy do buněk prostřednictvím glukózového transportéru - 1 (GLUT-1). Hyperglykémie dále potencuje zvýšení hladin cirkulujících pro-zánětlivých cytokinů, a to zejména tumor necrosis faktoru alfa (TNF- α), interleukinu-1 β (IL-1 β) a interleukinu-8 (IL-8). Hladiny těchto cytokinů rostou se stoupající glykemií a klesají po podání inzulínu (Hirsch et al. 2004). Naopak zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů vyvolané stresovou reakcí přispívá k navození inzulínové rezistence (Esposito et al. 2002).

2 VLV HYPERGLYKÉMIE NA ORGANIZMUS

2.1 Myokard

Na modelu lidských srdečních buněk a simulované ischemie a reperfuze v podmínkách normoglykémie (5 mmol/l, 48 hodin) a hyperglykémie (25 mmol/l, 48 hodin) došlo k většímu ischemicko-reperfučnímu poškození a produkci endotelinu-1 v hyperglykemickém prostředí (Verma et al. 2002). Hyperglykémie zhoršuje kolaterální průtok koronárním řečištěm a blokuje protektivní vliv isofluranu: ochranu před nekrózou myokardu (Kehl et al. 2002). Vysoká hladina glukózy v krvi může vést také k destabilizaci aterosomového plátu a rozvoji akutní koronární insuficience.

2.2 Imunitní systém a zánět

Hyperglykémie zvyšuje hladiny cirkulujících prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6, IL-8 (Esposito et al. 2002, Krogh-Madsen et al. 2004). Dochází k imunosupresi a poruše

funkce neutrofilů a monocytů, která je spojena s poruchou chemotaxe, adherence, fagocytózy (Rassias et al. 2002). Hyperglykémie má vliv na zhoršení funkce leukocytů, která je naopak zlepšena inzulinem, a to nezávisle na glykémii (Ellger et al. 2006). Hyperglykémie ovlivňuje schopnost vasodilatace při poruše tvorby oxidu dusnatého (NO) a zhoršuje tak mikrocirkulaci. Dále vede ke zvýšené produkci kyslíkových radikálů v endotelu a prohloubení oxidačního stresu s následným poškozením buněk a tkání (Marfella et al. 2001). U traumatických, chirurgických a interních pacientů je hyperglykémie spojena se zvýšeným počtem infekčních komplikací (Van Den Berghe et al. 2001, Butler et al. 2005, Van Den Berghe et al. 2006).

2.3 Ledviny

Těsná kontrola glykémie má protektivní vliv na funkci ledvin u kriticky nemocných (Schetz et al. 2008) (16). Dle klasifikace RIFLE (která vyjadřuje míru postižení renálních funkcí Risk, Injury, Failure, Loss, End Stage Renal Disease) je s hyperglykémií spojen signifikantně vyšší výskyt jednotlivých stupňů renální dysfunkce včetně nutnosti použít eliminační techniky.

2.4 Centrální nervový systém

Hyperglykémie přítomná při akutní ischemické mozkové příhodě vede k horšímu výsledku terapie. Pacienti s hyperglykémií bez předchozí známé diagnózy diabetes mellitus (DM) mají horší prognózu než pacienti s hyperglykémií a DM před inzuletem (Stead et al. 2009). Traumatické poškození mozku může být příčinou hyperglykémie, která je nezávislým prediktorem zvýšené morbidity a mortality (Rovlias et al. 2000). Vedle zhoršení mikrocirkulace a sekundárního poškození mozku je dalším možným mechanismem rozvoj laktátové acidózy při anaerobní glykolýze (Wass et al. 1996).

3 STRESOVÁ HYPERGLYKÉMIE

3.1 Diagnóza

Pojem stresové hyperglykémie není v současné době jasně definován. Je proto vhodné rozdělit pacienty s hyperglykemií v souvislosti s kritickým stavem na ty, kteří již DM měli, a ty, kteří mají nově vzniklou hyperglykémii. V souvislosti s kritickým stavem mohou dle American Diabetes Association (ADA) existovat tři skupiny pacientů: a) se známou diagnózou DM a hyperglykemií, b) s nově diagnostikovaným DM a hyperglykemií, c) se stresovou hyperglykemií (hospitalizační) bez diagnózy DM (Dungan *et al.* 2009). Toto rozdělení vyžaduje sledování po hospitalizaci (k ověření, zda hyperglykémie přetrvává) pro odlišení posledních dvou skupin. Proto jsou navrženy dvě diagnostická kritéria stresové hyperglykémie: a) stresová hyperglykémie: dle ADA glykémie nalačno $> 6,9$ mmol/l a/nebo náhodná glykémie $> 11,1$ mmol bez předchozí diagnózy DM, b) stresová glykémie s pre-existujícím DM s dobře kontrolovanou glykemií před přijetím: hodnota glykovaného hemoglobinu (HbA1C) $< 7\%$ dle DCCT ($< 5,4\%$ dle naší kalibrace IFCC) a hyperglykémie konzistentně vyšší než práh u první skupiny (Dungan *et al.* 2009). V tomto navrhovaném rozdělení se zcela ztrácí skupina pacientů, kteří mají špatně kompenzovaný diabetes s vysokou hodnotou HbA1C a v intenzivní péči mají stresovou hyperglykémii. Nabízí se tedy rozdělení, kdy by byla při přijetí u pacienta standardně nabrána hodnota HbA1c, a pokud by byla vyšší bez předchozí diagnózy DM, mohl by být takový pacient zařazen do skupiny stresové hyperglykémie s nově diagnostikovaným diabetem. Znalost faktu, zda má kriticky nemocný stresovou hyperglykémii bez předchozí přítomnosti DM nebo s ním, je důležitá pro potřeby hodnocení klinických studií, protože se v řadě případů tyto skupiny pacientů liší. Zdá se rovněž, že pacienti s předchozí anamnézou DM nemají takový prospěch z těsné kontroly

glykémie jako pacienti bez předchozí anamnézy diabetu (Van Den Berghe et al. 2001, Krinsley 2006).

3.2 Stresová hyperglykémie a její kontrola u kriticky nemocných

V roce 2001 byla publikována první Leuvenská studie (Van Den Berghe et al. 2001), která srovnávala intenzivní léčbu hyperglykémie (IIT) (4,4 - 6,1 mmol/l) s konvenční kontrolou glykémie (10 - 12,1 mmol/l) u chirurgických pacientů (2/3 ze zařazených byli kardiochirurgičtí pacienti). Tato studie prokázala snížení mortality v IIT skupině na 4,6% oproti 8,0% ve skupině konvenční terapie, podobný poměr byl i u mortality v průběhu celé hospitalizace - 7,2% versus 10,9% u konvenčně léčené skupiny. Dále studie prokázala snížení mortality z 20,2% na 10,6% u pacientů s IIT a pobytem na JIP >5 dní, pokles morbiditu u skupiny léčené IIT: pobyt na JIP se zkrátil a také se snížil počet systémových infekcí, akutního selhání ledvin, anémie, polyneuropatie kritických stavů a další. Následně byla provedena další studie se stejnou metodikou u nechirurgických pacientů na JIP (Van Den Berghe et al. 2006), která neprokázala rozdíl v mortalitě mezi oběma skupinami pacientů. U pacientů, kteří byli na JIP déle než tři dny, studie prokázala příznivý efekt na mortalitu a morbiditu ve skupině s těsnou kontrolou glykémie. IIT byla již po první Leuvenské studii široce přijata a praktikována u kriticky nemocných.

Inzulín má celou řadou pozitivních metabolických a trofických efektů: protizánětlivý, antiapoptotický, antitrombotický, antioxidační (Van Den Berghe et al. 2003). Je otázkou, zda za příznivým efektem IIT ve výše popsané studii stojí normoglykémie nebo protektivní vliv inzulínu. Podle retrospektivní analýzy ve větší míře odpovídá za snížení morbiditu a mortality normoglykémie (Van Den Berghe et al. 2003). Vedle řady studií na téma IIT (prováděných většinou v jednom centru) a meta-analýz studií byly provedeny tři multicentrické randomizované studie, které zmírnily optimismus,

spojený s IIT po první Leuvenské studii, a zároveň upozornily na hlavní riziko IIT – tedy zvýšený výskyt těžké hypoglykémie.

Studie VISEP (Efficacy of Volume Substitution and Insulin Therapy in Sepsis) byla multicentrická studie (17 center v Německu), která porovnávala objemovou resuscitaci (hydroxyethyl škrob vs. ringer laktát) a kontrolu glykémie (IIT vs. konvenční) ve čtyřech studijních ramenech (Brunkhorst et al. 2008). Studie byla předčasně ukončena z bezpečnostních důvodů, a to pro častý výskyt těžkých hypoglykemií $<2,2$ mmol/l ve skupině IIT (17% vs. 4,1%, $p=0,0001$). Zároveň se neprokázal rozdíl mezi 28- a 90denní mortalitou mezi IIT skupinou (24,7% a 39,7%) a skupinou konvenční terapie (26% a 35,4%). Průměrná ranní glykémie se signifikantně lišila v IIT oproti konvenční skupině (6,2 vs. 8,4 mmol/l, $p=0,0001$), což ukazuje, že v průměru nebylo dosaženo plánované hodnoty normoglykémie v IIT skupině. Studie měla komplikovaný design a její výsledek mohl být zkreslen interakcemi jednotlivých intervencí i nedostatečným zvládnutím protokolu IIT v jednotlivých centrech. Další studie GLUCONTROL proběhla v sedmi zemích na 21 JIP s cílovým počtem 3500 pacientů (Preiser et al. 2009), srovnávala IIT s konvenční terapií. I tato studie byla předčasně ukončena (počet pacientů 1078) pro vysoké riziko těžké hypoglykémie a nesplnění stanoveného cíle (snížení JIP mortality o 4%). Opět byla průměrná glykémie mimo cílovou hodnotu a neprokázala se nižší mortalita ve skupině IIT. Skupiny pacientů byly značně heterogenní; zároveň byly vysloveny pochybnosti o dostatečném zvládnutí protokolu po jeho pouze dvoutýdenní implementaci.

V roce 2009 byly publikovány výsledky australsko-novozélandsko-kanadské studie NICE-SUGAR (Finfer et al. 2009), kde byla u souboru 6022 pacientů 90denní mortalita vyšší ve skupině IIT (glykémie 4,5 - 6 mmol/l) než u skupiny konvenční (glykémie < 10 mmol/l) (27,6% vs. 24,9%, $p=0,02$). Těžká hypoglykémie $< 2,2$ mmol/l se vyskytla u 6,8% v IIT skupině vs. 0,5% v konvenční ($p < 0,001$). Efekt léčby se nelišil mezi chirurgickými a

nechirurgickými pacienty zařazenými do studie. Kromě 90denní mortality a frekvence těžké hypoglykémie nebyl rozdíl mezi oběma skupinami.

Potencionálně škodlivé epizody hypoglykémie mohou u pacientů v intenzivní péči často zůstat nerozpoznány, nejsou přítomny varovné ani jiné klinické příznaky a u pacientů v analgosedaci nemusí být hypoglykémie vůbec zaznamenána. Mezi predisponující faktory pro rozvoj hypoglykémie u kriticky nemocných dle Vriesendorpa *et al.* patří: snížení nutriční podpory bez adekvátního snížení dávky inzulínu, DM, infuze inotropik nebo vasopresorů, infuze inzulínu, sepse, kontinuální veno-venózní hemofiltrace s bikarbonátovým roztokem (Vriesendorp *et al.* 2006). Vliv hypoglykémie na mortalitu popisuje práce ze stejného pracoviště na retrospektivní analýze dat získaných celkem u 5961 pacientů JIP a nachází incidenci úmrtí u pacientů vystavených hypoglykémii 40/1000 JIP dnů oproti 17/1000 JIP dnů u pacientů, kteří hypoglykémii nebyli vystaveni (Hermanides *et al.* 2010). Déletrvajícím těžkým hypoglykémii může vést k nevratnému poškození mozku, které může být částečně způsobeno rychlou infuzí glukózy ve snaze o rychlou nápravu hypoglykémie, kdy dochází k poškození, respektive smrti neuronů při rychlé reperfúzi glukózou. Tento mechanismus zahrnuje mimo jiné aktivaci nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH) oxidázy a uvolnění zinku (Suh *et al.* 2007). Také celková variabilita glykémie se ukazuje jako nezávislý prediktor mortality u pacientů na JIP, jak popisuje multicentrická retrospektivní studie u 7049 kriticky nemocných pacientů (Egi *et al.* 2006). Retrospektivní analýza 5728 pacientů JIP prokazuje asociaci vysoké variability glykémie s rizikem úmrtí jak na JIP, tak během hospitalizace. Prognóza je ještě horší, pokud je vysoká variabilita spojená s vysokými průměrnými hodnotami glykémie. Nízká variabilita glykémie se naopak jeví jako protektivní faktor (Hermanides *et al.* 2010).

Pro monitoraci glykémie a její korekci pomocí intravenózního inzulínu je vhodné používat protokol. Existuje možnost použití “ad hoc protokolu”, jehož základem je

rozhodnutí lékaře nebo sestry u lůžka na základě zkušeností nebo intuice. Jeho efektivita je nízká. Použití protokolu ve formátu tabulky nebo nomogramu efektivitu zlepšuje. Nejmodernější metodou je použití elektronického protokolu s vyhodnocením více faktorů. Ve studii srovnávající tři různé protokoly IIT (dva tabulkové a jeden elektronický) prokázal elektronický protokol nejlepší kontrolu glykémie bez zvýšení rizika epizod těžké hypoglykémie a zároveň vyžadoval nejmenší počet měření glykémie (Bláha et al. 2009).

3.3 Současná doporučení pro kontrolu glykémie v intenzivní péči

Studie NICE-SUGAR (Finfer et al. 2009) ukazuje nový standard kontroly glykémie v intenzivní péči. Na základě této studie mění řada odborných společností svá doporučení.

V září 2010 vydává mezinárodní doporučení pro kontrolu glykémie u nediatetických dospělých pacientů v intenzivní péči Société de Réanimation de Langue Française (SRLF) spolu se Société Française d'Anesthésie-Réanimation (SFAR) (Ichai et al. 2010). Jedná se o doporučení expertního panelu, která byla publikována v roce 2008 a následně přepracována v květnu 2009 po zveřejnění studie NICE-SUGAR. Autoři důrazně doporučují vyloučení hyperglykémie > 10 mmol/l u dospělých pacientů na JIP a těsnou kontrolu glykémie v emergentních situacích. Důrazně doporučují vyloučení velkého kolísání glykémie.

Ke kontrole glykémie nedoporučují jiné léky než intravenózní inzulín. Navrhují hodnotu glykémie $< 2,2$ mmol/l jako limit těžké hypoglykémie na JIP a doporučují její korekci i bez klinických symptomů, které se na JIP nemusí projevit. Implementace těsné kontroly glykémie vede k expozici pacientů riziku častější a déletrvající těžké hypoglykémie. U strategie těsné kontroly glykémie navrhuje přesně monitorovat glykémii k časně detekci těžké hypoglykémie. Autoři doporučují pro monitoring glykémie používat

venózní nebo arteriální krev. V kapilární krvi může být hodnota glykémie nadhodnocena (to může vést k nerozpoznání epizody těžké hypoglykémie).

Je vhodná restrikce přívodu glukózy k redukci hyperglykémie. Autoři doporučují ukončit podávání intravenózního inzulínu, pokud pacient začne přijímat potravu perorálně, a pokračovat v monitoringu glykémie po dobu alespoň tří preprandiálních měření.

Měření glykémie by mělo být prováděno v centrální laboratoři nebo pomocí přístroje pro analýzu krevních plynů jako zlatý standard. Algoritmus a protokol kontroly glykémie: doporučují implementaci standardního protokolu na pracovišti, který obsahuje návod pro použití intravenózní infuze rychle účinkujícího inzulínu pomocí perfuzoru a doporučení pro monitoring a korekci hypoglykémie. Měl by být použit takový protokol, který neupravuje dávku inzulínu pouze na základě poslední hodnoty glykémie. Pro určení dávky inzulínu je důrazně doporučeno brát v úvahu dodávku cukrů, nejlépe na podkladě elektronického protokolu. Pro training personálu a implementaci protokolu je třeba vyhradit dostatek času.

3.4 Hyperglykémie kriticky nemocných - shrnutí

V současné době žádná studie jasně nedefinuje míru korekce glykémie ani úplně přesně nespecifikuje populaci pacientů profitujících z těsnější IIT. Existuje řada dat podporujících fakt, že bychom se u kriticky nemocných pacientů měli vyvarovat hypoglykémie, hyperglykémie a zvýšené variability glykémie. Také není jasně stanovena klasifikace pacientů s hyperglykemií v intenzivní péči na základě rozdělení dle přítomnosti DM v anamnéze. Mortalita i morbidita se často liší a zdá se horší pro skupinu pacientů se stresovou hyperglykemií bez DM (Dungan et al. 2009, Egi et al. 2008). Také se zde nabízí otázka dalšího osudu kriticky nemocných, kteří měli stresovou hyperglykemií a byli propuštěni z JIP. Nemají být nadále dispenzarizováni diabetologem? Zvláště pak ti, kteří

měli vyšší hladiny HbA1c při příjmu na JIP a stresovou hyperglykémii. Dalším prostorem pro výzkum stresové hyperglykémie je studium tukové tkáně jako endokrinně aktivní tkáně a jejího vlivu na zánět a metabolismus glukózy u kriticky nemocných. Tento výzkumný směr pak nabízí i potenciální ovlivnění stresové hyperglykémie modulací endokrinní dysfunkce tukové tkáně u kriticky nemocných pacientů.

Je třeba zdůraznit nutnost implementace protokolu pro kontrolu glykémie, která splňuje nároky a logistické možnosti specifické pro každé pracoviště.

Výsledky studie NICE-SUGAR nás vedou ke kontrole glykémie s cílem dosažení hladin < 10 mmol/l. Přestože vývoj poslední dekády poněkud změnil pohled na první Leuvenkou studii (Van Den Berghe et al. 2001), je nutné zdůraznit její přínos k celkovému pochopení důležitosti kontroly glykémie u kriticky nemocných a rozvoji bezpečných postupů kontroly glykémie v intenzivní péči. Inzulínová terapie a kontrola stresové hyperglykémie u kriticky nemocných se stala standardem intenzivní péče.

Tuková tkáň jako endokrinně aktivní orgán

Bílá tuková tkáň, a zejména viscerální (nebo také intraabdominální tuková tkáň), vedle úschovy zásob energie plní funkci endokrinně aktivního orgánu s interakcemi s ostatními orgány, jako je mozek, srdce, svalová tkáň, cévy. Zároveň viscerální a v menší míře i subkutánní tuková tkáň ovlivňuje systémový zánět (Galic et al. 2010). Je prokázáno, že u obézních jedinců jsou přítomny známky tzv. subklinického systémového zánětu (Ichai et al. 2010, Yudkin et al. 1999). Hladiny prozánětlivých cytokinů a proteinů akutní fáze (IL-6, TNF α , SAA, CRP, haptoglobin) jsou u obézních pacientů zvýšené (Engstrom et al. 2004), což se může podílet na vzniku inzulínové rezistence, hyperlipidémie, a rozvoji metabolického syndromu (Ichai et al. 2010, Bulló et al. 2003, Hotamisligil et al. 2003). Tuková tkáň je také zdrojem řady působků tzv. adipokinů a také klasických cytokinů, které

ovlivňují energetický výdej, chuť k jídlu, metabolismus lipidů, imunitu a zánět, angiogenezi a inzulinovou rezistenci (Hotamisligil *et al.* 1993).

3.5 Nadváha a obezita

Prevalence nadváhy a obezity má v rozvinutých zemích celosvětově stoupající trend (Kopelman *et al.* 2000, Seidell *et al.* 2000). Světová zdravotnická organizace (WHO) odhaduje celosvětově počet lidí s nadváhou na více než jednu miliardu a počet obézních s body mass indexem (BMI) nad 30 na 300 milionů (The World Health Report 2002). Obezita je multifaktoriální chronické onemocnění způsobené dlouhodobě převažujícím energetickým příjmem nad energetickým výdejem. Vznik tohoto onemocnění je také významně ovlivněn faktory genetickými a vlivem prostředí (Kosuge *et al.* 2008).

3.6 Adipokiny a zánětlivá odpověď a inzulinová rezistence

V roce 1994 byl objeven první hormon produkovaný převážně adipocyty - leptin (Zhang *et al.* 1994) a nastala nová éra výzkumu tukové tkáně a její endokrinní aktivity. Podle současných znalostí tuková tkáň produkuje přes stovku hormonů, peptidů, cytokinů a dalších látek, které se souhrnně nazývají adipokiny. Vedle adipocytů jsou zdrojem těchto látek také makrofágy, případně další buňky, které jsou v tukové tkáni přítomny. Tuková tkáň může tedy významně přispět k rozvoji zánětlivých procesů, zejména u obézních jedinců. Vedle leptinu mají k regulaci zánětlivé reakce vztah i adiponektin, TNF- α , Il - 1, Il - 6, Il-8, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) a řada dalších. Dále některé působky přímo ovlivňují také inzulinovou rezistenci - FFA, TNF- α a resistin aj. (Wang *et al.* 2010). Tuková tkáň je pravděpodobným zdrojem zvýšených hladin zánětlivých markerů TNF- α , Il - 6 a CRP u obézních nemocných (Kern *et al.* 2001, Faber *et al.* 2010). V ní probíhá intenzivní interakce mezi imunokompetentními buňkami a adipocyty (Mraz *et al.* 2011). Adipocyty mohou na lokálně zvýšenou produkci prozánětlivých faktorů makrofágy

v tukové tkáni reagovat zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů (Berg et al. 2005). Je zjevné, že produkce hormonů v tukové tkáni působí na okolní buňky nejen endokrinně, ale také parakrinně. Takto může tuková tkáň přispívat k rozvoji systémové zánětlivé reakce u kriticky nemocných.

3.6.1 Leptin

Leptin, objevený jako první adipocytární hormon Zhangem et al. v roce 1994 (Zhang et al. 1994), působí v mozku (hypotalamus, limbický systém, kortex) i v periferních tkáních (imunitní systém, pankreas, játra). V experimentálních studiích u myši vedla mutace genu pro leptin (tzv *ob/ob* myši) k obezitě, hyperfagii a inzulínové rezistenci. Podávání leptinu vedlo ke snížení příjmu potravy, zvýšenému energetickému výdeji a snížení hmotnosti a celkově prakticky k normalizaci fenotypu (Pellemounter et al. 1995). Hladiny leptinu jsou zvýšeny u obézních pacientů z důvodu jeho zvýšené produkce zmnoženou tukovou tkání (Luo et al. 2005). Hladiny leptinu a mRNA exprese pro leptin v tukové tkáni korelují pozitivně s BMI a obsahem tuku u lidí (Haluzík et al. 1999, Maffei et al. 1995). Zajímavé výsledky měla terapie leptinem u pacientů s lipatrofickým diabetem, těm po podání leptinu klesly sérové hladiny triglyceridů, HbA1C a mohla být snížena antidiabetická léčba a také se zmenšila velikost jater v důsledku poklesu stupně steatozy (Oral et al. 2002). Zvýšená hladina cirkulujícího leptinu u lidí je nezávislým rizikovým faktorem kardiovaskulární příhody (Wallace et al. 2001).

3.6.2 Adiponektin

Adiponektin byl objeven v letech 1995-1996 čtyřmi různými skupinami vědců (Scherer et al. 1995, Hu et al. 1996, Maeda et al. 1996), je produkován adipocyty a cirkuluje v séru v různých formách (monomery až oligomery) s různou funkcí (Bobbert et al. 2005). Jeho plazmatické hladiny inverzně korelují s množstvím viscerálního tuku a v

menší míře i subkutánního tuku (Matsuzawa et al. 2004). Adiponektin je exprimován převážně v tukové tkáni a jeho exprese jsou obvykle sníženy u experimentálních modelů obezity a DM 2. typu, např. u *db/db* myši a řady dalších (Hu et al. 1996). Snížené plazmatické hladiny adiponektinu jsou pozorovány u stavů spojených s inzulínovou rezistencí, jako je metabolický syndrom, kardiovaskulární onemocnění a hypertenze (Kumada et al. 2003, Hotta et al. 2000, Trujillo et al. 2005, Ouchi et al. 2003). Inzulínsenzitizující efekt adiponektinu byl nejprve popsán u myši s dietou-indukovanou obezitou a poté ověřen i na modelu lipoatrofické diabetické myši, který zcela postrádá bílou tukovou tkáň a vyznačuje se extrémní inzulínorezistencí, hyperlipidemií a přítomností těžkého diabetu 2. typu s výraznou hyperglykemií a hyperinzulinémií (Yamauchi et al. 2001). I u tohoto modelu vedlo podávání adiponektinu k potlačení inzulínové rezistence a zlepšení kompenzace diabetu. Ještě výraznější účinek mělo podávání kombinace leptinu a adiponektinu (Yamauchi et al. 2001, Yamauchi et al. 2001). U myši s knockoutem genu pro adiponektin byly popsány příznaky metabolického syndromu, jako hypertenze, inzulínová rezistence a hyperlipidémie (Ouchi et al. 2003, Maeda et al. 2002). U lidí potvrzují genetické studie vztah hypoadiponektinémie k inzulínové rezistenci, respektive diabetes mellitus 2. typu (Vasseur et al. 2002, Menzaghi et al. 2002). Polymorfismus genů pro adiponektin a rezistin může přispívat k metabolickému fenotypu pacientů s obezitou (Křížová et al. 2008). Mutace genu pro adiponektin vedoucí k výskytu trimerů a hexamerů adiponektinu bez tvorby multimerické formy je rovněž asociována s diabetem 2. typu. K přesné interpretaci by proto ve výzkumných studiích neměla být hodnocena pouze celková hladina adiponektinu, ale také distribuce multimerů (Waki et al. 2003).

3.6.3 Rezistin

Studie zaměřené na rezistin ukazují různý efekt a význam u myši a u lidí. U obézních myši je rezistin uvolňován adipocyty a jeho zvýšené hladiny jsou spojeny s

inzulínovou rezistencí (Steppan et al. 2001). U lidí je rezistin produkován částečně adipocyty, ale kvantitativně podstatnějšími producenty jsou makrofágy a monocyty (Kunnari et al. 2009). Ve studiích byl popsán prozánětlivý efekt rezistinu, který způsobil zhoršení inzulínové senzitivity; stimulací proliferace hladkého svalu koronárních i periferních cév (Calabro et al. 2004) může ovlivňovat rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. Některé studie poukazují na vyšší hladiny cirkulujícího rezistinu u obézních jedinců a na pozitivní korelaci hladin rezistinu a BMI (Asano et al. 2010, Li et al. 2009). Zároveň je popsán pokles sérové hladiny rezistinu po snížení hmotnosti (Valsamakis et al. 2004).

3.6.4 Chemerin

Chemerin je protein, který je nově považován za další adipokin produkovaný bílou tukovou tkání. Hladiny cirkulujícího chemerinu jsou zvýšeny u obézních jedinců a pozitivně korelují s příznaky metabolického syndromu (Ernst et al. 2010). Chemerin negativně ovlivňuje metabolismus glukózy v játrech a svalech. Sérové hladiny chemerinu pozitivně korelují s hladinami IL-6, CRP a TNF- α (Weigert et al. 2010) a chronické zvýšení jeho hladin může potencovat rozvoj subklinické zánětlivé reakce.

3.6.5 Visfatin

Visfatin je protein produkovaný podkožní, a ve větší míře viscerální tukovou tkání. Je označován také jako nikotinamid fosforibosyltransferáza (NAMPT). Byla publikována data, podle kterých se visfatin může přímo vázat na inzulínový receptor a stimulovat jej (Fukuhara et al. 2005), později však bylo stejnou skupinou toto tvrzení odvoláno (Fukuhara et al. 2007). Visfatin stimuluje systémově biosyntézu nicotinamid adenine dinucleotidu (NAD) a v β -buňkách pankreatu reguluje sekreci inzulínu, může tak hrát důležitou roli v metabolismu glukózy (Revollo et al. 2007). Hladiny cirkulujícího visfatinu

mohou působit na metabolismus lipidů a rozvoj zánětlivé odpovědi (Stofkova et al. 2010). Přes často kontroverzní výsledky publikovaných studií lze předpokládat prozánětlivý vliv visfatinu a jeho pozitivní působení na sekreci inzulinu.

3.7 Fibroblastový růstový faktor 21

Fibroblastový růstový faktor 21 (FGF-21) je metabolický regulátor produkovaný primárně játry, ale také buňkami thymu, kosterního svalu a bílé tukové tkáně. Patří do rodiny 22 fibroblastových růstových faktorů (FGF), které obvykle ovlivňují mitózu, angiogenezu, hojení ran a buněčný růst. FGF-21 je peptid o hmotnosti 20 kDa, který byl primárně izolován z myších embryí (Nishimura et al. 2000). Lidský FGF-21 obsahuje 207 aminokyselin a je z 75% homologní s myším FGF-21. Jeho aktivita je závislá na membránovém proteinu β Klotho (Ogawa et al. 2007). Experimentální i klinické studie poukazují na vliv FGF-21 na regulaci metabolismu lipidů a glukózy a energetickou homeostázu (Kharitonov et al. 2007, Kharitonov et al. 2008). Ve studii na myších adipocytech a kulturách lidských adipocytů Kharitonov prokázal stimulaci vychytávání glukózy po podání FGF-21 (Kharitonov et al. 2008). Ve stejné studii bylo také prokázáno snížení hladin lipidů a glykémie u obézních myší po podkožní injekci FGF – 21. Také dlouhodobé podávání FGF-21 diabetickým opicím snížilo plazmatické hladiny glukózy, triglyceridů a inzulinu (Kharitonov et al. 2007). U myší je jaterní exprese FGF-21 regulována nutričním stavem organismu. Je zvýšena během hladovění s produkcí ketoláték a snížena při příjmu potravy (Badman et al. 2007, Inyaki et al. 2005, Lundasen et al. 2007). Zvýšené hladiny FGF-21 byly nalezeny u pacientů s DM 2 typu a/nebo obezitou v porovnání se zdravou populací. Tyto hladiny se ještě zvýšily při krátkodobé nízkokalorické dietě (Mráz et al. 2009, Zhang et al. 2008). U osob se sníženým příjmem potravy, jako jsou chronicky podvyživené pacientky s mentální anorexií, byly v jedné studii prokázány signifikantně snížené hladiny FGF-21 (Dostálová et al. 2008). V jiné

studii u pacientek s mentální anorexií autoři nenalezli při srovnání se zdravou populací signifikantní rozdíl v hladinách FGF-21 (Fazeli et al. 2009).

Na rozdíl od experimentálních modelů nevedlo krátkodobé hladovění u lidí ke zvýšení hladin FGF-21. Ke vzestupu došlo teprve po sedmidenním hladovění (Andersen et al. 2011, Galman et al. 2011).

Hladiny FGF-21 u lidí jsou vysoce interindividuálně variabilní. U 76 zdravých subjektů s normální hmotností byly v již zmíněné studii naměřeny plazmatické hladiny FGF-21 v rozmezí 21 – 5300 pg/ml s mediánem 156 pg/ml (Galman et al. 2011). Sérové hladiny FGF-21 byly signifikantně zvýšeny (>15krát) u subjektů s chronickou hemodialýzou (Stein et al. 2009). Proto by renální funkce měla být brána v potaz v rámci klinických studií zkoumajících plazmatické hladiny FGF-21.

FGF-21 je metabolický regulátor, který má vztah k lipidovému metabolismu, metabolismu glukózy, inzulínové rezistenci a metabolickému syndromu. V některých pracích je rekombinantní FGF-21 zmiňován jako možný budoucí lék diabetes mellitus 2. typu a dalších onemocnění, které jsou s ním sdruženy. Klinické studie zaměřené na vliv podávání FGF-21 u pacientů s diabetes mellitus 2. typu však zatím nebyly publikovány.

3.8 Adipocytární fatty acid binding protein

Adipocytární fatty acid binding protein (A-FABP) je znám také jako FABP-4, aP2 nebo adipocyte/macrophage FABP. Jedná se o cytoplazmatický protein, který se hojně vyskytuje v tukové tkáni (Hunt et al. 1986). Jeho exprese je popsána především v adipocytech (Baxa et al. 1989) a také makrofázích (Furuhashi et al. 2008). A-FABP byl primárně identifikován jako protein tvořící 6 % cytosolických proteinů v adipocytech s částečným uvolňováním do cirkulace. Experimentální a klinické studie ukazují, že A-FABP hraje roli v regulaci metabolismu lipidů a glukózy, energetického metabolismu a

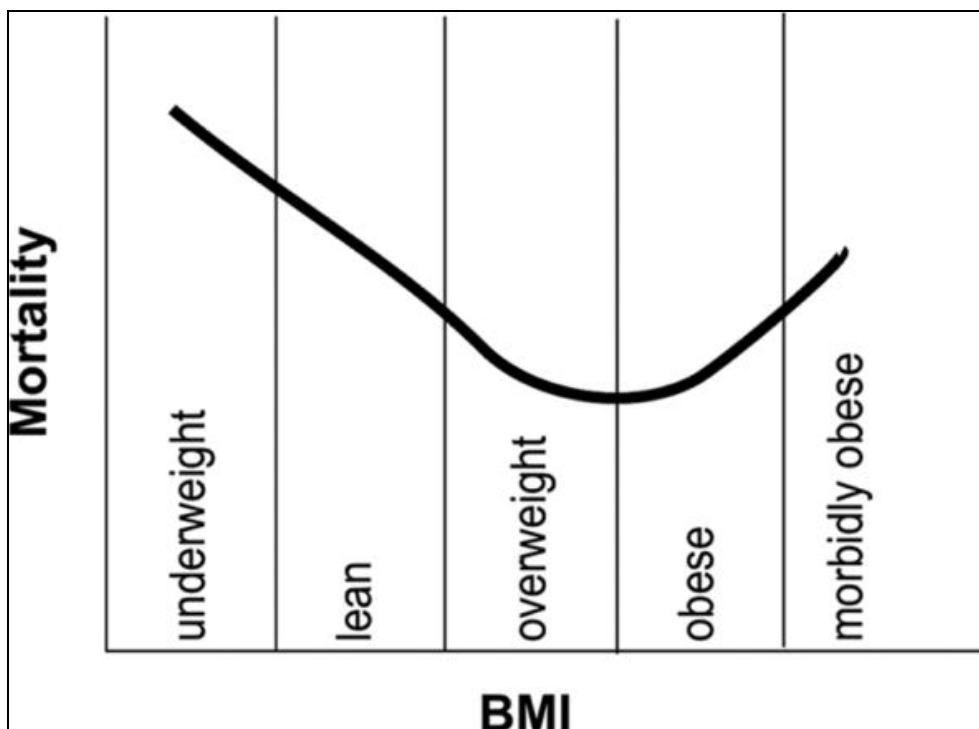
zánětu (Furuhashi et al. 2008, Hotamisligil et al. 1996, Uysal et al. 2000, Xu et al. 2006). U myši vedl knockout genu pro A-FABP v adipocytech ke snížení exprese zánětlivých cytokinů v makrofázích. Knockout genu pro A-FABP v makrofázích vedl ke zlepšení inzulinové senzitivity a absorpce glukózy adipocyty (Furuhashi et al. 2008). A-FABP deficientní myši s geneticky nebo dietou navozenou obezitou byly chráněny proti inzulinové rezistenci, hyperlipoproteinémii a hyperglykémii (Hotamisligil et al. 1996, Uysal et al. 2000). U lidí vedlo snížení aktivity A-FABP lokusu se sníženou A-FABP mRNA expresí k poklesu hladiny triglyceridů a významnému snížení rizika vzniku koronární aterosklerózy a DM 2 typu (Tuncman et al. 2006). Zároveň jsou sérové hladiny A-FABP úzce spojeny s výskytem a závažností koronární aterosklerózy (Bao et al. 2011, Doi et al. 2011). U malnutričních pacientek s mentální anorexií byly hladiny A-FABP nezměněny - na rozdíl od obézních jedinců, kde jsou významně zvýšeny (Haluzíková et al. 2009).

Sérové hladiny A-FABP byly významně vyšší u žen v porovnání s muži a byly nezávisle asociovány s glomerulární filtrací a poměrem obvodu pas/boky (Tonjes et al. 2011). Ve studii u 495 čínských subjektů bez diagnózy DM predikovaly zvýšené hladiny A-FABP rozvoj metabolického syndromu během 5letého sledování (Xu et al. 2007). V experimentální studii se syntetickým biologicky aktivním inhibitorem A-FABP prokázali autoři jeho potenciální terapeutický efekt proti inzulinové rezistenci, diabetu a ateroskleróze (Furuhashi et al. 2007).

4 TUKOVÁ TKÁŇ U KRITICKY NEMOCNÝCH

S narůstajícím počtem obézních a morbidně obézních pacientů v populaci se otevírá otázka, zda může tělesná hmotnost ovlivnit výsledek intenzivní péče. V této problematice bylo publikováno mnoho prací s nejednotným výstupem. Naprostá většina srovnává

kriticky nemocné podle body mass indexu (BMI). Podle meta-analýzy, kterou publikoval v roce 2008 Akinnusi, nemá obezita vliv na mortalitu (Akinusi et al. 2008). Uvádí vliv na prolongovanou umělou plicní ventilaci a délku pobytu na JIP. To je spojeno se zvýšenými náklady na hospitalizaci. Podle závěrů substudie SOAP databáze evropské observační multicentrické studie je obezita spojena se zvýšenou morbiditou, ne však mortalitou u pacientů v kritické péči (Sakr et al. 2008). Naproti tomu Ray et al. prokazuje minimální vliv BMI na výsledek intenzivní péče u kriticky nemocných (Ray et al. 2005). Studie Tremblaye et al. popsala zvýšenou mortalitu u pacientů s nízkým BMI přijatých na JIP (Tremblay et al. 2003). Morbidní obezita je nezávisle spojena se zvýšenou mortalitou na JIP (Nasraway et al. 2006). V současné době není zcela znám vztah mezi tělesnou kompozicí a jejím vlivem na výsledek intenzivní péče, nicméně výsledky mnohých studií poukazují na vyšší mortalitu pacientů s podváhou a morbidní obezitou (obr 1). Tento vztah má jisté limitace, protože podváha může být také výsledkem závažnosti onemocnění a pacienti s nadváhou nebo obezitou jsou obecně považováni za rizikové a mohou být časněji umístěni na JIP. Nadváha a lehčí obezita však může mít v kritickém stavu jistý protektivní efekt (Langouche et al. 2010, Marques et al. 2013).



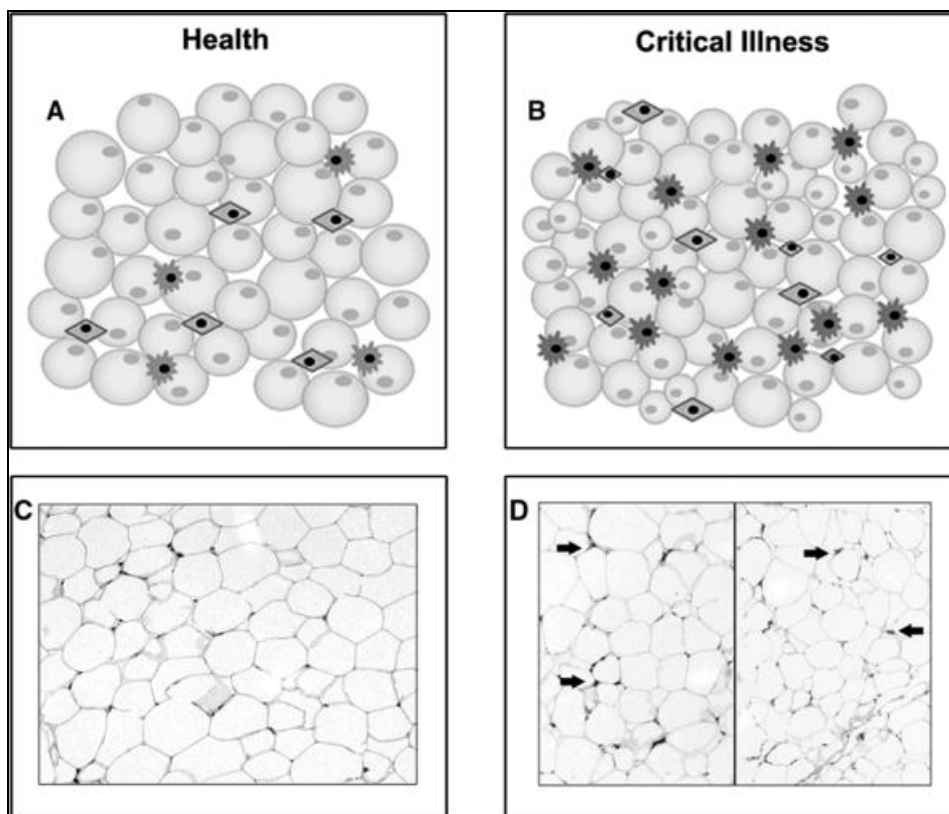
Obr 1 Schéma asociace mortality a BMI kriticky nemocných pacientů BMI = body mass index.

Upraveno se svolením Lippincott Williams and Wilkins/Wolters Kluwer Health: Critical Care Medicine. 41(1):317-325, January 2013. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318265f21c Marques, Mirna; Langouche, Lies Endocrine, Metabolic, and Morphologic Alterations of Adipose Tissue During Critical Illness

Sérové hladiny rezistinu byly zvýšeny u kriticky nemocných pacientů se sepsí nebo se syndromem systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) a rezistin je patrně jednou z komponent systémové zánětlivé odpovědi. Zároveň je prognostickým faktorem přežití u kriticky nemocných bez sepse (Koch et al. 2009). Sérové hladiny A-FABP jsou zvýšené u kriticky nemocných a ještě výrazněji u skupiny septických pacientů. Lze tak uvažovat o využití A-FABP jako o prognostickém faktoru (Huang et al. 2013).

Velice zajímavou studii publikovalo Leuvenké pracoviště, kde odebírali in vivo a post mortem vzorky tukové tkáně u kriticky nemocných pacientů a srovnávali výsledky se zdravými subjekty. Morfologické změny tukové tkáně pozorovali také na modelu kriticky nemocného králíka. Tuková tkáň je v kritickém stavu alterována zvýšeným počtem nově formovaných adipocytů a infiltrací makrofágy (obr. 2). Tyto malé adipocyty

mají výraznou schopnost absorbovat glukózu a triglyceridy a redukují tak jejich možný škodlivý vliv (Langouche et al. 2010, Marques et al. 2013).



Obr. 2 Přehled morfologických změn pozorovaných v tukové tkáni kriticky nemocných (n=115). A a B: Schematický přehled pozorovaných změn: během kritického onemocnění se adipocyty (kulaté buňky) zmenšují a narůstá jejich počet, počet makrofágů (buňky ve tvaru hvězd) se zvětšuje a také počet preadipocytů (buňky tvaru diamantového tvaru) narůstá. C a D: Mikroskopický obraz tukové tkáně od zdravého dobrovolníka a dvou kriticky nemocných. Šipky označují obarvené makrofágy.

Upraveno se svolením Lippincott Williams and Wilkins/Wolters Kluwer Health: Critical Care Medicine. 41(1):317-325, January 2013. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318265f21c Marques, Mirna; Langouche, Lies. Endocrine, Metabolic, and Morphologic Alterations of Adipose Tissue During Critical Illness.

Pokud autoři srovnávali pacienty štíhlé a pacienty s nadváhou, nenašli korelaci mezi testovanými parametry a BMI s výjimkou velikosti adipocytů a tuto korelaci našli i u kontrolní skupiny zdravých subjektů. Z toho, že se tuková tkáň chová stejně u kriticky

nemocných štíhlých i těch s nadváhou, lze usuzovat, že celkově větší množství tukové tkáně může příznivě ovlivnit mortalitu kriticky nemocných s nadváhou.

Retrospektivní analýza 730 pacientů zařazených do studie Vasopressin and Septic Shock Trial (Russell et al. 2008) ukazuje, že při septickém šoku měli pacienti s nadváhou ($25 < \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$, $n = 209$) a obézní ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$, $n = 245$) nižší mortalitu, nižší počet infekčních komplikací, menší spotřebu vazopresorů a nižší plazmatické hladiny IL-6 než pacienti s $\text{BMI} < 25$ ($n = 276$) (Wacharasint et al. 2013).

Další studie porovnávala plazmatické hladiny adiponektinu, rezistinu, leptinu, PAI-1, MCP-1, IL-1 alpha, IL-6, IL-8, IL-10 a TNF-alpha u 33 septických pacientů, 37 morbidně obézních a 60 zdravých dárců krve (Hillenbrand et al. 2010). U septických pacientů pozorovali autoři v porovnání se zdravými dárci krve výrazný pokles adiponektinu a výrazný vzestup rezistinu, MCP-1, PAI-1, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 a TNF-alpha. U morbidně obézních byly v porovnání se zdravými subjekty sníženy hladiny adiponektinu a zvýšeny hladiny MCP-1, PAI-1, IL-1, IL-6, IL-10. Zvýšená hladina leptinu byla pouze u morbidně obézních, zatímco rezistin, TNF-alpha a IL-8 byly zvýšeny pouze u septických pacientů. Změněné hladiny adipokinů a pro-inflamatorních cytokinů mohou přispívat k rozvoji inzulinové rezistence v kritickém stavu.

Výsledky posledních výzkumů a také našich prací, které jsou předmětem disertace, jasně ukazují, že tuková tkáň není pasivní orgán a může významně ovlivnit průběh kritického stavu.

5 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Vzhledem k vlivu některých adipokinů na inzulinovou rezistenci, regulaci metabolismu glukózy a rozvoj zánětlivé odpovědi u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu lze předpokládat, že tyto faktory mohou mít vliv na rozvoj metabolické odpovědi

organismu na kardiochirurgický výkon. V naší studii jsme se proto zaměřili na změny systémových koncentrací a mRNA exprese dvou nově objevených adipokinů FGF-21 a A-FABP v epikardiální a podkožní tukové tkáni, v příčně pruhovaném svalu a v myokardu během kardiochirurgického výkonu, který představuje krátkodobý model vzniku stresové hyperglykémie a inzulinorezistence. Předpokládáme, že u těchto pacientů může dojít k významným změnám endokrinní funkce tukové tkáně, které mohou hrát roli při vzniku hyperglykémie a inzulinové rezistence u kriticky nemocných pacientů. Bližší identifikace těchto změn může v budoucnu umožnit jejich terapeutickou modulaci s pozitivním ovlivněním hyperglykémie a inzulinorezistence u kriticky nemocných pacientů.

Cílem projektu je blíže objasnit etiopatogenezu inzulinové rezistence a hyperglykémie u kriticky nemocných pacientů a konkrétně se zaměřit na následující okruhy otázek:

1. Sledovat změny plazmatických koncentrací biochemických markerů a hormonů se známým vztahem k regulaci inzulinové senzitivity a metabolismu glukózy (volné mastné kyseliny, triglyceridy, inzulin, kortizol, katecholaminy, adipokiny, zánětlivé a další) u kriticky nemocných.
2. Sledovat změny mRNA exprese FGF-21 a A-FABP v podkožní, epikardiální tukové tkáni, příčně pruhované svalovině a myokardu v průběhu kardiochirurgického výkonu.
3. Sledovat genovou expresi a dynamiku plazmatických koncentrací FGF-21 a A-FABP a jejich souvislost s hyperglykemií a systémovým zánětem v perioperačním období u kardiochirurgických pacientů

6 METODIKA STUDIÍ

6.1 Metodika studií

Studie byly provedeny ve spolupráci Kliniky anesteziologie a resuscitace a Kliniky kardiovaskulární chirurgie Kardiocentra IKEM v Praze, III. interní kliniky – kliniky endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze a II. chirurgické kliniky kardiovaskulární chirurgie 1. LF UK a VFN v Praze. Studie byly schváleny společnou Etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny a Thomayerovy nemocnice; každý pacient zařazený do studie byl podrobně informován a podepsal informovaný souhlas. Byla odebrána kompletní anamnéza včetně záznamu chronických medikací.

Do obou studií byli zařazeni pacienti mužského pohlaví podstupující elektivní kardiochirurgický zákrok s použitím mimotělního oběhu. U všech subjektů byla standardně provedena antropometrická měření jeden den před operací včetně měření obvodu pasu. Výška a váha byla změřena standardizovanými měřidly a byl vypočítán BMI. Pro výpočet body surface area (BSA) byla použita DuBois and DuBois rovnice (Verbraecken et *al.* 2006).

Předoperačně byly provedeny krevní odběry pro standardní biochemická vyšetření (glykémie, HbA1C, mineralogram, lipidogram, jaterní funkce, ledvinné funkce a hematologické vyšetření - krevní koagulace a krevní obraz). Veškerá biochemická a hematologická vyšetření byla prováděna v centrálních laboratořích Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze a Laboratoři pro endokrinologii a metabolismus III. interní kliniky – kliniky endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze. Vzorky krve pro analýzu hormonů byly odebrány před úvodem do anestezie, před zahájením mimotělního oběhu na konci operace, 6, 24, 48 a 96 hodin od konce operace. Vzorky byly centrifugovány v centrální laboratoři a sérum bylo v příslušných aliquotách okamžitě

zmrazeno a skladováno při -80 °C až do analýzy. Vzorky pro mRNA analýzu podkožní tukové tkáně (z oblasti hrudníku), viscerální (epikardiální) tukové tkáně, kosterního svalu (mezižeberní svaly) a myokardu (z pravého ouška) byly odebrány z přibližně stejných míst u všech pacientů na začátku a na konci operace. Při odběru se dbalo na to, aby vzorky nebyly traumatizovány nebo poškozeny elektro-kauterizací. Vzorky byly uloženy v 1ml roztoku RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) a skladovány při teplotě -80 °C až do jejich analýzy.

6.1.1 Kontrola glykémie a terapie inzulínem

Pro kontrolu glykémie byly v pravidelných tříhodinových intervalech nabírány vzorky arteriální krve z rutinně zavedeného arteriálního katetru, který slouží k monitoraci krevního tlaku. Glykémie byla stanovena v centrální laboratoři Institutu klinické a experimentální medicíny (Abbott Architect CI 8200, Abbott Diagnostics, Maidenhead, U.K.). V průběhu operace jsme nepodávali pacientům infuzi inzulínu. V pooperačním období na JIP byla infuze inzulínu zahájena, pokud hodnota glykémie překročila 9,9 mmol/l. Cestou centrálního žilního katetru byl podáván ve formě kontinuální infuze lidský rychle působící inzulín (Actrapid HM, Novo Nordisk, Baegsvard, Dánsko) ve standardní koncentraci 50 IU v 50ml 0,9% NaCl. Cílová hodnota glykémie byla stanovena 6.0 – 9.9 mmol/l.

6.1.2 Stanovení mRNA exprese

Vzorky byly homogenizovány pomocí MagNA Lyser Instrument s použitím MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) a QIAzol Lysis Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Celková RNA z homogenizovaných vzorků podkožní a epikardiální tukové tkáně byla extrahována pomocí RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Celková RNA z homogenizovaných

vzorků svalové tkáně byla extrahována na MagNA Pure Instrument s použitím MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo). Koncentrace RNA byly stanoveny při absorbanci 260 nm na přístroji BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Německo). Integrita RNA byla kontrolována pomocí vizualizace 18S a 28S ribozomální RNA na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem. Pro reverzní transkripci bylo použito 0,25 μ g celkové RNA pro syntézu prvního vlákna cDNA s použitím náhodných primerů a bylo postupováno přesně dle návodu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Měření relativní genové exprese bylo provedeno na přístroji ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s použitím TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, NO AmpErase[®] UNG a specifických TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a vody bez nukleáz (Fermentas Life Science, Vilnius, Litva). Nárůst fluorescence byl měřen v reálném čase a byly odečteny hodnoty dosažení prahového cyklu (threshold cycle, Ct). Pro kompenzaci možných nepřesností ve vstupním množství použité RNA a efektivity reverzní transkripce byla hodnota Ct pro cílový gen normalizována na endogenní kontrolu beta-2-microglobulin (B2M) nebo LRP10 a pro výpočet relativní genové exprese byla použita rovnice $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nebo upravená formule $2^{-\Delta Ct}$. Tato měření byla provedena v laboratoři pro endokrinologii a metabolismus III. interní kliniky – kliniky endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze.

6.1.3 Hormonální a biochemická stanovení

Koncentrace FGF-21 ve vzorcích séra byly stanoveny pomocí komerčního ELISA kitu (BioVendor, Modřice, Česká republika). Senzitivita kitu byla 7.0 pg/ml. Sérové koncentrace A-FABP byly stanoveny pomocí komerčního ELISA kitu (BioVendor, Modřice, Česká republika) se senzitivitou 0,1 ng/ml. Intra – a interassay variabilita kitů byla méně než 10 %.

Podrobnosti veškerých dalších hormonálních a biochemických stanovení jsou detailně popsány v metodice jednotlivých příložených prací. Tato měření byla provedena v laboratoři pro endokrinologii a metabolismus III. interní kliniky – kliniky endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze.

6.1.4 Separace monocytů

Leukocyty byly získány ze vzorků krve pomocí hmotnostního gradientu s využitím Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences AB, Švédsko) a následně byly promývány v 0,1 M PBS. Pro izolaci bylo použito vždy 5 ml plné krve. Monocyty byly z celkových leukocytů vyzolovány pomocí technologie využívající magneticky značené mikrokuličky potažené specifickou protilátkou proti CD14 (MACS CD14 MicroBeads a MiniMacs, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Separace monocytů byla provedena v laboratoři pro endokrinologii a metabolismus III. interní kliniky – kliniky endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze.

6.1.5 Izolace proteinů a Western blot

Přibližně 80-120mg tkáně bylo homogenizováno v ledovém homogenizačním pufru. Tukové částice byly z homogenizátu odstraněny pomocí opakované centrifugace a homogenizát byl následně do dalšího zpracování zamrazen na -80 °C.

Celková koncentrace proteinu v každém vzorku byla stanovena pomocí metody dle Bradfordové s využitím Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) a BSA jako standardem.

Pro samotný Western blot bylo použito vždy 70 µg proteinového lysátu, který byl rozdělen pomocí 12.5 % SDS-PAGE gelu a přenesen na polyvinylidene difluoride (PVDF) membránu (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) pomocí polosuché blotovací aparatury. Membrána byla přes noc blokována mlékem, promývána PBS a analyzována

pomocí primární protilátky (proti FGF-21 a alpha-tubulinu). Následně byla membrána znovu promývána PBS a inkubována s odpovídající sekundární protilátkou s navázanou křenovou peroxidázou. Detekce protilátek vázaných na membráně byla provedena pomocí chemiluminiscenčního činidla ECL Western Blotting Substrate (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). Fluorescence byla zaznamenána a vyhodnocena na přístroji G:Box iChemi XT Bio instrument (Syngene, Cambridge, Velká Británie) a následně analyzována a velikost jednotlivých signálů byla kvantifikována s použitím programu GeneTools Software (Syngene, Cambridge, Velká Británie). Molekulární váha FGF-21 je 20,2 kDa a alpha-tubulinu 55 kDa.

Izolace proteinů a Western blot analýza byla provedena v laboratoři pro endokrinologii a metabolismus III. interní kliniky – kliniky endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze.

6.1.6 Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena pomocí programu SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Grafy byly vytvořeny pomocí programu SigmaPlot (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Normalita dat byla ověřena pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián (inter-kvartilové rozpětí) nebo průměr \pm střední chyba průměru (SEM), dle normality dat. Změny hladin hormonů v peroperačním a pooperačním období byly hodnoceny pomocí jednovýběrového ANOVA testu pro opakovaná měření, párového t-testu nebo párového Wilcoxonova testu. Podrobnosti statistické analýzy jsou součástí metodiky příložených studií

7 VLASTNÍ VÝSLEDKY

7.1 Vliv kardiochirurgického výkonu na cirkulující hladiny FGF-21 a na mRNA expresi FGF-21 v epikardiální tukové tkáni, podkožní tukové tkáni a kosterním svalu

Vliv kardiochirurgického výkonu na zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů v podkožním a epikardiálním tuku prokázala již předchozí studie (Křemen *et al.* 2006). Autoři za jeden z možných mechanismů inzulinové rezistence považují nadprodukcii prozánětlivých cytokinů tukovou tkání.

Cílem této studie bylo sledování mRNA exprese FGF-21 v epikardiální a podkožní tukové tkáni a v kosterním svalu v průběhu elektivního kardiochirurgického výkonu s použitím mimotělního oběhu. Dále jsme sledovali dynamiku změn sérových hladin FGF-21 v průběhu kardiochirurgického výkonu a po něm.

Do studie bylo zařazeno 15 mužů, kteří podstoupili aorto-koronární bypass s použitím mimotělního oběhu. Všichni pacienti měli arteriální hypertenzi, ischemickou chorobu srdeční (ICHS) a $BMI \geq 25$. Žádný neměl diagnózu DM, selhání ledvin, malignitu, onemocnění štítné žlázy nebo akutní infekci. Hyperlipidémii mělo 7 pacientů a z toho 5 bylo léčeno atorvastatinem a dva fluvastatinem. Žádný pacient nebyl léčen metforminem nebo fibrátem.

Průměrné trvání operace bylo 252 ± 31 minut. Vzorky krve a tkání byly odebrány podle protokolu, který je uveden v kapitole 7.1 Metodika studií.

7.1.1 Výsledky

V tabulce 1 je uvedena charakteristika souboru pacientů s rozdělením do podskupin podle toho, zda u nich byla pooperačně zahájena terapie inzulinem. Průměrný obvod pasu byl $103 \pm 3,4$ cm, průměrná bazální glykémie $6,1 \pm 0,29$ mmol/l, průměrný HbA1C $4,07 \pm 0,1\%$.

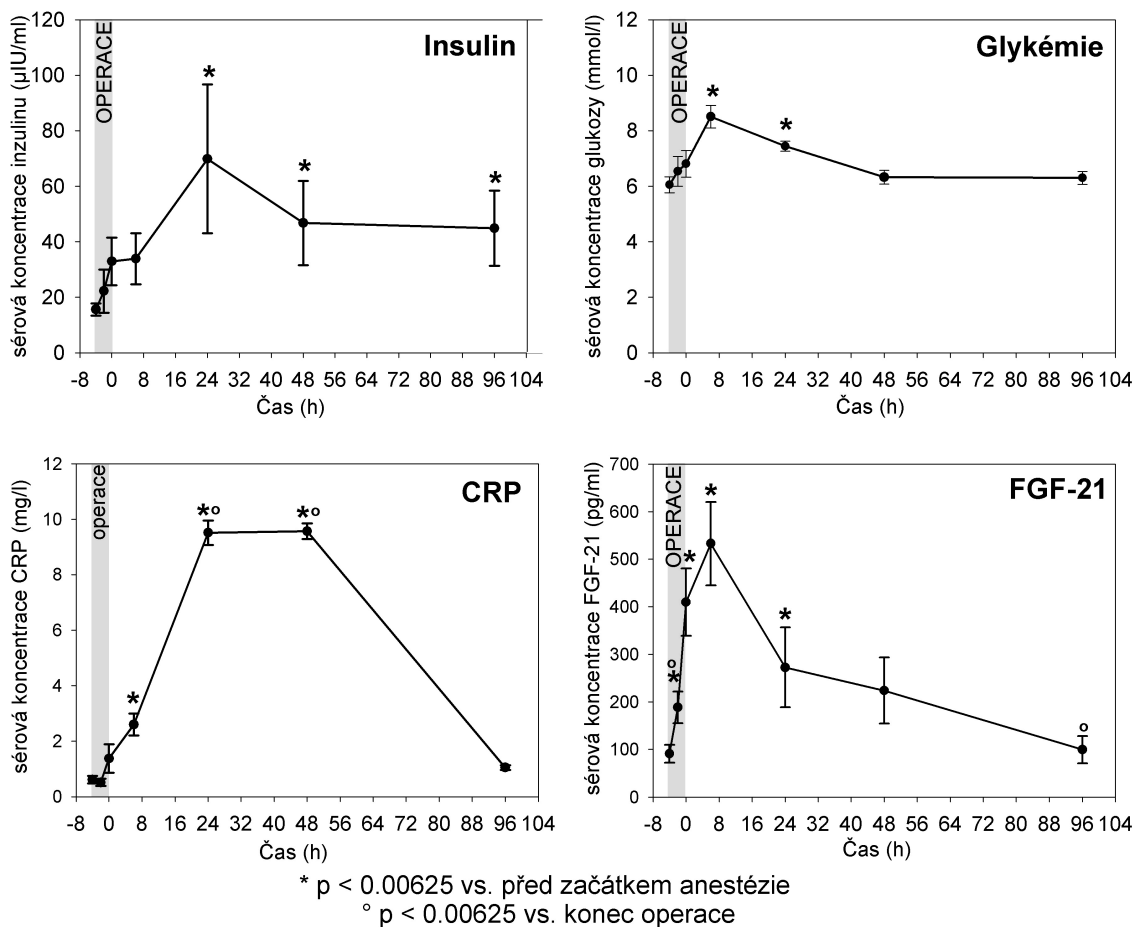
	Celá skupina	IT podskupina	NT podskupina	IT vs NT
Klinická charakteristika:				
Počet pacientů	15	8	7	NS
Věk (roky)	66 ± 2	68 ± 2	63 ± 3	NS
Body mass index (kg/m ²)	$29,22 \pm 0,79$	$27,81 \pm 0,67$	$30,63 \pm 1,29$	NS
Body surface area (m ²)	$2,02 \pm 0,04$	$1,96 \pm 0,05$	$2,08 \pm 0,07$	NS
HOMA index T0	$4,31 \pm 0,71$	$4,39 \pm 1,04$	$4,24 \pm 1,07$	NS
FGF-21 genová exprese v kosterním svalu na začátku operace	$3,08^{-4}$ ($0,93^{-4}$ - $5,45^{-4}$)	$4,26^{-4}$ ($3,13^{-4}$ - $9,52^{-4}$)	$0,73^{-4}$ ($0,47^{-4}$ - $2,94^{-4}$)	p = 0,040
Sérové koncentrace:				
HbA1c T0 (%)	$4,07 \pm 0,10$	$4,13 \pm 0,17$	$4,01 \pm 0,10$	NS
Glykémie T0 (mmol/l)	$6,1 \pm 0,29$	$6,3 \pm 0,49$	$5,8 \pm 0,28$	NS
Glykémie T3 (mmol/l)	$8,5 \pm 0,41$	$9,5 \pm 0,62$	$7,5 \pm 0,24$	p = 0,005
Glykémie T5 (mmol/l)	$6,3 \pm 0,24$	$5,8 \pm 0,29$	$6,9 \pm 0,30$	p = 0,027
CRP at T2 (mg/l)	$1,4 \pm 0,52$	$0,4 \pm 0,11$	$2,5 \pm 0,97$	p = 0,009
FGF-21 T5 (pg/ml)	130 (51 - 231)	222 (120 - 581)	66 (35 - 114)	p = 0,038
FGF-21 AUC	24673 ± 4599	34450 ± 6731	13498 ± 2518	p = 0,016

Tabulka 1

Klinická charakteristika souboru pacientů rozdělených na podskupinu s pooperační inzulinovou terapií (IT podskupina) a bez inzulinové terapie (NT podskupina). Výsledky jsou vyjádřeny jako medián (inter-kvartilové rozpětí) nebo průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Pro výpočet statistické významnosti byl použit nepárový t-test nebo Mann-Whitney rank um test podle normality rozdělení dat.

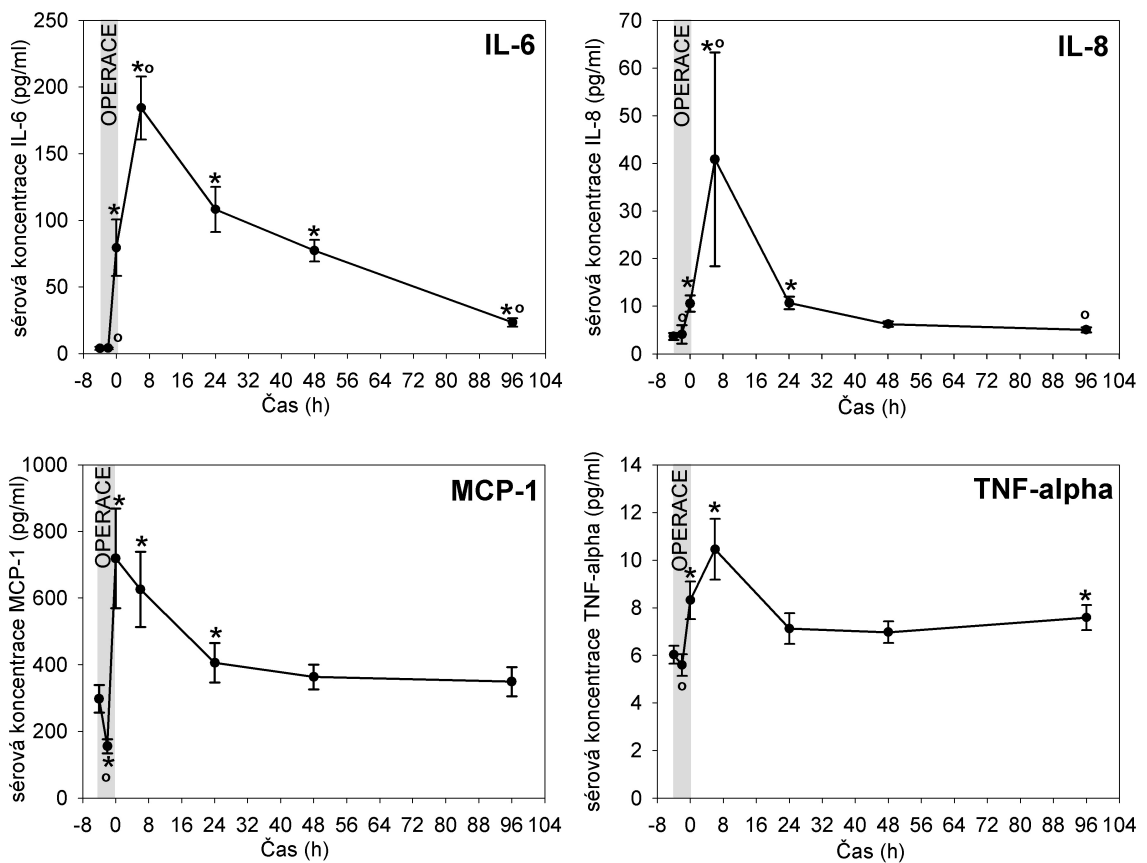
NS, není signifikantní; SO, start operace; T0, před úvodem do anestezie; T3, 6 hodin po konci operace; T5, 48 hodin po konci operace; FGF-21 AUC, plocha pod křivkou sérové koncentrace FGF-21

Sérové koncentrace FGF-21 narůstaly v průběhu operace s maximem 6 hodin po operaci s návratem k bazální hladině 96 hodin po operaci (obr. 3). Hodnota glykémie byla maximální 6 hodin po operaci s normalizací 48 hodin po operaci, zatímco hladina inzulínu měla maximum 48 hodin od operace a zůstala signifikantně zvýšena ještě 96 hodin od operace (obr. 3). Sérová hladina CRP byla na maximální hodnotě 24 hodin po operaci a takto zůstala zvýšena do 48 hodin po operaci a pak se vrátila k normálu 96 hodin od operace (obr. 3). Hladiny sledovaných cytokinů IL-6, IL-8, TNF- α a MCP-1 měly maximum do 6 hodin po operaci (obr. 4).



Obr 3

Sérové koncentrace inzulinu, glykémie, CRP a FGF-21 měřené u kardiochirurgických pacientů před úvodem do anestézie, před začátkem mimotělního oběhu, na konci operace a 6, 24, 48 a 96 hodin po konci operace. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM), n= 15, Pro výpočet statistické významnosti byl použit párový t-testu nebo Wilcoxon Signed Rank Test, dle normality dat. Hodnoty P byly korigovány pro vícečetné porovnávání pomocí Bonferroniho korekce: * znamená p < 0,00625 vs. před úvodem do anestézie, ° znamená p < 0.00625 vs. na konci operace.



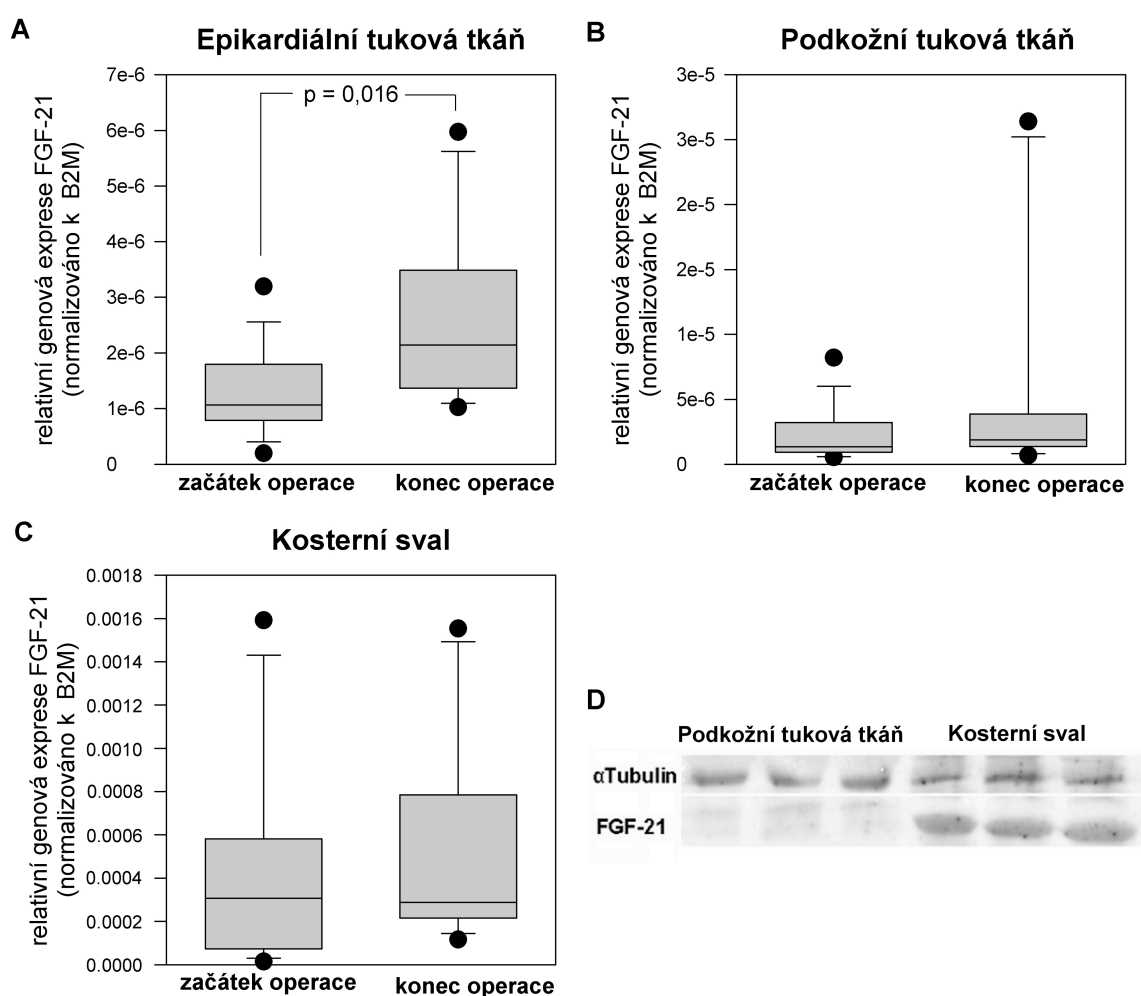
* $p < 0.00625$ vs. před začátkem anestézie
 ° $p < 0.00625$ vs. konec operace

Obr 4

Sérové koncentrace IL-6, IL-8, MCP-1, and TNF- α měřené u kardiochirurgických pacientů před úvodem do anestézie, před začátkem mimotělního oběhu, na konci operace a 6, 24, 48 a 96 hodin po konci operace. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM), $n = 15$. Pro výpočet statistické významnosti byl použit párový t-test nebo Wilcoxon Signed Rank Test, dle normality dat. Hodnoty P byly korigovány pro vícečetné porovnávání pomocí Bonferroniho korekce: * znamená $p < 0,00625$ vs. před úvodem do anestézie, ° znamená $p < 0,00625$ vs. na konci operace.

Na začátku operace byla mRNA exprese FGF-21 v kosterním svalu vyšší než v epikardiální a podkožní tukové tkáni. Během operace nedošlo k signifikantní změně mRNA exprese FGF-21 ve svalové tkáni (obr. 5C) ani v podkožní tukové tkáni (obr. 5B) zatímco v epikardiální tukové tkáni došlo k signifikantnímu nárůstu mRNA exprese FGF-21 (obr. 5A).

Na začátku operace byla v kosterním svalu FGF-21 proteinová exprese 4.7krát vyšší (p=0,014) než v podkožní tukové tkáni (obr. 5D).



Obr 5

Relativní genová exprese FGF-21 mRNA v epikardiální (A) a podkožní tukové tkáni (B) a v kosterním svalu (C). Vzorky byly odebrány na začátku a před koncem operace. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián (inter-kvartilové rozpětí) n=15/group. Pro výpočet statistické významnosti byl použit párový t-test nebo Wilcoxon Signed Rank Test, dle normality dat. Western blot vzorků podkožní tukové tkáně a kosterního svalu na začátku operace (D). 70 μ g proteinového lyzátu protein bylo použito na každou detekci a jako kontrola byl alpha-tubulin.

FGF-21 mRNA exprese v kosterním svalu korelovala pozitivně s glykemií ($r = 0,678$, $p = 0,007$) na konci operace. Nebyly nalezeny žádné signifikantní korelace mezi hladinou sérového FGF-21 AUC a jinými antropometrickými či biochemickými parametry.

Podrobná metodika a výsledky studie byly publikovány v *Physiological Research* (IF 1,555)

*Kotulák T, Drápalová J, Kopecký P, Lacinová Z, Kramář P, Říha H, Netuka I, Malý J, Housa D, Bláha J, Svačina Š, Haluzík M.: **Increased circulating and epicardial adipose tissue mRNA expression of fibroblast growth factor-21 after cardiac surgery: possible role in postoperative inflammatory response and insulin resistance***

Physiol Res. 2011;60(5):757-67.

Článek je přiložen.

7.2 Posouzení vlivu kardiochirurgické operace s použitím mimotělního oběhu na sérové koncentrace A-FABP a jeho mRNA expresi v epikardiální a podkožní tukové tkáni, kosterním svalu a periferních monocytech

Etiopatogeneze inzulínové rezistence a hyperglykémie u kriticky nemocných a pacientů s DM se částečně liší. Kromě jiných faktorů se na ní podílí jaterní inzulínová rezistence a zvýšená produkce prozánětlivých faktorů tukovou tkání (Křemen et al. 2006, Mazurek et al. 2003, Kotulák et al. 2011). Klinické i experimentální studie ukazují na roli A-FABP v regulaci zánětu, energetické homeostázy, metabolismu glukózy a lipidů (Furuhashi et al. 2008, Hotamisligil et al. 1996, Uysal et al. 2000, Xu et al. 2006).

Cílem studie bylo ověřit vliv A-FABP na rozvoj hyperglykémie a inzulínové rezistence u pacientů podstupujících kardiochirurgickou operaci s použitím mimotělního oběhu. Dalším cílem byla analýza vlivu přítomnosti diabetes mellitus 2 typu (T2DM) na sérové hladiny A-FABP a jeho expresi mRNA v průběhu a po kardiochirurgickém výkonu.

Do studie bylo zařazeno 31 mužů, kteří podstoupili elektivní kardiochirurgický výkon s použitím mimotělního oběhu (aortokoronární bypass (CABG) - 23 pacientů, CABG a náhrada aortální chlopně – 4 pacienti, náhrada aortální chlopně – 1 pacient, CABG a náhrada mitrální chlopně – 1 pacient a náhrada mitrální chlopně 2 pacienti). Žádný pacient neměl selhání ledvin, malignitu, onemocnění štítné žlázy nebo akutní infekci. Podle přítomnosti diagnózy diabetes mellitus byli rozděleni do dvou skupin diabetiků a nediabetiků. Jedenáct pacientů mělo T2DM léčený metforminem, 2 pacienti inzulínem, 5 pacientů a 4 pacienti byli pouze na dietě. Hyperlipidémií mělo 13 pacientů a z toho 10 bylo léčeno atorvastatinem, dva fluvastatinem a jeden rosuvastatinem.

Průměrné trvání operace bylo 308 minut. Vzorky krve a tkání byly odebrány podle protokolu, který je uveden v kapitole 7.1 Metodika studií.

7.2.1 Výsledky

V tabulce 2 jsou uvedeny klinické charakteristiky pacientů zařazených do studie. Předoperační sérové hladiny A-FABP měly tendenci k vyšším hodnotám u diabetiků, rozdíl však nedosáhl statistické významnosti. Diabetici měli vyšší předoperační hladiny glykémie, inzulínu, HbA1C, zatímco jejich předoperační sérové hladiny hsCRP byly signifikantně nižší.

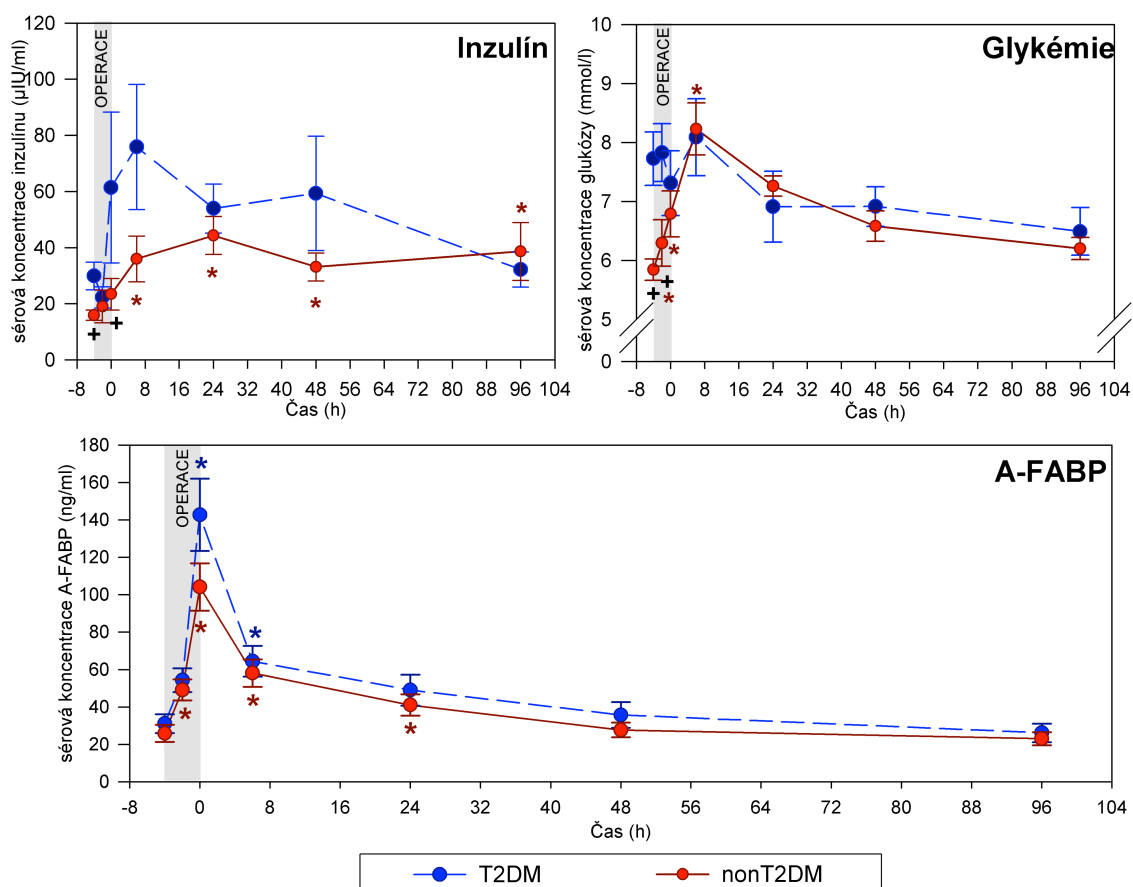
	T2DM	NonT2DM	P
Počet pacientů (muži/ženy)	11/0	20/0	NR
Věk (roky)	62,0 ± 2,0	64,7 ± 1,6	0,307
Délka operace (hod)	5,2 ± 0,18	5,1 ± 0,23	0,457
Body mass index (kg/m ²)	31,3 ± 1,46	29,4 ± 0,69	0,322
Body surface area (m ²)	1,98 ± 0,07	2,04 ± 0,04	0,448
Glykémie (mmol/l)	7,28 ± 0,45	5,84 ± 0,18	0,001
Inzulín (μIU/ml)	29,9 ± 4,9	15,9 ± 1,8	0,014
HOMA-IR index	10,46 ± 1,87	4,20 ± 0,58	0,003
HbA1c (mmol/mol IFCC)	51,7 ± 2,9	40,0 ± 0,7	<0,001
hsCRP (mg/l)	0,260 ± 0,085	0,530 ± 0,113	0,048
Celkový cholesterol (mmol/l)	3,85 ± 0,19	4,07 ± 0,15	0,312
HDL cholesterol (mmol/l)	0,893 ± 0,079	0,989 ± 0,054	0,313
LDL cholesterol (mmol/l)	2,18 ± 0,19	2,42 ± 0,14	0,215
Triglyceridy (mmol/l)	1,77 ± 0,19	1,38 ± 0,17	0,240
BNP (ng/l)	398 ± 241	215 ± 60	0,620
A-FABP (ng/ml)	31,1 ± 5,1	25,9 ± 4,6	0,175

Tabulka 2

Základní antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky pacientů zařazených do studie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM). Pro výpočet statistické významnosti byl použit nepárový t-test nebo Mann-Whitney rank sum test podle normality rozdělení dat.

V průběhu operace i ve sledovaném pooperačním období měly v obou studovaných skupinách sérové koncentrace A-FABP podobný průběh s maximem na konci operace a návratem k základní hodnotě 24 až 48 hodin po konci operace (obr. 6). A-FABP plochy

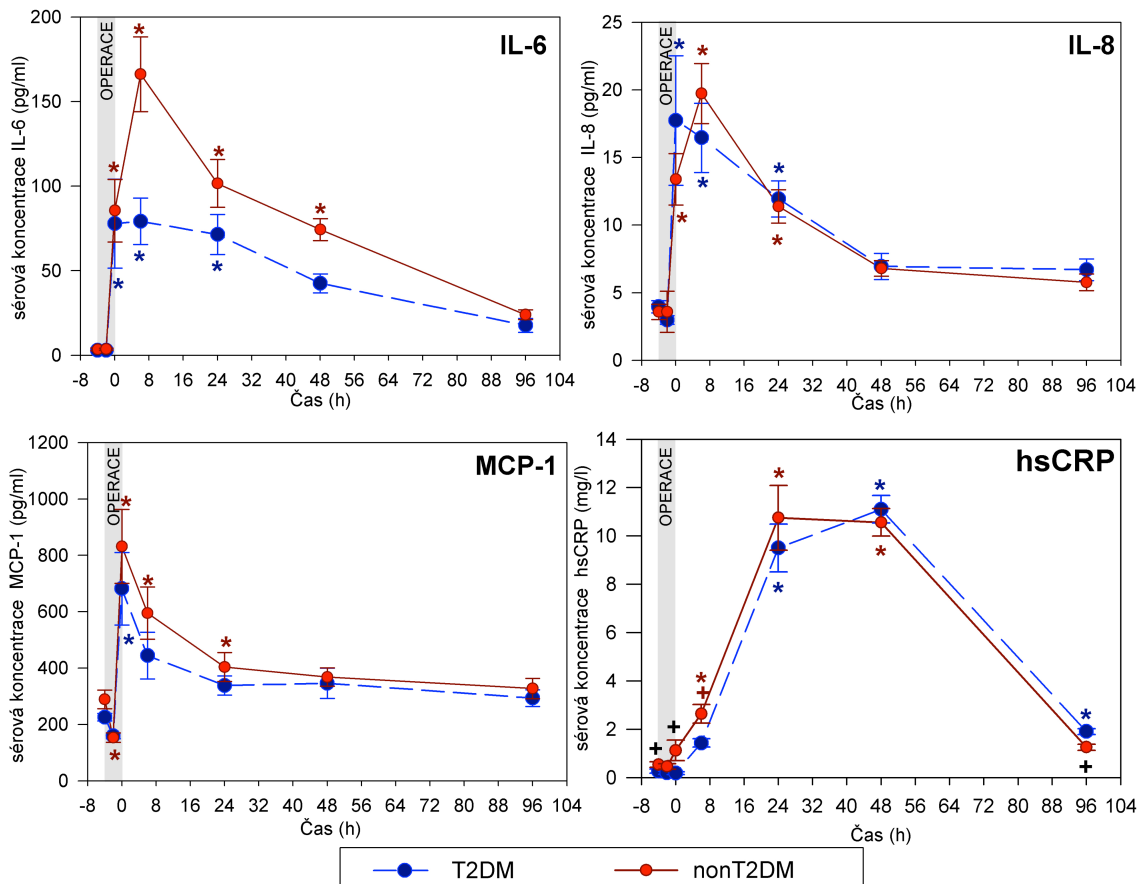
pod křivkou (AUC) pro celou dobu studie se mezi oběma skupinami významně nelišily. Nejvyšší hodnoty glykémie byly zjištěny 6 hodin po operaci; k jejich normalizaci došlo 48 hodin po konci operace opět bez rozdílu mezi studijními skupinami (obr. 6). Sérová hladina inzulinu měla maximální hodnotu u obou studijních skupin 6 hodin po operaci a zůstala zvýšená po celou dobu sledování. Ve skupině diabetiků byla hladina sérového inzulinu signifikantně vyšší než ve skupině nediabetiků (obr. 6).



Obr 6

Sérové koncentrace inzulinu, glykémie a A-FABP měřené u kardiochirurgických pacientů před úvodem do anestezie, před začátkem mimotělního oběhu, na konci operace a 6, 24, 48 a 96 hodin po konci operace. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM). Čas konce operace je označen jako čas nula. Statistická analýza byla provedena pomocí ednovýběrového ANOVA testu pro opakovaná měření spolu s Dunnettovým testem pro vícečetná porovnání vůči kontrolní skupině: * $p < 0,05$ vs. před úvodem do anestezie; + $p < 0,05$ vs. T2DM.

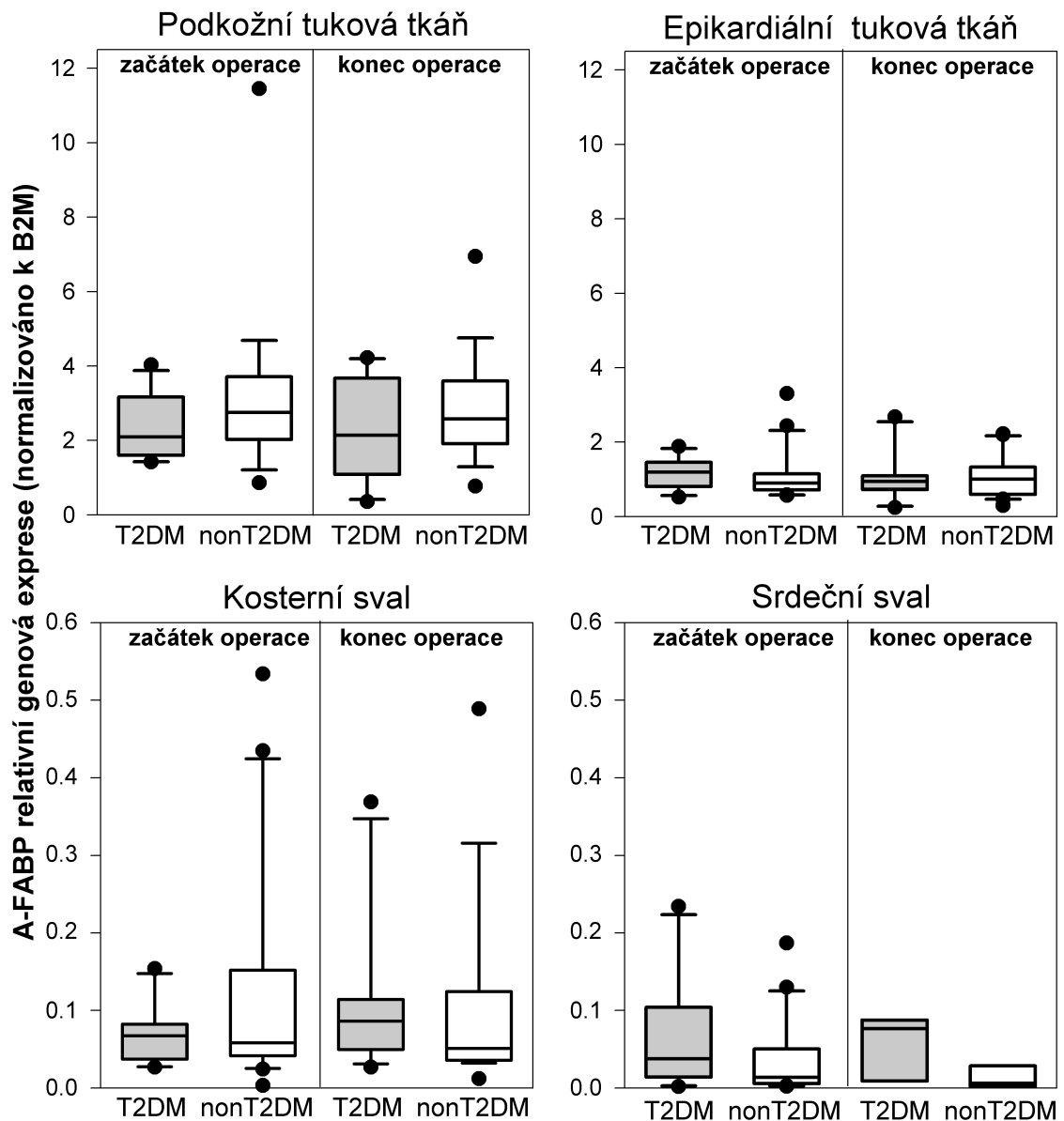
Sérové hladiny CRP dosáhly maximální hodnoty u nediabetiků 24 hodin po operaci a u diabetiků 48 hodin a téměř k základní hodnotě se vrátily na konci studijního období. Hladiny IL-6, IL-8 a MCP-1 dosáhly maxima bezprostředně po operaci bez signifikantního rozdílu mezi jednotlivými studovanými skupinami (obr. 7).



Obr 7

Sérové koncentrace IL-6, IL-8, MCP-1 a hsCRP měřené u kardiochirurgických pacientů před úvodem do anestezie, před začátkem mimotělního oběhu, na konci operace a 6, 24, 48 a 96 hodin po konci operace. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM). Čas konce operace je označen jako čas nula. Statistická analýza byla provedena pomocí jednovýběrového ANOVA testu pro opakovaná měření spolu s Dunnettovým testem pro vícečetná porovnání vůči kontrolní skupině: * $p < 0,05$ vs. před úvodem do anestezie; + $p < 0,05$ vs. T2DM.

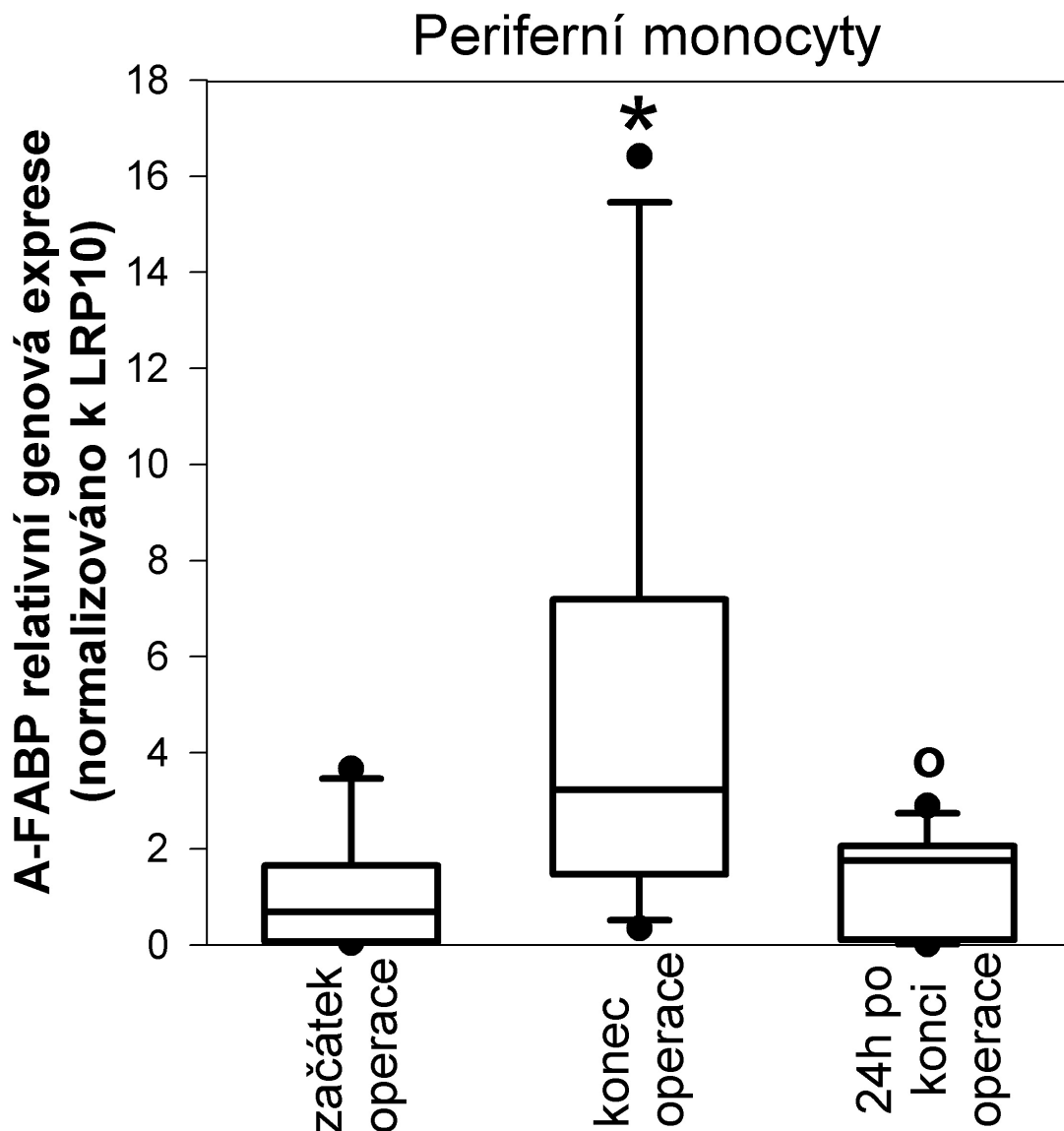
Kardiochirurgický výkon neměl signifikantní vliv na A-FABP mRNA expresi v tukové a svalové tkáni (obr. 8). A-FABP mRNA exprese v epikardiální tukové tkáni byla signifikantně nižší než v podkožní tukové tkáni na začátku i konci operace. Mezi A-FABP mRNA expresí v kosterním svalu a myokardu nebyl v obou měřeních signifikantní rozdíl (obr. 8).



Obr 8

Relativní genová exprese A-FABP mRNA v podkožní tukové tkáni, epikardiální tukové tkáni, kosterním svalu a myokardu. Vzorky byly odebrány na začátku a před koncem operace. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián (inter-kvartilové rozpětí).

V periferních monocytech vykazuje mRNA exprese A-FABP 4,9násobné zvýšení na konci operace oproti začátku operace ($p < 0,05$) s následným snížením 24 hodin od operace (obr. 9).



Obr 9

Relativní genová exprese A-FABP mRNA v izolovaných monocytech. Vzorky byly odebrány na začátku a před koncem operace a 24 hodin po konci operace. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián a (inter-kvartilové rozpětí). Výsledky jsou normalizovány na expresi LRP10. Statistická analýza byla provedena pomocí jednovýběrového ANOVA testu pro opakovaná měření spolu s Dunnettovým testem pro vícečetná porovnání vůči kontrolní skupině: * $p < 0,05$ vs začátek operace; ° $p < 0,05$ vs konec operace.

V celé studijní populaci korelovala pozitivně A-FABP AUC s předoperační hodnotou HbA1C ($R = 0,511$; $p = 0,006$) a IL-8 AUC ($R = 0,701$; $p < 0,001$). A-FABP mRNA

exprese v podkožní tukové tkáni na začátku operace pozitivně korelovala s věkem ($R = 0,417$; $p = 0,025$) a negativně s BSA ($R = -0,434$; $p = 0,017$) a HOMA indexem ($R = -0,425$; $p = 0,0305$). V epikardiální tukové tkáni A-FABP mRNA exprese vykazovala pozitivní korelaci s HDL cholesterolem ($R = 0,55$; $p = 0,0014$), přičemž negativně korelovala pouze s BSA ($R = -0,362$; $p = 0,046$). A-FABP mRNA exprese v periferních monocytech pozitivně korelovala se sérovými koncentracemi A-FABP ($R = 0,625$; $p < 0,001$).

Podrobná metodika a výsledky studie byly publikovány v *Physiological Research* (IF 1,555)

Tomas Kotulak, Jana Drapalova, Michael Lips, Zdena Lacinova, Petr Kramar, Hynek Riha, Ivan Netuka, Jiri Maly, Jan Blaha, Jaroslav Lindner, Stepan Svacina, Milos Mraz and Martin Haluzik: Cardiac Surgery Increases Serum Concentrations of Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein and its mRNA Expression in Circulating Monocytes but not in Adipose Tissue

Článek v plném znění je přiložen.

8 DISKUZE

8.1 Fibroblastový růstový factor 21 a kardiochirurgický výkon – vliv na sérové koncentrace FGF-21 a mRNA expresi v epikardiální a podkožní tukové tkáni a kosterním svalu

Epikardiální tuková tkáň je významným zdrojem zánětlivých faktorů. Během kardiochirurgického výkonu dochází ke zvýšení mRNA exprese prozánětlivých mediátorů v podkožní i epikardiální tukové tkáni (Křemen *et al.* 2006, Mazurek *et al.* 2003).

V naší práci se nám podařilo prokázat, že během kardiochirurgického výkonu signifikantně stoupá genová mRNA exprese FGF-21 v epikardiální tukové tkáni a jeho plazmatická hladina. Dalším významným zjištěním je signifikantně vyšší FGF-21 mRNA genová exprese a proteinová exprese v kosterním svalu než v epikardiálním a podkožním tuku. Toto zjištění nás vede k úvaze, že by kosterní sval mohl být dalším významným zdrojem FGF-21.

Naše studie tedy prokazuje, že hyperglykémie, inzulínová rezistence a systémová zánětlivá odpověď organismu způsobené kardiochirurgickým výkonem s použitím mimotělního oběhu jsou doprovázeny významným a časným vzestupem hladiny cirkulujícího FGF-21. Ostatní prozánětlivé cytokiny, jako například IL-6, IL-8 a TNF- α , vykazovaly podobný vzestup jako FGF-21. FGF-21 mRNA exprese v kosterním svalu na začátku operace byla signifikantně vyšší ve skupině s pooperační infuzí inzulínu. Navíc tato skupina měla signifikantně vyšší AUC sérového FGF-21. Jedno z možných vysvětlení těchto rozdílů je, že pacienti, kteří pooperačně dostávali infuzi inzulínu, měli vyšší stupeň inzulínové rezistence. Proto u nich byl kompenzatorní vzestup exprese FGF-21 ve svalové tkáni vyšší.

Pozitivní korelace mezi glykemií na konci operace a FGF-21 mRNA expresí v kosterním svalu na konci operace by mohla poukazovat na určitý vliv těchto faktorů na regulaci svalové exprese FGF-21. Nicméně kardiochirurgický výkon s použitím mimotělního oběhu vyvolává komplexní zánětlivou reakci, která je multifaktoriální a není tedy zcela jasná, které z mediátorů se přímo podílely na modulaci hladin FGF-21 a jeho exprese mRNA.

O změnách hladin FGF-21 v kritických stavem nebo podmínkách perioperačního stresu je zatím známo velmi málo. Jedna z prvních prací je Johnsonova studie na myším modelu pankreatitidy indukované ceruleinem nebo mechanicky či thapsigarginem indukovaným stresem. Autoři srovnávali kontrolní myši s transgenní myši s FGF-21 nadprodukcí nebo naopak myši s knockoutem genu pro FGF-21. V acinárních buňkách pankreatu FGF-21 mRNA exprese výrazně stoupla u ceruleinem indukované pankreatitidy a závažnost pankreatického poškození byla v inverzním vztahu k plazmatické hladině FGF-21. Myši s transgenně zvýšenou expresí FGF-21 měly nižší hladinu sérové amylázy a menší aktivaci pankreatických hvězdicových buněk, zatímco u myši s knockoutem FGF-21 byly sérové hladiny amylázy a aktivace pankreatických hvězdicových buněk větší (Johnson et al. 2009). Nedávno publikovaná studie srovnávala 22 pacientů se sepsí, 11 pacientů se syndromem systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) a 12 zdravých dobrovolníků. Plazmatické hladiny FGF-21 byly signifikantně zvýšené u pacientů se sepsí a SIRS oproti zdravým dobrovolníkům. Zároveň byly plazmatické hladiny FGF-21 signifikantně vyšší u septických pacientů než u pacientů s neinfekčním SIRS (Gariani et al. 2013). Tato studie poukazuje na možnou roli FGF-21 v rozvoji zánětlivé odpovědi organismu. Naše data navíc poukazují na to, že reakce organismu na operační stres je velmi rychlá, protože ke změnám v plazmatických koncentracích a genové mRNA expresi FGF-21 dochází již v průběhu operace.

Recentně publikovaná studie prokazuje spojitost zvýšené plazmatické hladiny FGF-21 s přítomností nealkoholické steatózy jater a jako nezávislého rizikového faktoru pro koronární aterosklerozu (Shen et al. 2013). Další práce prokazuje spojitost vyšších hladin FGF-21 a rozvoje aterosklerotických změn arteria carotis, a to nezávisle na jiných rizikových faktorech, jako je patologický lipidogram nebo CRP (Chow et al. 2013). V jiné práci na skupině 87 pacientů s diabetem a věkem 57-66 let, které rozdělili do dvou skupin podle plazmatické hladiny FGF-21 $\leq 240,7$ pg/mL (tato hodnota byla zároveň mediánem v celé skupině) a pacienty s hladinou FGF-21 $> 240,7$ pg/mL.(nejasné – něco chybí?) Pacienty sledovali 24 měsíců a ve skupině s vyšší hodnotou pozorovali signifikantně vyšší riziko kardiovaskulární morbidity a mortality (Lenart-Lipińska et al. 2013).

Naše data ukazují výrazný vzestup sérové hladiny FGF-21 v průběhu a po kardiochirurgickém výkonu s jeho možným významem v odpovědi lidského organismu na perioperační stres. Mechanismus, jakým se uplatňuje FGF-21 v stresové situaci, která je spojena se systémovou zánětlivou reakcí a inzulínovou rezistencí, není jasný. Na plazmatické hladiny FGF-21 a jeho mRNA expresi v některých tkáních může mít vliv právě kompenzatorní reakce na zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů, které zároveň ovlivňují rozvoj inzulínové rezistence, jejíž závažnost by právě vyšší hladina FGF-21 mohla redukovat. Na druhou stranu může zánětlivá reakce způsobit rezistenci na účinky FGF-21, která by mohla vést k jeho zvýšené produkci. Vzhledem k relativně malému počtu pacientů zařazených do studie nemůžeme jednoznačně prokázat, jak významný je vliv změn hladin FGF-21 na regulaci metabolických dějů u pacientů po kardiochirurgické operaci. Je však možné předpokládat, že zvýšení hladin FGF-21 je důležitou součástí této komplexní stresové reakce. Naše výsledky navíc naznačují, že přítomnost diabetu - tedy možný rozdíl ve stupni inzulínové rezistence - je spojen s rozdílnou expresí FGF-21 ve svalu.

8.2 Vliv kardiochirurgického výkonu na sérové koncentrace A-FABP a mRNA expresi v epikardiální a podkožní tukové tkáni, kosterním svalu a periferních monocytech

A-FABP je protein, který je produkován v tukové tkáni (Baxa *et al.* 1989) a také v monocytech (Furuhashi *et al.* 2008). Jde o protein, který má vliv na celou řadu metabolických regulací, modulaci zánětu a procesů spojených s rozvojem aterosklerózy. V naší studii jsme prokázali, že kardiochirurgický výkon s použitím mimotělního oběhu má bezprostřední vliv na zvýšení sérové hladiny A-FABP. Dalším důležitým zjištěním je zvýšená A-FABP mRNA exprese pouze v periferních monocytech, avšak nikoliv v epikardiální či podkožní tukové tkáni, respektive ve svalové tkáni. Vzhledem k perioperačnímu stresu a zvýšené produkci dalších zánětlivých mediátorů v epikardiální a podkožní tukové tkáni (Křemen *et al.* 2006, Mazurek *et al.* 2003, Kotulák *et al.* 2011) může být zvýšená hladina A-FABP dalším faktorem, který přispívá k rozvoji a ke zhoršení pooperační hyperglykémie a inzulínové rezistence. Nedávno byla provedena studie u 120 kriticky nemocných (72 septických a 48 bez sepse a 45 zdravých dobrovolníků jako kontrolní skupina), která ukázala, že u kriticky nemocných je sérová hladina A-FABP zvýšená. Hladiny A-FABP navíc nezávisle korelovaly s glykemií, hladinou sérového kreatininu, cholesterolu a TNF- α . Vyšší sérové hladiny A-FABP (> 40 ng/ml) byly spojeny s horším celkovým přežitím, a to zejména u septických pacientů (Huang *et al.* 2013). Tyto výsledky ukazují na možnou roli A-FABP jako prognostického faktoru u kriticky nemocných.

Studie u 170 pacientů s ICHS porovnávala sérové hladiny A-FABP a závažnost abnormalit stresové myokardiální perfuze pomocí echokardiografie a Tl-201 dipyridamole single-photon emisní počítačové tomografie. Vyšší sérová hladina A-FABP byla spojena se závažnějšími abnormalitami perfuze myokardu a také predikovala přítomnost srdečního

selhání (Huang *et al.* 2013). Podobně jiné studie poukazují na zvýšené hladiny A-FABP u pacientů s koronární nemocí verifikovanou koronarograficky (Doi *et al.* 2011) a jejich nezávislou asociací s kardiovaskulární morbiditou a mortalitou u pacientů s ICHS (von Eynatten *et al.* 2012). Pacienti v naší studii měli relativně vyšší bazální hladiny A-FABP než v předchozí studii (Doi *et al.* 2011); navíc jsme nezaznamenali rozdíl mezi skupinami diabetiků a nediabetiků. To si vysvětlujeme poměrně vysokou prevalencí jednotlivých komponent metabolického syndromu (obezita, dyslipidémie) a také přítomností ICHS v obou skupinách pacientů.

Jiná experimentální studie prokázala přímý efekt A-FABP na buňky myokardu, který vedl k přímé inhibici kontraktility a tento negativně inotropní efekt byl závislý na koncentraci A-FABP (Lamounier-Zepter *et al.* 2009). Při analýze našich dat jsme v souboru našich pacientů neprokázali signifikantní vztah mezi sérovými hladinami BNP jako ukazatele srdečního selhání a hladinami A-FABP.

Nejvýznamnějším objevem naší práce, který dosud nebyl v literatuře popsán, je disociace mezi zvýšením sérových hladin A-FABP a jeho nezměněnou genovou expresí v epikardiální, respektive podkožní tukové tkáni. Změny exprese v tukové tkáni jsme nezaznamenali přesto, že hladiny A-FABP měly maximum v době, kdy se odebíral druhý vzorek uvedených tkání. Nicméně A-FABP mRNA exprese na začátku operace byla signifikantně vyšší v podkožní tukové tkáni než v epikardiální tukové tkáni, což je v souladu s jinou studií, která prokazuje vyšší A-FABP mRNA expresi a produkci proteinu v podkožní tukové tkáni v porovnání s viscerální tukovou tkání (Fisher *et al.* 2001).

Výsledky naší studie tak potvrzují důležitost imunokompetentních buněk při produkci A-FABP, ačkoliv se původně předpokládala jeho produkce pouze v tukové tkáni. Produkce A-FABP v makrofázích byla prokázána až pozdějšími studiemi (Furuhashi *et al.* 2008). V experimentálním modelu primárních lidských monocytů a monocytárních

buněčných linií byla A-FABP mRNA prokázána po stimulaci syntetickým agonistou peroxisome-proliferátor aktivovaného receptoru gamma (PPAR γ) (Pelton et al. 1999). Signifikantní snížení produkce zánětlivých cytokinů byla popsána v makrofázích, které neprodukují A-FABP (*A-FABP*^{-/-}) (Makowski et al. 2005), což svědčí pro významnou úlohu tohoto faktoru při regulaci zánětlivých dějů. Další studie prokazuje u pacientů s revmatoidní artritidou zvýšenou A-FABP mRNA expresi v synoviálních makrofázích (Andrés Cerezo et al. 2013).

V naší studii jsme analyzovali A-FABP mRNA expresi v periferních monocytech, které jsou považovány za prekurzor makrofágů (Mráz et al. 2011). Na konci kardiokirurgického výkonu významně stoupla A-FABP mRNA exprese s rychlou normalizací do 24 hodin od konce operace. Tento vzestup mohl být příčinou zvýšených hladin cirkulujícího A-FABP způsobeného perioperačním stresem. Není však vyloučeno, že na produkci A-FABP se mohly podílet i jiné typy imunokompetentních buněk, případně nitrobřišní viscerální tuková tkáň, jejíž vzorky v naší studii nemohly být získány.

V naší studii jsme prokázali, že kardiokirurgická operace s použitím mimotělního oběhu měla nezávisle na diagnóze diabetes mellitus vliv na zvýšenou produkci A-FABP, která byla patrně způsobena zvýšenou A-FABP mRNA expresí v periferních monocytech. V podkožní a epikardiální tukové tkáni, kosterním svalu a myokardu nebyly v naší studii změny mRNA exprese pro A-FABP prokázány. V kombinaci s dříve publikovanými údaji o vztahu A-FABP k regulaci inzulínové senzitivity a zánětlivých dějů můžeme konstatovat, že tento faktor je u kardiokirurgických pacientů významným hráčem, který se podílí na vzniku pooperační zánětlivé reakce a hyperglykémie. Náš objev zvýšené pooperační exprese A-FABP v cirkulujících monocytech pak naznačuje, že právě imunokompetentní buňky v cirkulaci jsou významnými systémovými regulátory těchto zánětlivých a metabolických dějů.

9 ZÁVĚR

Naše studie prokázaly vliv perioperačního stresu u kardiochirurgických operací na změny sérových hladin FGF-21 i A-FABP a jejich mRNA expresi v některých zkoumaných tkáních. Elektivní kardiochirurgický výkon sloužil jako vhodný model stresové reakce organismu, na které se podílejí i proteiny produkované tukovou tkání. Její role v kritických stavech se stává významnou a má podíl na vzniku inzulínové rezistence, hyperglykémie a zánětlivé odpovědi. Na druhou stranu se zdá být její množství v těchto stavech také protektivním faktorem. Naše výsledky přinesly řadu nových poznatků, jako je vysoká FGF-21 mRNA exprese v kosterním svalu a jeho možná úloha při zvýšené tvorbě tohoto faktoru u kriticky nemocných pacientů. Vzhledem k relativně menšímu počtu pacientů v obou studiích nemůžeme jasně hodnotit případný dopad zvýšených hladin zkoumaných cytokinů na klinické výsledky pacientů. Nicméně v souladu s jinými pracemi, které byly zmíněny výše, lze uvažovat o možném využití sérových hladin FGF-21 a A-FABP jako o prognostickém faktoru některých kritických stavů. Oba faktory se nepochybně podílejí na rozvoji zánětlivého stavu. Zvýšené hladiny A-FABP velmi pravděpodobně přispívají i k rozvoji inzulínové rezistence. Otevřenou otázkou zůstává význam zvýšení hladin FGF-21. Toto zvýšení může být na rozdíl od vzestupu hladin A-FABP kompenzatorní reakcí na rozvoj inzulínové rezistence a hyperglykémie spíše než jeho příčinou.

SEZNAM ZKRATEK

ADA	- American Diabetes Association
AUC	- plocha pod křivkou (area under the curve)
BMI	- body mass index
BNP	- brain natriuretic peptide
BSA	- body surface area
CABG	- aortokoronární bypass
CRP	- C reaktivní protein
Ct	- treshold cykle
DM	- diabetes mellitus
FABP-4	- fatty acid binding protein 4
FFA	- volné mastné kyseliny
FGF	- fibroblast growth factor
FGF-21	- fibroblast growth factor 21
GLUT-1	- glukózový transportér - 1
GLUT-4	- glukózový transportér - 4
HbA1C	- glykovaný hemoglobin
HDL	- high density lipid
ICHS	- ischemická choroba srdeční
IIT	- intenzivní inzulínová terapie
IL-1	- interleukin 1

IL-1 β	- interleukin -1 β
IL-6	- interleukin – 6
IL-8	- interleukin – 8
JIP	- jednotka intenzivní péče
MCP-1	- monocyte chemotactic protein-1
NAD	- nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	- nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NAMPT	- nikotinamid fosforibosyltransferase
NO	- oxid dusnatý
PAI - 1	- plasminogen activator inhibitor-1
PPAR γ	- peroxisome-proliferátor aktivovaný receptor gamma
SAA	- sérový amyloid A
SFAR	- Société Française d' Anesthésie-Réanimation
SIRS	- syndrom systémové zánětlivé odpovědi
SIRS	- syndrom systémové zánětlivé odpovědi
SRLF	- Société de Reanimation de Langue Française
T2DM	- diabetes mellitus 2 typu
TNF- α	- tumor nekrotizující faktor alfa
WHO	- Světová zdravotnická organizace

LITERATURA

1. Akinusi ME, Pineda LA, El Solh AA, et al. Effect of obesity on intensive care morbidity and mortality: a meta-analysis. *Crit Care Med.* 2008 36:151-158.
2. Andersen B, Beck-Nielsen H, Hojlund K. Plasma FGF21 displays a circadian rhythm during a 72-h fast in healthy female volunteers. *Clin Endocrinol(Oxf)* 75: 514-519, 2011
3. Andrés Cerezo L, Kuklová M, Hulejová H, et al. The level of fatty acid-binding protein 4, a novel adipokine, is increased in rheumatoid arthritis and correlates with serum cholesterol levels. *Cytokine.* 2013 Oct;64(1):441-7.
4. Asano, H., Izawa, H., Nagata, K. Plasma resistin concentration determined by common variants in the resistin gene and associated with metabolic traits in an aged Japanese population. *Diabetologia*, 2010 vol. 53, no. 2, s. 234-246.
5. Badman Mk, Pissios P, Kennedy Ar. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARAlpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell metabolism* 5: 426-437, 2007
6. Bao Y, Lu Z, Zhou M, et al. Serum levels of adipocyte fatty acid binding protein are associated with the severity of coronary artery disease in chinese women. *PLoS One.* 2011; Apr 28;6(4):e19115.
7. Baxa CA, Sha RS, Buelte MK, et al. Human adipocyte lipid-binding protein purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry.* 1989; 28:8683-8690
8. Berg AH and Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96(9): 939-949.
9. Blaha, J., Kopecky, P., Matias, M.: Comparison of three protocols for tight glycemic

- control in cardiac surgery patients. *Diabetes Care* 2009, 32, s 757-761
10. Bobbert, T., Rochlitz, H., Wegewitz, U., Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction *Diabetes*, 2005, 54, no. 9, s. 2712-2719.
 11. Boord JB, Fazio S, Linton MF, et al. Cytoplasmatic fatty acid binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13:141-147
 12. Brunkhorst FM., Engel, C., Bloos, F.: Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med* 2008, 358, s 125-139
 13. Bulló, M, Garcia-Lorda, P, Megias, I. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res.* 2003,11, s 525-531.
 14. Butler, SO., Btaiche, IF., Alaniz, C.: Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients. *Pharmacotherapy* 2005, 25, s 963-976
 15. Calabro, P., Samudio, I., Willerson, JT., Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*, 2004, 21, s. 3335-3340.
 16. Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, et al. Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly man. *Cardiovascular Diabetology.* 2011;10:44
 17. Dostálová I, Kaválková P, Haluzíková D. Plasma concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in patients with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 :3627-3632, 2008.
 18. Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M.: Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 1999, 103, s 253-259

19. Dungan, KM., Braithwaite, SS., Preiser, JC.: Stress hyperglycaemia. *Lancet* 2009, 373, s 1798-1807
20. Egi, M., Bellomo, R., Stachowski, E.: Blood glucose concentration and outcome of critical illness: The impact of diabetes. *Crit Care Med* 2008, 36, s 2249–2255
21. Egi, M., Bellomo, R., Stachowski, E.: Variability of blood glucose concentration and shortterm mortality in critically ill patients. *Anesthesiology* 2006, 105, s 244-252
22. Ellger, B., Debaveye, Y., Vanhorebeek, I.: Survival benefits of intensive insulin therapy in critical illness: Impact of maintaining normoglycemia versus glycemia-independent actions of insulin. *Diabetes* 2006, 55, s 1096–1105
23. Engstrom, G, Hedblad, B, Stawenow, L. Incidence of obesity-associated cardiovascular disease is related to inflammation-sensitive plasma proteins: a population-based cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24 s 1498-502.
24. Ernst, MC., Sinal, CJ., Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab.* 2010, 21(11): s. 660-667.
25. Esposito, K., Nappo, F., Marfella, R.: Inflammatory cytokine concentrations are increased by hyperglycemia in humans: Role of oxidative stress. *Circulation* 2002, 106, s 2067 - 2072
26. Faber DR, van der Graaf Y, Westerink J, Increased visceral adipose tissue mass is associated with increased C-reactive protein in patients with manifest vascular diseases. *Atherosclerosis.* 2010 Sep;212(1):274-80.
27. Fazeli PK, Misra M, Goldstein M. Fibroblast growth factor-21 may mediate growth hormone resistance in anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95: 369-374, 2009
28. Finfer S, Chittock DR, Su SY.: Intensive versus conventional glucose control in

- critically ill patients. *N Engl J Med* 2009, 360, s 1283-1297
29. Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, et al. Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia*. 2001 Oct;44(10):1268-73.
 30. Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa M. Visfatin:a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin *Science*, 2005, 307, no. 5708, s. 426-430.
 31. Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa M. Retraction. *Science*, 2007, 318, no. 5850, s. 565
 32. Furuhashi M, Fucho R, Gorgun CZ, et al. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118:2640-2650
 33. Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 2007 447: 959–965
 34. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR, et al. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Mar 25;316(2):129-39
 35. Galman C, Lundasen T, Kharitonov A. The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metab* 8: 169 – 174, 2011
 36. Gariani K, Drifte G, Dunn-Siegrist I, et al. Increased FGF21 plasma levels in humans with sepsis and SIRS. *Endocr Connect*. 2013 Sep 2. [Epub ahead of print]
 37. Gustavson, SM., Chu, CA., Nishizawa, M.: Interaction of glucagon and epinephrine in the control of hepatic glucose production in the conscious dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, 284, s 695 - 707

38. Haluzik M, Fiedler J, Nedvidkova J. Serum leptin concentrations in patients with combined hyperlipidemia: relationship to serum lipids and lipoproteins. *Physiol Res* 1999; 48(5): 363-368.
39. Haluzikova D, Dostálová I, Kaválková P, et al. Serum concentrations of adipocyte fatty acid binding protein in patients with anorexia nervosa. *Physiol Res*. 2009;58(4):577-81.
40. Hermanides, J., Bosman, RJ., Vriesendorp, T M.: Hypoglycemia is associated with intensive care unit mortality. *Crit Care Med* 2010, 38, s 1430 –1434
41. Hermanides, J., Vriesendorp, T M., Bosman, RJ.: Glucose variability is associated with intensive care unit mortality. *Crit Care Med* 2010, 38, s 838–842
42. Hillenbrand A, Knippschild U, Weiss M, et al. Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients. *BMC Surg*. 2010 9; 10:26.
43. Hirsch IB. Effect of insulin therapy on nonglycemic variables during acute illness. *Endocr Pract*. 2004 Mar-Apr;10 Suppl 2:63-70.
44. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, et al. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*. 1996; 274:1377-1379
45. Hotamisligil, GS, Shargill, NS & Spiegelman, BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha - direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993, 259, s 87-91.
46. Hotamisligil, GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obesity* 2003, 27, Suppl. 3, s S53-S55.
47. Hotta K, Funahashi T, Arita Y., Plasma concentrations of a novel, adipose-specific

- protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 s 1595-1599
48. Hu E, Liang P, Spiegelman BM: AdipoQ is a novel adi-pose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*, 1996; 271: 10697-10703
 49. Huang CL, Wu YW, Hsieh AR et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels in patients with critical illness are associated with insulin resistance and predict mortality. *Crit Care*. 2013 Feb 1;17(1):R22 Russell JA, Walley KR, Singer J, et al.
 50. Huang CL, Wu YW, Wu CC, et al. Association between serum adipocyte fatty-acid binding protein concentrations, left ventricular function and myocardial perfusion abnormalities in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Jul 17;12:105. doi: 10.1186/1475-2840-12-105.
 51. Hunt CR, RO JH, Dobson DE, et al. Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:3786-3790
 52. Chow WS, Xu A, Woo YC, et al. Serum Fibroblast Growth Factor-21 Levels Are Associated With Carotid Atherosclerosis Independent of Established Cardiovascular Risk Factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jul 25. [Epub ahead of print]
 53. Ichai, C., Preiser, JC., Sfar, SF.: International recommendations for glucose control in adult non diabetic critically ill patients. *Crit Care* 2010, Sep 14;14(5):R166. [Epub ahead of print]
 54. Inagaki T, Choi M, Moschetta A. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell metabolism* 2: 217-225, 2005

55. Johnson CL, Weston JY, Chadi SA, et al. Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 2009 Nov;137(5):1795-804. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.064. Epub 2009 Aug 5.
56. Kehl, F., Krolkowski, JG., Mraovic, B.: Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology* 2002, 96, s 183-188
57. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280(5), 745 - 751
58. Kharitonov A, Shanafelt Ab: Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. *BioDrugs* 22: 37-44, 2008.
59. Kharitonov A, Shiyanova Tl, Koester A. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115: 1627-1635, 2005.
60. Kharitonov A, Wroblewski Vj, Koester A. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 148: 774-781, 2007.
61. Koch A, Gressner OA, Sanson E, et al. Serum resistin levels in critically ill patients are associated with inflammation, organ dysfunction and metabolism and may predict survival of non-septic patients. *Crit Care*. 2009 13: R95.
62. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404(6778): 635-643.
63. Kosuge K, M. Soma, T. Nakayama et al., Human uncoupling protein 2 and 3 genes are associated with obesity in Japanese, *Endocrine*, 34, no. 1–3, pp. 87–95, 2008
64. Kotulák T, Drápalová J, Kopecký P, et al. Increased circulating and epicardial adipose tissue mRNA expression of fibroblast growth factor-21 after cardiac surgery: possible role in postoperative inflammatory response and insulin resistance. *Physiol*

Res. 2011;60(5):757-67. Epub 2011 Aug 1.

65. Kremen J, Dolinkova M, Krajickova J, et al. Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4620-4627, 2006.
66. Krinsley JS. Glycemic control, diabetic status and mortality in a heterogeneous population of critically ill patients before and during the era of tight glycemic control. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*; 18:317–325, 2006.
67. Krízová J, Dolinková M, Lacinová Z. Adiponectin and resistin gene polymorphisms in patients with anorexia nervosa and obesity and its influence on metabolic phenotype. *Physiol Res*. 2008;57(4) s. 539-46.
68. Krogh-Madsen, R, Moller, K, Dela, F.: Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the response of IL-6, TNF-alpha, and FFAs to low-dose endotoxemia in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286, s 766–772
69. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S., Osaka CAD Study Group Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 s 85-89
70. Kunnari, AM., Savolainen, ER., Ukkola, OH. The expression of human resistin in different leucocyte lineages is modulated by LPS and TNF α . *Regulatory Peptides*, 2009, 157, s. 57-63.
71. Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res*. 2009 Aug 14;105(4):326-34.
72. Lang, CH., Dobrescu, C., Mészáros, K.: Insulin mediated glucose uptake by

- individual tissues during sepsis. *Metabolism* 1990, 39, 1096 - 1107
73. Langouche L, Perre SV, Thiessen S, et al. Alterations in adipose tissue during critical illness: An adaptive and protective response? *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 15; 182: 507-16
 74. Lenart-Lipińska M, Matyjaszek-Matuszek B, Gernand W, et al. Serum fibroblast growth factor 21 is predictive of combined cardiovascular morbidity and mortality in patients with type 2 diabetes at a relatively short-term follow-up. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013 Aug;101(2):194-200. doi: 10.1016/j.diabres.2013.04.010. Epub 2013 Jun 12.
 75. Li, M., Fiset, A., Zhao, XY. Serum resistin correlates with central obesity but weakly with insulin resistance in Chinese children and adolescents. *International Journal of Obesity*, 2009, vol. 33, no. 4, s. 424-439.
 76. Lundasen T, Hunt Mc, Nilsson Lm. PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochemical and biophysical research communications* 360: 437-440, 2007
 77. Luo, JD, Zhang, GS., Chen, MS. Leptin and cardiovascular diseases. *Timely Topic in Medicine, Cardiovascular Diseases*, 2005, 9, s34.
 78. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsu-zawa Y, Matsubara K: cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*, 1996; 221: 286-289
 79. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Diet induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*, 2002, 8 s. 731-737
 80. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995;

1(11): 1155-1161.

81. Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, et al. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *J Biol Chem*. 2005 Apr 1;280(13):12888-95. Epub 2005 Jan 31.
82. Marfella, R., Quagliaro, L., Nappo, F.: Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest* 2001, 108, s 635-636
83. Marques MB, Langouche L, et al. Endocrine, metabolic, and morphologic alterations of adipose tissue during critical illness. *Crit Care Med*. 2013 41:317-25.
84. Matsuzawa Y., Funahashi T., Kihara S. Adiponectin and metabolic syndrome, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, 24, no. 1, s. 29-33.
85. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 108: 2460-2466, 2003.
86. McCowen, KC., Malhotra, A., Bistrrian, BR.: Stress-induced hyperglycemia. *Crit Care Clin* 2001, 17, s 107 - 124
87. Menzaghi C, Ercolino T, Paola RD, Ahaplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 2002, 51 s. 2306-2312
88. Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clinical Endocrinology* 71: 369-375, 2009
89. Mraz M, Lacinova Z, Drapalova J, et al. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and

- peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Apr;96(4):E606-13.
90. Nasraway SA Jr, Albert M, Donnelly AM et al. Morbid obesity is an independent determinant of death among surgical critically ill patients. *Crit Care Med.* 2006 34: 964-70
 91. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N: Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et biophysica acta* 2000, 1492:203-206.
 92. Ogawa Y., Kurosu, H., Yanamoto, M. BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7432-7437, 2007
 93. Oral, EA., Simha, V, Ruiz, E. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *The New England Journal of Medicine*, 2002 346, no. 8, s 570–578.
 94. Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension*, 2003, 42 s. 231-234
 95. Pelleymounter, MA., Cullen, MJ., Baker MB. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995, 269, s 540 - 543
 96. Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, et al. PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Aug 2;261(2):456-8.
 97. Preiser, JC, Devos, P, Ruiz-Santana, S.: A prospective randomised multi-centre controlled trial on tight glucose control by intensive insulin therapy in adult intensive care units: the Glucontrol study. *Intensive Care Med* 2009, 35, s 1738-1748
 98. Rassias, AJ., Givan, AL., Marrin, CA.: Insulin increases neutrophil count and phagocytic capacity after cardiac surgery. *Anesth Analg* 2002, 94(5), s 1113-1119

99. Ray DE, Matchett SC, Baker K, et al. The effect of body mass index on patient outcomes in a medical ICU. *Chest*. 2005 127: 2125-31.
100. Revollo, JR., Korner, A., Mills KF., Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in β cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metabolism*, 2007 vol. 6, no. 5, s. 363-375.
101. Rovlias, A., Kotsou, S.: The influence of hyperglycemia on neurological outcome in patients with severe head injury. *Neurosurgery* 2000, 46, s 335-342
102. Russell JA, Walley KR, Singer J, et al. Vasopressin versus norepinephrine infusion inpatients with septic shock. *N Engl J Med* 2008, 358:877-887
103. Sakr Y, Madl C, Filipescu D, et al. Obesity is associated with increased morbidity but not mortality in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2008 34: 1999-2009
104. Seidell JC. Obesity, insulin resistance and diabetes--a worldwide epidemic. *Br J Nutr* 2000; 83 Suppl 1: S5-8.
105. Shen Y, Ma X, Zhou J, et al. Additive relationship between serum fibroblast growth factor 21 level and coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Aug 28;12(1):124. [Epub ahead of print]
106. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995; 270: 26746-26749
107. Schetz, M., Vanhorebeek, I., Wouters, PJ.: Tight blood glucose control is renoprotective in critically ill patients. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19, s 571-578
108. Stead, LG., Gilmore, RM., Bellolio, MF.: Hyperglycemia as an independent predictor of worse outcome in nondiabetic patients presenting with acute ischemic stroke. *Neurocritic Care* 2009, 181-186

109. Stein S, Bachmann A, Lossner U. Serum levels of the adipokine FGF21 depend on renal function. *Diabetes Care* 32:126–128, 2009
110. Stepan, CM., Bailey, ST., Bhat S. The hormone resistin links obesity to diabetes *Nature*, 2001, 409, s. 307-312.
111. Stofkova, A. Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. *Endocrine Regulations*, 2010 vol. 44, no. 1, s. 25-36.
112. Suh, SW., Gum, ET., Hamby, AM.: Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 2007, 117, s 910-918
113. The World Health Report 2002, Reducing Risks, Promoting Healthy Life, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.
114. Tonjes A, Kralisch S, Lossner U, et al. Metabolic and genetic predictors of circulating adipocyte fatty acid-binding protein. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Aug 23. doi: 10.1038/ijo.2011.162.
115. Tremblay A., Bandi V, et al. Impact of body mass index on outcomes following critical care. *Chest*. 2003 123:1202-7.
116. Trujillo ME, Scherer PE., Adiponectin: journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med*, 2005, 257 s. 167-175
117. Tuncman G, Erbay E, Hom X, et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:6970–6975.
118. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, et al. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*. 2000; 141:3388-3396
119. Valsamakis, G., McTernan, PG., Chetty, R., Modest weight loss and reduction in

- waist circumference after medical treatment are associated with favorable changes in serum adipocytokines,” *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2004, vol. 53, no. 4, s. 430-434.
120. Van Den Berghe, G., Wilmer, A., Hermans, G.: Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 2006, 354(5):449-461
 121. Van Den Berghe, G., Wouters, P., Weekers, F.: Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001, 345, s 1359-1367
 122. Van Den Berghe, G., Wouters, PJ., Bouillon, R.: Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med* 2003, 31, s 359-366
 123. Vasseur F, Helbecque N, Dina C. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet*, 2002, 11 s. 2607-2614
 124. Verbraecken J, Van de Heyning P, De Backer W. Body surface area in normal-weight, overweight, and obese adults. A comparison study. *Metabolism*. 2006 Apr;55(4):515-24.
 125. Verma, S., Maitland, A., Weisel, RD.: Hyperglycemia exaggerates ischemia-reperfusion induced cardiomyocyte injury: reversal with endothelin antagonism. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002, 123, s 1120-1124
 126. von Eynatten M, Breitling LP, Roos M, et al. Circulating adipocyte fatty acid-binding protein levels and cardiovascular morbidity and mortality in patients with coronary heart disease: a 10-year prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):2327-35.

127. Vriesendorp, TM., Van Santen, S., Devries, JH.: Predisposing factors for hypoglycemia in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2006, 34, s 96-101
128. Wacharasint P, Boyd JH, Russell JA, et al. One size does not fit all in severe infection: obesity alters outcome, susceptibility, treatment, anti-inflammatory response. *Critical Care* 2013 17:R122.
129. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*, 2003, 278 s. 40352-40363
130. Wallace, AM., McMahon, AD., Packard, CJ. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS),” *Circulation*, 2001, 104, 25, s 3052-3056.
131. Wang, Z., Nakayama, T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:535918. Epub 2010 Aug 5.
132. Wass CT, Lanier WL et al. Glucose modulation of ischemic brain injury: review and clinical recommendations. *Mayo Clin Proc.* 1996 Aug;71(8):801-12
133. Watt, MJ., Howlett, KF., Febbraio, MA.: Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J Physiol* 2001, 534, s 269 - 278
134. Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2010, 72, s. 342-348.
135. Xu A, Tso AW, Cheung BM, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-years prospective study. *Circulation* 2007; 116: 1537-1543

136. Xu A, Wang Y, Xu JY, et al. Adipocyte fatty acid binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem.* 2006; 52:405-413
137. Yamauchi T, Kamon J, Waki H. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*, 2001, 7 s. 941-946
138. Yamauchi T, Waki H, Kamon J. Inhibition of RXR and PPAR ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 2001, 108 s. 1001-1013
139. Yudkin, JS, Stehouwer CD, Emesis, JJ. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19, s 972-978.
140. Zhang X, Yeung Dc, Karpisek M. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 57: 1246-1253, 2008.
141. Zhang Y, Proenca R, Maffei M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372(6505): 425-432.

Increased Circulating and Epicardial Adipose Tissue mRNA Expression of Fibroblast Growth Factor-21 After Cardiac Surgery: Possible Role in Postoperative Inflammatory Response and Insulin Resistance

T. KOTULÁK¹, J. DRÁPALOVÁ², P. KOPECKÝ³, Z. LACINOVÁ², P. KRAMÁŘ¹, H. ŘÍHA¹, I. NETUKA⁴, J. MALÝ⁴, D. HOUSA⁵, J. BLÁHA³, Š. SVAČINA², M. HALUZÍK²

¹Department of Anesthesia and Resuscitation, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, ²Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic, ³Department of Anesthesia, Resuscitation and Intensive Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic, ⁴Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, ⁵Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Received December 6, 2010

Accepted April 7, 2011

On-line August 1, 2011

Summary

We studied the changes in serum fibroblast growth factor-21 (FGF-21) concentrations, its mRNA, and protein expression in skeletal muscle and adipose tissue of 15 patients undergoing cardiac surgery. Blood samples were obtained: prior to initiation of anesthesia, prior to the start of extracorporeal circulation, upon completion of the surgery, and 6, 24, 48, and 96 hours after the end of the surgery. Tissue sampling was performed at the start and end of surgery. The mean baseline serum FGF-21 concentration was 63.1 (43.03-113.95) pg/ml and it increased during surgery with peak 6 hours after its end [385.5 (274.55-761.65) pg/ml, $p < 0.001$], and returned to baseline value [41.4 (29.15-142.83) pg/ml] 96 hours after the end of the surgery. Serum glucose, insulin, CRP, IL-6, IL-8, MCP-1, and TNF-alpha concentrations significantly increased during the surgery. Baseline FGF-21 mRNA expression in skeletal muscle was higher than in both adipose tissue depots and it was not affected by the surgery. Epicardial fat FGF-21 mRNA increased after surgery. Muscle FGF-21 mRNA positively correlated with blood glucose levels at the end of the surgery. Our data suggest a possible role of FGF-21 in the regulation of glucose metabolism and insulin sensitivity in surgery-related stress.

Key words

Fibroblast growth factor-21 • Adipose tissue • Skeletal muscle • Cardiac surgery • Insulin resistance

Corresponding author

Martin Haluzik, Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University, U Nemocnice 1, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Fax: +420-224919780. E-mail: mhalu@lf1.cuni.cz

Introduction

Both experimental and clinical studies have suggested that fibroblast growth factor-21 (FGF-21) plays a role in the regulation of lipid and glucose metabolism and energy homeostasis (Kharitonov *et al.* 2005, Kharitonov and Shanafelt 2008). FGF-21 administration stimulated glucose uptake in mouse adipocytes and in cultures of human adipocytes (Kharitonov *et al.* 2005). Subcutaneous injection of FGF-21 improved blood glucose and lipid levels in obese mice (Kharitonov *et al.* 2005). Long-term administration of FGF-21 to diabetic rhesus monkeys decreased plasma glucose, triglycerides, insulin, and

glucagon levels (Kharitonov *et al.* 2007).

According to previous studies, FGF-21 is expressed predominantly in the liver and to a lesser extent in fat (Kharitonov *et al.* 2005, Mraz *et al.* 2009, Nishimura *et al.* 2000). In mice, the liver expression of FGF-21 is tightly regulated in response to nutritional status. It is increased by starvation and a ketogenic state and decreased by feeding (Badman *et al.* 2007, Inagaki *et al.* 2005, Lundasen *et al.* 2007). In humans, long-term fasting increased FGF-21 concentrations while a ketogenic diet did not (Galman *et al.* 2008). Increased FGF-21 levels were found in patients with type 2 diabetes mellitus and/or obesity relative to healthy subjects, and this was further increased by a short-term very low calorie diet (Mraz *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2008). Elevated FGF-21 levels were also independently associated with increased risk of metabolic syndrome (Zhang *et al.* 2008).

In contrast to subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus, patients with decreased body fat content, such as chronically malnourished patients with anorexia nervosa, were characterized by significantly lower serum concentrations of FGF-21 relative to healthy age-matched controls in one study (Dostálová *et al.* 2008), while in another study FGF-21 levels in anorexia nervosa patients were unchanged compared with healthy controls (Fazeli *et al.* 2010).

Critically ill patients represent another patient population that suffers from insulin resistance and hyperglycemia in a similar manner to those with type 2 diabetes (Van den Berghe 2002). Recent studies indicated the beneficial effect of improved glucose control after continuous intravenous insulin treatment, yet an optimal glucose range target is still unclear and differs in various types of patients (Blaha *et al.* 2009, Van den Berghe *et al.* 2001, Finfer *et al.* 2009). Although the cause of insulin resistance in critically ill patients differs from the cause in patients with type 2 diabetes mellitus, common mechanisms still exist including the development of liver insulin resistance and overproduction of proinflammatory factors by adipose tissue (Kremen *et al.* 2006, Mazurek *et al.* 2003). Since it has been suggested that FGF-21 is a possible regulator of insulin sensitivity and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus, we hypothesized that it also may play a role in the metabolic response in critically ill patients. To this end, we measured epicardial adipose tissue, subcutaneous adipose tissue, and skeletal muscle mRNA expression of FGF-21 in patients undergoing elective cardiac surgery and

studied the dynamics of its serum concentration changes both during and after the surgery.

Methods

Study subjects

This study included 15 male patients who underwent aorto-coronary bypass surgery with extracorporeal circulation. All of the patients participating in the study had arterial hypertension, ischemic heart disease, and BMI ≥ 25 . None of the patients had diagnosis of diabetes mellitus or suffered from acute or chronic kidney injury, malignancy, thyroid disease, or acute infection. Seven patients had hyperlipidemia treated by atorvastatin (five patients) or fluvastatin (two patients), respectively. None of the study subject was treated by metformin or fibrates. **We used ATP panel III criteria for diagnosis of metabolic syndrome.**

All of the patients ate the last meal at 6 PM on the day before the surgery. The surgery was performed after an overnight fasting and it was started between 7-8 AM in all subjects. The average duration of surgery was 252 ± 31 minutes.

Three of the patients received infusion of dobutamine and norepinephrine during and after surgery with maximal dose $7 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ and $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, respectively with treatment duration from 14 to 31 hours. Glucose infusion was not administered in any of the patient.

All participants signed written informed consent prior to enrollment in the study. The study was approved by the Human Ethical Review Committee of the Thomayer University Hospital and Institute for Clinical and Experimental Medicine, Czech Republic and was performed in accordance with the guidelines proposed in the Declaration of Helsinki.

Anthropometric examination, blood and tissue sampling

Anthropometric examination of the patients was performed at basal state one day prior to the surgery. All subjects were measured and weighted in light clothes without shoes using standardized scales and BMI was calculated (weight (kg) / height (m)²). Body surface area was calculated using the DuBois and DuBois formula that is routinely used in cardiac surgery patients. Waist circumference was measured by locating upper hip bone and placing horizontal tape measure. All anthropometric measurements were done in a standardized way by the

same study nurse.

Blood samples for hormonal measurement were taken prior to initiation of anesthesia (baseline), prior to the start of extracorporeal circulation, upon completion of the surgery, and 6, 24, 48, and 96 hours after the end of the surgery. Serum was obtained by centrifugation and the samples were subsequently stored in aliquots at -80°C until further analysis.

Samples of subcutaneous (thoracic region), visceral (epicardial) adipose tissue, and skeletal muscle (intercostal muscles) for mRNA and protein expression analysis were taken at the start and prior to the end of surgery. All of the samples (both at the start and at the end of surgery) were taken from approximately the same location in all patients. The samples were obtained from tissue that had not been previously traumatized mechanically or by cauterization in order to avoid the interference of local damage with tissue parameters. Tissue samples were collected to 1 ml of RNeasy lysis reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at -80°C until further analysis. The average time between the initial and final sampling at the end of the surgery was 244 ± 22 minutes.

Glucose control protocol and insulin administration

Undiluted arterial blood for measurement of blood glucose (BG) was drawn from an arterial line inserted for routine monitoring procedures. Whole BG was analyzed by a standard point of care testing device (Abbott Architect CI 8200, Abbott Diagnostics, Maidenhead, U.K.) every 3 hours.

No glucose infusion was administered in any of the patients during the study. No insulin was administered during the surgery. Insulin administration was initiated in postoperative intensive care unit only in patients with blood glucose exceeding 9.9 mmol/l after surgery. Insulin (Actrapid HM, Novo Nordisk, Baegsvard, Denmark) was given via central venous line as a continuous infusion. A standard concentration of 50 IU of insulin in 50 ml of 0.9 % NaCl was used. Target glucose range was $6.0\text{--}9.9\text{ mmol/l}$. Normal oral food intake was started in 18 to 24 hours after surgery in all study subjects.

Hormonal and biochemical assays

Plasma samples for measurement of FGF-21 concentrations were diluted with Dilution Buffer 1:1 and measured using a commercial ELISA kit (BioVendor, Modrice, Czech Republic) which is based on the

polyclonal anti-human FGF-21 antibody and biotin-labelled polyclonal anti-human FGF-21 antibody. Diluted sera, standards, and quality controls were prepared according to the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 450 nm. A standard curve was constructed by plotting absorbance values against concentrations of standards (8 standards with concentration range $15\text{--}1920\text{ pg/ml}$), and concentrations of samples were calculated using this standard curve. Sensitivity of the kit was 7.0 pg/ml and the intra- and inter-assay variability of the kit was $3.0\text{--}4.1\%$ and 10% , respectively. Serum C-reactive protein (CRP) levels were measured by high sensitive assay (Bender Medsystems, Vienna, Austria) with a sensitivity of 3 pg/ml . The intra- and inter-assay variability of the kit was less than 5% and less than 10% , respectively. Serum insulin concentrations were measured by commercial RIA kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France) with a sensitivity of $2.0\text{ }\mu\text{IU/ml}$. The intra- and inter-assay variability of the kits was less than 5% and less than 10% , respectively.

Serum concentrations of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were measured using Human serum adipokine LINCoplex Kit (panel B) on a Luminex200 instrument (Linco Research, St. Charles, MO, USA). Sensitivity was 1.6 pg/ml for IL-6, 0.2 pg/ml for IL-8, 0.14 pg/ml for TNF-alpha, and 0.14 pg/ml for MCP-1, respectively. Intra- and inter-assay variability of the kits was 7.8% and 18% for IL-6, 7.9% and 15% for IL-8, 7.8% and 16% for TNF-alpha, 7.8% and 16% for MCP-1, respectively.

Determination of mRNA expression

Samples were homogenized on a MagNA Lyser Instrument using MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and QIAzol Lysis Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Total RNA was extracted from the homogenized sample of subcutaneous and epicardial adipose tissue using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Total RNA from the homogenized skeletal muscle was extracted on MagNA Pure instrument using MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The RNA concentration was determined from absorbance at 260 nm on a BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). All samples had a $260/280\text{ nm}$ absorbance ratio of 1.74 ± 0.016 . The integrity of the RNA was checked by

visualization of 18S and 28S ribosomal bands on 1% agarose gel with ethidium bromide. Reverse transcription was performed using 0.25 µg of total RNA to synthesize the first strand cDNA using the random primers as per the instructions of the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Measurements of FGF-21 gene expression were performed on an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using TaqMan® Universal PCR Master Mix, NO AmpErase® UNG and specific TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and nuclease-free water (Fermentas Life Science, Vilnius, Lithuania). Controls with no template cDNA were performed with each assay and all samples were run in duplicate at a minimum. The increase in fluorescence was measured in real time and threshold cycle (C_T) values were obtained. To compensate for variations in the amount of RNA used and the variable efficiency of reverse transcription, the target gene C_t number was normalized to the endogenous reference beta-2-microglobulin (B2M) and the formula $2^{-\Delta C_t}$ was used to calculate relative gene expression.

Protein isolation and Western blot analysis

Approximately 80-120 mg subcutaneous adipose and muscle tissue was homogenized in ice-cold homogenization buffer [150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 25 mM benzamide, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)]. The homogenate was centrifuged at 3,000 × g for 15 min at 4 °C, the fat cake was then discarded and the homogenate was centrifuged again at 14,000 × g for 20 min at 4 °C. The supernatant was stored in aliquots at -80 °C. Total protein concentration of each sample was estimated by Bradford dye assay method using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's protocol using BSA as a standard.

For Western blot analysis, 70 µg of protein lysate were separated by 12.5% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) transfer membrane (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) in a semidry blotting apparatus. The membrane was blocked overnight at 4 °C with 12.5% (w/v) nonfat milk, washed 3 times in PBST buffer, and analyzed with primary goat antibodies against human FGF-21 (BioVendor, Modrice, Czech Republic) at a final concentration of 0.2 µg/ml. The membrane was then

washed in PBST buffer and incubated for 1 h at room temperature with Polyclonal rabbit antigoat antibody with horseradish peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark) at a 1:2000 dilution in PBST buffer. The same procedure was used for a control protein alpha-tubulin. Primary monoclonal antibody against alpha-tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) at dilution 1:200 and then secondary antibody ImmunoPure Goat anti-mouse IgG, (H+L), peroxidase conjugated (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) at dilution 1:5000 was used. Detection of membrane antibody binding was evaluated by enhanced chemiluminescence ECL Western Blotting Substrate (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). Signals were visualized and evaluated on a G:Box iChemi XT Bio instrument (Syngene, Cambridge, U.K.) and then analyzed and the quantifications of bands was calculated using GeneTools Software (Syngene, Cambridge, U.K.). Molecular weight of FGF-21 bands is 20.2 kDa and alpha-tubulin bands is 55 kDa.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed on SigmaStat software (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) and Matlab (Mathworks, Natick, Massachusetts, U.S.A). The results are expressed as Median and Interquartile range or Mean ± standard error of mean (SEM). Prior to analysis, all continuous variables were assessed for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Changes of hormonal levels, gene and protein expression during perioperative and postoperative state, respectively, were evaluated using Paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test, according to the normality of data. Changes of hormonal levels were adjusted for multiple comparisons by Bonferroni correction. Differences between the groups with or without insulin treatment and differences in protein expression were evaluated using unpaired T-test or Mann-Whitney Rank Sum Test, according to the normality of data. Area under the curve and unpaired T-test was used to calculate the differences in change of serum FGF-21 levels between the groups with or without insulin treatment. Correlations were evaluated using the Spearman Correlation test or Pearson Correlation test, according to the normality of data. In all statistical tests, p values <0.05 or corrected p values < 0.00625 were considered significant. Multiple regressions for data adjustment to FGF-21 levels were done.

Table 1. Clinical characteristics of the cardiac surgery patients subdivided into group with insulin treatment (IT subgroup) and group without insulin treatment (NT subgroup). Values are Median and Interquartile range or Mean \pm SEM with n=15/group. Statistical significance is from un-paired t-test or Mann-Whitney Rank Sum Test according to the normality of data distribution. NS, not significant; SS, start of surgery; T0, prior to initiation of anesthesia; T3, 6 hours after the end of the surgery; T5, 48 hours after the end of the surgery; FGF-21 AUC, area under the curve of FGF-21 serum concentration

	All subjects	IT subgroup	NT subgroup	IT vs NT
Clinical characteristics:				
No. of subjects	15	8	7	NS
Age (yr)	66 \pm 2	68 \pm 2	63 \pm 3	NS
Body mass index (kg/m ²)	29.22 \pm 0.79	27.81 \pm 0.67	30.63 \pm 1.29	NS
Body surface area (m ²)	2.02 \pm 0.04	1.96 \pm 0.05	2.08 \pm 0.07	NS
HOMA index at T0	4.31 \pm 0.71	4.39 \pm 1.04	4.24 \pm 1.07	NS
Skeletal muscle FGF-21 gene expression at SS	3.08 ⁻⁴ (0.93 ⁻⁴ - 5.45 ⁻⁴)	4.26 ⁻⁴ (3.13 ⁻⁴ - 9.52 ⁻⁴)	0.73 ⁻⁴ (0.47 ⁻⁴ - 2.94 ⁻⁴)	p = 0.040
Serum concentrations:				
HbA1c at T0 (%)	4.07 \pm 0.10	4.13 \pm 0.17	4.01 \pm 0.10	NS
Glucose at T0 (mmol/l)	6.1 \pm 0.29	6.344 \pm 0.49	5.763 \pm 0.282	NS
Glucose at T3 (mmol/l)	8.5 \pm 0.41	9.5 \pm 0.62	7.5 \pm 0.235	p = 0.005
Glucose at T5 (mmol/l)	6.3 \pm 0.24	5.8 \pm 0.29	6.85 \pm 0.303	p = 0.027
CRP at T2 (mg/l)	1.4 \pm 0.52	0.4 \pm 0.11	2.5 \pm 0.97	p = 0.009
FGF-21 at T5 (pg/ml)	130 (51 - 231)	222 (120 - 581)	66 (35 - 114)	p = 0.038
FGF-21 AUC	24673 \pm 4599	34450 \pm 6731	13498 \pm 2518	p = 0.016

Results

Clinical characteristics of the patients

Table 1 shows the clinical characteristics of the entire group of patients and the subgroups with or without insulin administration after the surgery. All patients were males with mean waist circumference 103 \pm 3.4 cm, mean baseline blood glucose 6.1 \pm 0.29 mmol/l, and mean glycated hemoglobin 4.07 \pm 0.10 %. All the statistically significant differences between insulin-treated group (IT subgroup) and group without insulin treatment (NT subgroup) are summarized in Table 1.

Serum glucose, hormonal, and cytokine concentrations

Serum FGF-21 concentration peaked 6 hours after the end of surgery, exhibiting a 6.2-fold median increase over baseline and returned to baseline level 96 hours after the end of surgery (Figure 1). Serum glucose levels peaked 6 hours after the end of the surgery and normalized 48 hours after the end of the surgery (Figure 1). Serum insulin concentration increased 2.4-fold median with the peak occurring 48 hours after the end of the surgery and remained significantly elevated for 96 hours after the end of the surgery (Figure 1). Serum

CRP concentrations peaked 24 hours after the end of the surgery, remained elevated by 24.5-fold median for 48 hours after the surgery, returning to near normal values 96 hours after the end of the surgery (Figure 1). IL-6, IL-8, TNF- α and MCP-1 concentrations peaked 6 hours after the end of the surgery, exhibiting a 55.6-, 6.7-, 1.5-, and 1.9-fold median increase over baseline, respectively (Figure 2).

To further investigate the influence of insulin administration on serum FGF-21 levels we subdivided our patient population into two subgroups: with (n=8) or without (n=7) exogenous insulin administration. At baseline no significant differences in blood glucose, serum insulin, and FGF-21 levels were found between the insulin-treated vs. insulin-untreated group. Serum FGF-21 levels tended to be higher in the insulin treated vs. insulin-untreated subgroup throughout all time-points. A significantly higher FGF-21 level in insulin-treated relative to insulin untreated patients was found 48 hours after the end of surgery [222 (120-581) vs. 66 (35-114) pg/ml, p=0.038]. Area under the curve for FGF-21 was significantly higher in insulin-treated relative to insulin untreated patients (p=0.016) (Table 1).

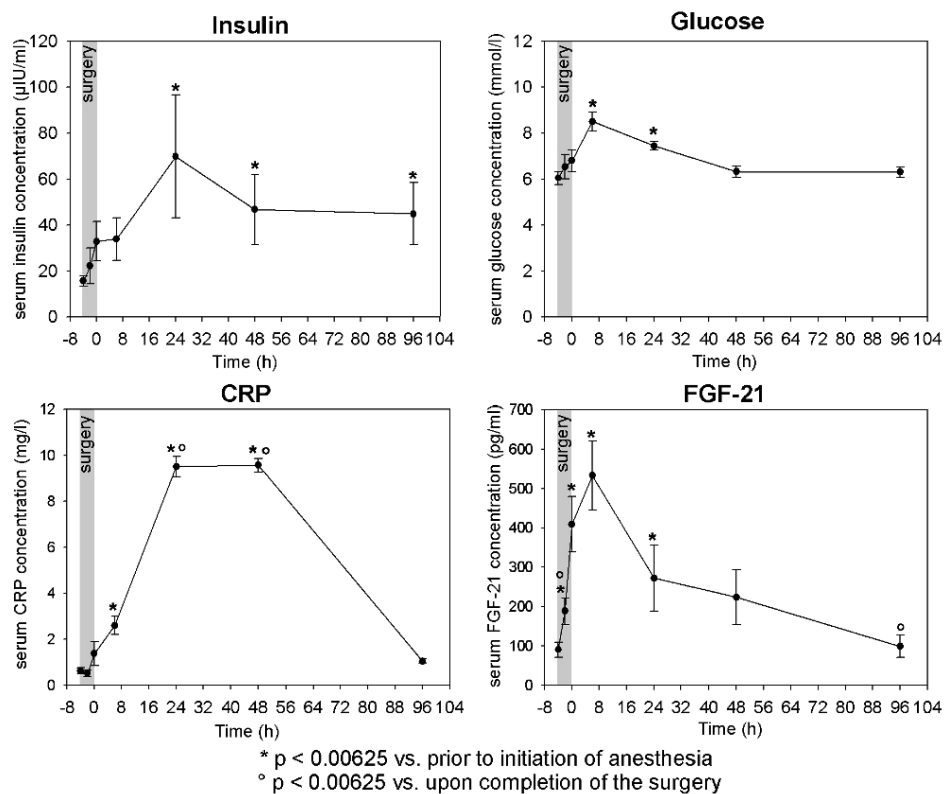


Fig. 1. Serum concentrations of insulin, glucose, CRP and FGF-21 in cardiac surgery patients prior to initiation of anesthesia, prior to the start of extracorporeal circulation, upon completion of the surgery, and 6, 24, 48, and 96 hours after the end of the surgery. Values are Mean \pm SEM with n=15/group. Statistical significance is from Paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test, according to the normality of data. P values were adjusted for multiple comparisons by Bonferroni correction: * indicates p<0.00625 vs. prior to initiation of anesthesia, ° indicates p<0.00625 vs. upon completion of the surgery.

Changes of mRNA expression of FGF-21 in adipose tissue and muscle

At the start of surgery, FGF-21 mRNA expression in skeletal muscle was higher relative to both subcutaneous and epicardial adipose tissue. No significant influence of the surgery was detected concerning skeletal muscle FGF-21 mRNA expression (Figure 3C). In contrast, the surgery induced a significant increase in FGF-21 mRNA expression in epicardial adipose tissue, whereas the surgery did not significantly change FGF-21 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue (Figure 3A, B).

Changes of FGF-21 protein expression

In skeletal muscle FGF-21 protein expression was 4.7-fold higher (p=0.014) than that of subcutaneous fat depot at the start of the surgery (Figure 3D).

Relationship of FGF-21 plasma levels and mRNA expression with anthropometric, biochemical, and hormonal parameters

No significant association between serum FGF-21 areas under the curve and any anthropometric or biochemical parameter was found. FGF-21 mRNA expression in skeletal muscle at the end of the surgery correlated positively with blood glucose level (r=0.678, p=0.007) at the end of the surgery.

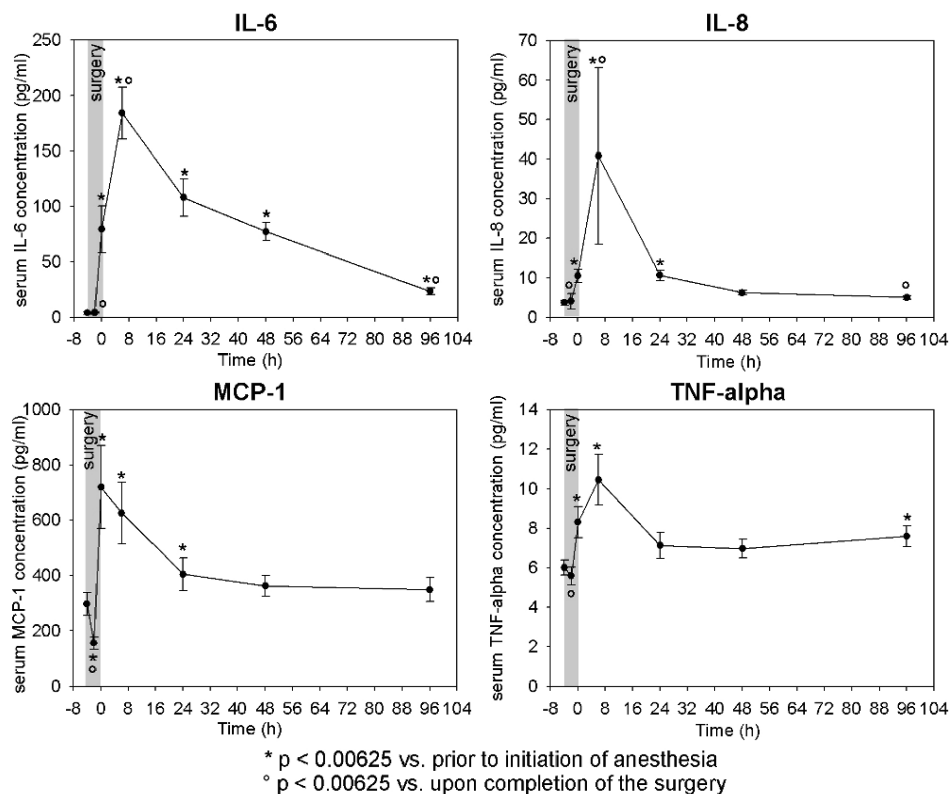


Fig. 2. Serum concentrations of IL-6, IL-8, MCP-1, and TNF-alpha in cardiac surgery patients prior to initiation of anesthesia, prior to the start of extracorporeal circulation, upon completion of the surgery, and 6, 24, 48, and 96 hours after the end of the surgery. Values are Mean \pm SEM with $n=15$ /group. Statistical significance is from Paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test, according to the normality of data. P values were adjusted for multiple comparisons by Bonferroni correction: * indicates $p < 0.00625$ vs. prior to initiation of anesthesia, ° indicates $p < 0.00625$ vs. upon completion of the surgery.

Discussion

Our study demonstrated that serum FGF-21 concentration and its gene expression in epicardial adipose tissue significantly increased after major elective cardiac surgery. Another important finding of this study is that baseline FGF-21 mRNA gene expression and protein expression in skeletal muscle was significantly higher than in subcutaneous and epicardial adipose tissue depots suggesting that skeletal muscle could also represent an important source of this factor.

Previous studies demonstrated that FGF-21 administration, or its overexpression, exerts a strong glucose and lipid lowering effect in rodents and primates

with obesity and type 2 diabetes mellitus (Kharitonov *et al.* 2005, Kharitonov and Shanafelt 2008, Kharitonov *et al.* 2007, Dostalova *et al.* 2008). Interestingly, human studies have demonstrated that patients with obesity, both with and without type 2 diabetes mellitus, are characterized by increased FGF-21 compared to healthy lean subjects (Mraz *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2008, Chen *et al.* 2008). FGF-21 administration also improved β -cell function in experimental studies (Wente *et al.* 2006).

In this study we demonstrate that an elective cardiac surgery that induces hyperglycemia, hyperinsulinemia and systemic inflammatory response is accompanied by marked early increase of circulating

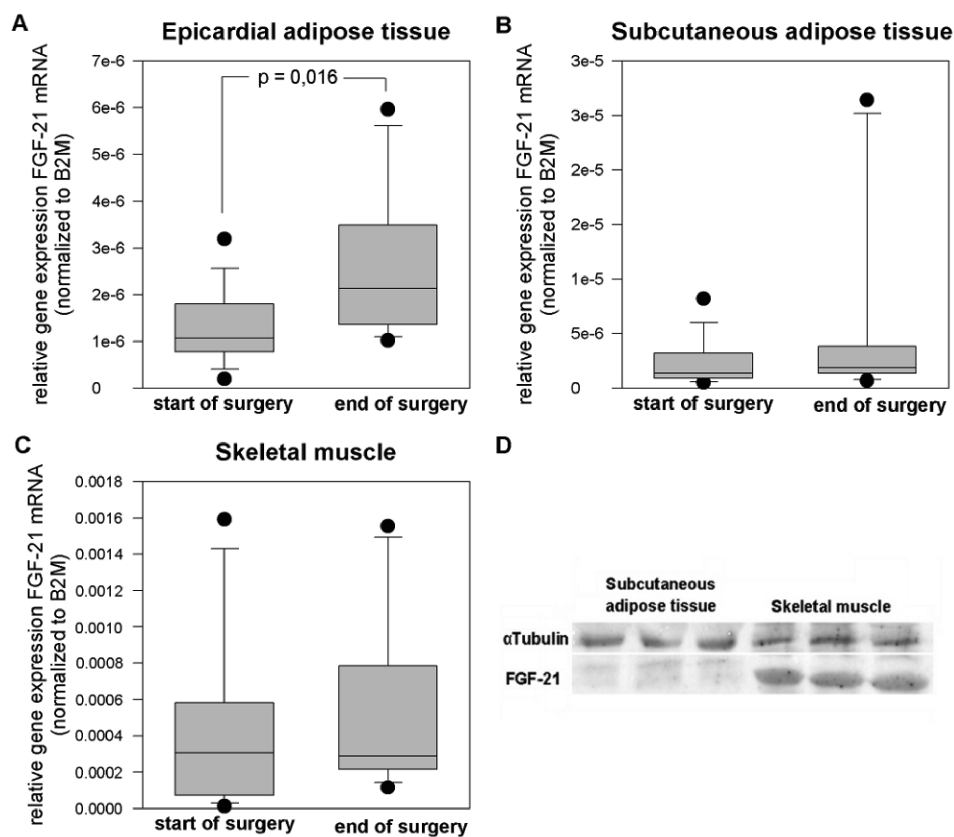


Fig. 3. Relative gene expression of FGF-21 mRNA in epicardial (A) and subcutaneous adipose tissue (B) and skeletal muscle (C). Samples were taken at the start and prior to the end of surgery. Values are Median and Interquartile range with $n=15$ /group. Statistical significance is from Paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test, according to the normality of data. FGF-21 Western blots of a representative subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle at the start of surgery (D). 70 μ g of protein lysate was used at each lane and alpha-tubulin was used as control. Each sample is at 3 aliquotes.

FGF-21 levels with very similar dynamics to that of insulin and TNF-alpha level. Interestingly, after subdividing our patients into an insulin-treated vs. insulin-untreated group we found significantly higher area under the curve of circulating FGF-21 levels in the former group. The muscle FGF-21 mRNA expression at the start of surgery was also significantly higher in the group that required insulin infusion during a postoperative course. Numerous factors induced by cardiac surgery could have contributed to the increase of FGF-21 levels. Our data showing more pronounced FGF-

21 increase after surgery in patients receiving insulin suggest that either insulin treatment itself or metabolic changes associated with the need of insulin treatment could have contributed to this difference. Furthermore, a positive association between glucose concentration at the end of surgery and muscle FGF-21 mRNA expression at the end of surgery suggests a possible contribution of these factors to the regulation of muscle FGF-21 mRNA expression.

The complexity of metabolic changes and inflammatory response after cardiac surgery did not allow

us to unequivocally determine which of the metabolic changes or proinflammatory factors were responsible for increased FGF-21 concentrations. In multiple regression analysis we were not able to identify any single factor independently associated with a change of circulating FGF-21 levels. Two recent studies albeit performed under different conditions described the presence of FGF-21 mRNA gene expression in skeletal muscle in response to insulin stimulation (Izumiya *et al.* 2008, Hojman *et al.* 2009). Here we confirm that human skeletal muscle expresses significant amount of both FGF-21 mRNA and FGF-21 protein. Interestingly, in contrast to circulating FGF-21 levels muscle FGF-21 mRNA expression was not acutely affected by cardiac surgery suggesting that other tissues were responsible for increased circulating FGF-21 levels.

In original animal studies, the liver was suggested as major producer of this factor while adipose tissue exhibited rather low FGF-21 mRNA expression (Nishimura *et al.* 2000). We have previously demonstrated that liver FGF-21 mRNA expression in patients with obesity is more than 100-fold higher compared to adipose tissue, supporting its important role in FGF-21 production in humans (Mraz *et al.* 2009). Here we directly compared FGF-21 mRNA and protein expression in fat and skeletal muscle tissues and show that muscle FGF-21 mRNA and protein expression is significantly higher relative to adipose tissue.

Epicardial adipose tissue has been previously identified as a source of inflammatory mediators under basal condition (Mazurek *et al.* 2003, Baker *et al.* 2006) and cardiac surgery increased mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in both epicardial and subcutaneous adipose tissue (Kremen *et al.* 2006). We demonstrated in this study that circulating FGF-21 levels and its mRNA expression in epicardial adipose tissue are markedly increased by cardiac surgery. It remains to be determined what is the role of increased production of FGF-21 in epicardial fat and whether it significantly

contributes to its higher systemic levels.

To date, very little information is available with respect to changes of FGF-21 in critical illness. The only study focused on this topic was performed by Johnson *et al.* (2009) in mice. In Johnson's study, the role of FGF-21 in cerulein-induced pancreatitis in control mice and transgenic mice with FGF-21 over-expression or FGF-21 knockout was explored. The authors demonstrated that acinar cell FGF-21 expression markedly increased during both cerulein-induced pancreatitis and following injury *in vitro*. The severity of cerulein-induced pancreatitis was decreased in transgenic FGF-21 overexpressing mice as demonstrated by decreased serum amylase and decreased pancreatic stellate cell activation. On the contrary, FGF-21 knockout mice had increased serum amylase and tissue damage. These experimental data suggest a possible importance of FGF-21 in experimental acute pancreatitis. Nevertheless, it is not known whether FGF-21 has any significance in critical illness of other etiology. Our data showing a marked increase in circulating FGF-21 levels during cardiac surgery indicate a possible importance for this factor also in postoperative response in humans. **Nevertheless, it should be noted that our study was performed on relatively low number of subjects and its descriptive nature does not allow us to demonstrate clearly the clinical relevance of our findings.** It needs to be further determined what factors are responsible for increased FGF-21 levels and what is the exact role for this factor under these conditions. Our data suggest that skeletal muscle may represent another important source of FGF-21 in humans.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by MZO VFN 2005 and Svv-2011-262503.

References

- BADMAN MK, PISSIOS P, KENNEDY AR, KOUKOS G, FLIER JS, MARATOS-FLIER E: Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 5: 426-437, 2007.
- BAKER AR, SILVA NF, QUINN DW, HARTE AL, PAGANO D, BONSER RS, KUMAR S, McTERNAN PG: Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 5: 1, 2006.

- BLAHA J, KOPECKY P, MATIAS M, HOVORKA R, KUNSTYR J, KOTULAK T, LIPS M, RUBES D, STRITESKY M, LINDNER J, SEMRAD M, HALUZIK M: Comparison of three protocols for tight glycemic control in cardiac surgery patients. *Diabetes Care* **32**: 757-761, 2009.
- CHEN WW, LI L, YANG GY, LI K, QI XY, ZHU W, TANG Y, LIU H, BODEN G: Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **116**: 65-68, 2008.
- DOSTÁLOVÁ I, KAVÁLKOVÁ P, HALUZÍKOVÁ D, LACINOVÁ Z, MRÁZ M, PAPEZOVÁ H, HALUZÍK M: Plasma concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 3627-3632, 2008.
- FAZELI PK, MISRA M, GOLDSTEIN M, MILLER KK, KLIBANSKI A: Fibroblast growth factor-21 may mediate growth hormone resistance in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **95**: 369-374, 2010.
- FINFER S, CHITTOCK DR, SU SY, BLAIR D, FOSTER D, DHINGRA V, BELLOMO R, COOK D, DODEK P, HENDERSON WR, HEBERT PC, HERITIER S, HEYLAND DK, MCARTHUR C, McDONALD E, MITCHELL I, MYBURGH JA, NORTON R, POTTER J, ROBINSON BG, RONCO JJ: Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med* **360**: 1283-1297, 2009.
- GALMAN C, LUNDASEN T, KHARITONENKOV A, BINA HA, ERIKSSON M, HAFSTROM I, DAHLIN M, AMARK P, ANGELIN B, RUDLING M: The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metab* **8**: 169-174, 2008.
- HOJMAN P, PEDERSEN M, NIELSEN AR, KROGH-MADSEN R, YFANTI C, AKERSTROM T, NIELSEN S, PEDERSEN BK: Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. *Diabetes* **58**: 2797-2801, 2009.
- INAGAKI T, CHOI M, MOSCHETTA A, PENG L, CUMMINS CL, McDONALD JG, LUO G, JONES SA, GOODWIN B, RICHARDSON JA, GERARD RD, REPA JJ, MANGELSDORF DJ, KLIEWER SA: Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* **2**: 217-225, 2005.
- IZUMIYA Y, BINA HA, OUCHI N, AKASAKI Y, KHARITONENKOV A, WALSH K: FGF21 is an Akt regulated myokine. *FEBS Lett* **582**: 3805-3810, 2008.
- JOHNSON CL, WESTON JY, CHADI SA, FAZIO EN, HUFF MW, KHARITONENKOV A, KOESTER A, PIN CL: Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* **137**: 1795-1804, 2009.
- KHARITONENKOV A, SHIYANOVA TL, KOESTER A, FORD AM, MICANOVIC R, GALBREATH EJ, SANDUSKY GE, HAMMOND LJ, MOYERS JS, OWENS RA, GROMADA J, BROZINICK JT, HAWKINS ED, WROBLEWSKI VJ, LI DS, MEHRBOD F, JASKUNAS SR, SHANAFELT AB: FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* **115**: 1627-1635, 2005.
- KHARITONENKOV A, WROBLEWSKI VJ, KOESTER A, CHEN YF, CLUTINGER CK, TIGNO XT, HANSEN BC, SHANAFELT AB, ETGEN GJ: The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* **148**: 774-781, 2007.
- KHARITONENKOV A, SHANAFELT AB: Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. *BioDrugs* **22**: 37-44, 2008.
- KREMEN J, DOLINKOVA M, KRAJICKOVA J, BLAHA J, ANDERLOVA K, LACINOVA Z, HALUZIKOVA D, BOSANSKA L, VOKURKA M, SVACINA S, HALUZIK M: Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 4620-4627, 2006.
- LUNDASEN T, HUNT MC, NILSSON LM, SANYAL S, ANGELIN B, ALEXSON SE, RUDLING M: PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem Biophys Res Commun* **360**: 437-440, 2007.
- MAZUREK T, ZHANG L, ZALEWSKI A, MANNION JD, DIEHL JT, ARAFAT H, SAROV-BLAT L, O'BRIEN S, KEIPER EA, JOHNSON AG, MARTIN J, GOLDSTEIN BJ, SHI Y: Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* **108**: 2460-2466, 2003.

-
- MRAZ M, BARTLOVA M, LACINOVA Z, MICHALSKY D, KASALICKY M, HALUZIKOVA D, MATOULEK M, DOSTALOVA I, HUMENANSKA V, HALUZIK M: Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* **71**: 369-375, 2009.
- NISHIMURA T, NAKATAKE Y, KONISHI M, ITOH N: Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta* **1492**: 203-206, 2000.
- VAN DEN BERGHE G, WOUTERS P, WEEKERS F, VERWAEST C, BRUYNINCKX F, SCHETZ M, VLASSELAERS D, FERDINANDE P, LAUWERS P, BOUILLON R: Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* **345**: 1359-1367, 2001.
- VAN DEN BERGHE G: Endocrinology in intensive care medicine: new insights and therapeutic consequences. *Verh K Acad Geneesk Belg* **64**: 167-187, 2002.
- WENTE W, EFANOV AM, BRENNER M, KHARITONENKOV A, KOSTER A, SANDUSKY GE, SEWING S, TREINIES I, ZITZER H, GROMADA J: Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes* **55**: 2470-2478, 2006.
- ZHANG X, YEUNG DC, KARPISEK M, STEJSKAL D, ZHOU ZG, LIU F, WONG RL, CHOW WS, TSO AW, LAM KS, XU A: Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* **57**: 1246-1253, 2008.
-

Cardiac Surgery Increases Serum Concentrations of Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein and its mRNA Expression in Circulating Monocytes but not in Adipose Tissue

Tomas Kotulak¹, Jana Drapalova², Michael Lips³, Zdena Lacinova², Petr Kramar¹, Hynek Riha¹, Ivan Netuka⁴, Jiri Maly⁴, Jan Blaha³, Jaroslav Lindner⁵, Stepan Svacina², Milos Mraz² and Martin Haluzik²

¹Department of Anesthesia and Resuscitation, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²3rd Department of Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic,

³Department of Anesthesia, Resuscitation and Intensive Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic,

⁴Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁵Department of Cardiovascular Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

Corresponding author:

Prof. Martin Haluzik, MD, DSc.

3rd Department of Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University

U Nemocnice 1

128 08, Prague 2

Czech Republic

PHONE +420-224962908 FAX: +420-224919780

E-mail: mhalu@lf1.cuni.cz

Short title: A- FABP in cardiac surgery patients

Summary

Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) is a novel adipokine involved in the regulation of lipid and glucose metabolism and inflammation. To evaluate its potential role in the development of postoperative hyperglycemia and insulin resistance we assessed A-FABP serum concentrations and mRNA expression in skeletal and myocardial muscle, subcutaneous and epicardial adipose tissue and peripheral monocytes in 11 diabetic and 20 age- and sex-matched non-diabetic patients undergoing elective cardiac surgery.

Baseline serum A-FABP did not differ between the groups (31.1 ± 5.1 vs. 25.9 ± 4.6 ng/ml, $p = 0.175$). Cardiac surgery markedly increased serum A-FABP in both groups with a rapid peak at the end of surgery followed by a gradual decrease to baseline values during the next 48 hours with no significant difference between the groups at any timepoint. These trends were analogous to postoperative excursions of plasma glucose, insulin and selected proinflammatory markers. Cardiac surgery increased A-FABP mRNA expression in peripheral monocytes, while no effect was observed in adipose tissue or muscle.

Our data suggest that circulating A-FABP might be involved in the development of acute perioperative stress response, insulin resistance and hyperglycemia of critically ill irrespectively of the presence of diabetes mellitus.

Key words: adipocyte fatty acid binding protein; adipose tissue; skeletal muscle; cardiac surgery; insulin resistance;

Introduction

Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) also known as FABP4, aP2 or adipocyte/macrophage FABP is a cytoplasmic protein found abundantly in adipose tissue (Hunt et al. 1986). A-FABP is predominantly expressed in adipocytes (Baxa et al. 1989) and macrophages (Boord et al. 2002). A-FABP was primarily described as a mostly cytosolic protein constituting 6% of total adipocyte cellular protein content and partially released into circulation. Experimental and clinical studies have suggested that A-FABP plays a role in the regulation of lipid and glucose metabolism, energy homeostasis and inflammation (Furuhashi et al. 2008, Hotamisligil et al. 1996, Uysal et al. 2000, Xu et al. 2006). In mice, increased production of both adipocyte and macrophage FABP contributes to metabolic deterioration (Furuhashi et al. 2008). Deletion of A-FABP in adipocytes

resulted in reduced expression of proinflammatory cytokines in macrophages, while its deletion in macrophages enhanced insulin signaling and glucose uptake in adipocytes (Furuhashi et al. 2008). A-FABP deficient mice with genetic or diet induced obesity were protected from insulin resistance, dyslipidemia and hyperglycemia (Hotamisligil et al. 1996, Uysal et al. 2000). In humans, the reduction of adipose tissue A-FABP expression due to a specific polymorphism of the aP2 gene resulted in lower serum triglyceride levels and significantly reduced the risk of coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus (Tuncman et al. 2008). Serum levels of A-FABP were closely associated with the presence and severity of coronary artery disease (Bao et al. 2011, Doi et al. 2011). In contrast, A-FABP levels in chronically malnourished patients with anorexia nervosa were unchanged and were not related to anthropometric or inflammatory parameters (Haluzikova et al. 2009). Serum A-FABP concentrations were significantly higher in females compared to males and were independently associated with waist-to-height ratio and glomerular filtration rate (Tonjes et al. 2012). In another study on 495 non-diabetic Chinese adults, elevated plasma concentrations of A-FABP predicted the development of metabolic syndrome in a 5-year follow-up (Xu et al. 2007).

A large number of clinical studies have documented the presence of hyperglycemia and insulin resistance in critically ill patients (Van den Berghe 2002) with a couple of recent trials indicating beneficial effects of improved glucose control after continuous intravenous insulin treatment on overall morbidity and mortality associated with critical illness. Conflicting data exist regarding optimal target glucose range in different types of patients (Van den Berghe et al. 2001, Finfer et al. 2009, Blaha et al. 2009). The etiopathogenesis of insulin resistance in critically ill patients differs in part from subjects with type 2 diabetes mellitus. Nevertheless, common mechanisms still exist including the development of liver insulin resistance and overproduction of proinflammatory factors by adipose tissue (Kremen et al. 2006, Mazurek et al. 2003). In a recent study on different experimental models with biologically active synthetic A-FABP inhibitor, the authors demonstrated its potential beneficial effects on insulin resistance, glucose control, circulating lipid levels and development of atherosclerosis (Furuhashi et al. 2007) suggesting its potential use in various patient populations suffering from insulin resistance, hyperglycemia and its consequences. We hypothesized that A-FABP may also play a role in the development of hyperglycemia and insulin resistance in patients undergoing elective cardiac surgery. To this end, we measured A-FABP mRNA expression in epicardial and subcutaneous adipose tissue and myocardial and skeletal muscle of patients undergoing elective cardiac surgery

and studied its serum changes both during and after the surgery. The secondary objective of our study was to analyze the influence of type 2 diabetes mellitus on serum A-FABP and its mRNA expression in critically ill cardiothoracic patients.

Methods

Study subjects

The study included 31 male patients who underwent elective cardiac surgery with extracorporeal circulation (coronary artery bypass grafting (CABG) – 23 patients, CABG and aortic valve replacement (AVR) – 4 patients, AVR alone – 1 patient, mitral valve replacement (MVR) – 2 patients and CABG and MVR – 1 patient). Average surgery time was 308 minutes. Eleven subjects had type 2 diabetes mellitus (T2DM) treated by metformin (2 patients), insulin (5 patients) or diet only (4 patients). All patients participating in the study had arterial hypertension, ischemic heart disease and body mass index (BMI) ≥ 25 . None of the patients had diagnosis or suffered from acute or chronic kidney disease, malignancy, thyroid disease, or acute infection. Thirteen patients had hyperlipidemia treated by atorvastatin (10 patients), rosuvastatin (1 patient) or fluvastatin (2 patients), respectively.

All patients ate the last meal at 6 PM on the day before the surgery. The surgery was performed after an overnight fasting and was started between 7-8 AM in all subjects.

Ten patients received infusion of dobutamine and norepinephrine during and after surgery with maximum dose of 7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, respectively with treatment duration from 8 to 33 hours. Glucose infusion was not administered in any of the patients.

All participants signed written informed consent prior to the enrollment into the study. The study was approved by the Human Ethical Review Board of the Thomayer University Hospital and Institute for Clinical and Experimental Medicine, Czech Republic and was performed in accordance with the guidelines proposed in the Declaration of Helsinki.

Glucose control protocol and insulin administration

Undiluted arterial blood for measurement of blood glucose (BG) was drawn from an arterial line inserted for routine monitoring procedures. BG was analyzed by a standard point-of-care testing device (Abbott Architect CI 8200, Abbott Diagnostics, Maidenhead, U.K.) every 3 hours.

No glucose infusion was administered in any of the patients during the study. No insulin was administered during the operation. Insulin administration was initiated in postoperative intensive care unit only in patients with blood glucose exceeding 9.9 mmol/l (in 17 patients altogether – 11 with and 6 without T2DM). Human rapid-acting insulin (Actrapid HM, Novo Nordisk, Baegsvard, Denmark) was given via central venous line as a continuous infusion. A standard concentration of 50 IU of insulin in 50 ml of 0.9% NaCl was used. Target glucose range was 6.0 – 9.9 mmol/l. Normal oral food intake was started in 18 to 24 hours after the operation in all study subjects.

Anthropometric examination, blood and tissue sampling

Anthropometric examination of study subjects was performed at baseline one day prior to the operation. All subjects were measured and weighted in light clothes without shoes using standardized scales and BMI was calculated (weight (kg)/height (m)²). Body surface area was calculated using the DuBois and DuBois formula. Waist circumference was measured. The same study nurse did all anthropometric measurements in a standardized way. Blood samples for hormonal measurements were taken prior to initiation of anesthesia (baseline), prior to the start of extracorporeal circulation, upon completion of the operation and 6, 24, 48, and 96 hours after the end of the operation. Serum was obtained by centrifugation and the samples were subsequently stored in aliquots at -80 °C until further analysis. In a subgroup of 11 patients blood samples for monocyte isolation were obtained in Na-EDTA anticoagulant at the start and upon completion of the surgery and 24 hours after the end of the surgery.

Samples of subcutaneous (thoracic region) and visceral (epicardial) adipose tissue, skeletal muscle (intercostal muscles) and myocardial muscle (right atrium) for mRNA expression analysis were taken at the start and prior to the end of the surgery from approximately the same location in all patients. The samples were obtained from tissues that had not been previously traumatized mechanically or by cauterization in order to avoid the interference of local damage with tissue parameters. Tissue samples were collected to 1ml of RNAlater reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at -80 °C until further analysis. The average time between the initial and final sampling at the end of the operation was 308 minutes.

Hormonal and biochemical assays

Serum levels of A-FABP were measured using a commercial ELISA kit (BioVendor, Modrice, Czech Republic) with a sensitivity of 0.1 ng/ml. The intra- and inter-assay variability of the kit was less than 7%. Serum C-reactive protein (CRP) levels were measured by high sensitive assay (Bender Medsystems, Vienna, Austria) with a sensitivity of 3 pg/ml. The intra- and inter-assay variability of the kit was less than 5% and less than 10%, respectively. Serum insulin concentrations were measured by a commercial RIA kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France) with a sensitivity of 2.0 μ IU/ml and the intra- and inter-assay variability of the kit was less than 5% and less than 10%, respectively.

Serum concentrations of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were measured using Human serum adipokine LINCOplex Kit (panel B) on a Luminex200 instrument (Linco Research, St. Charles, MO, USA). Sensitivity was 1.6 pg/ml for IL-6, 0.2 pg/ml for IL-8 and 0.14 pg/ml for MCP-1, respectively. Intra- and inter-assay variability of the kits was 7.8% and 18% for IL-6, 7.9% and 15% for IL-8, 7.8% and 16% for MCP-1, respectively.

Monocyte separation from whole blood

Peripheral blood leukocytes were obtained from blood samples using Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences AB, Sweden). For each sample, 5 ml of blood were slowly added into the Falcon tube with 3.5 ml of Ficoll-PaqueTMPlus and the tube was centrifuged immediately. After centrifugation, leukocyte agglomerates were placed in a tube containing 10 ml of PBS (0.01 M PBS), pH 7.4 and centrifuged again, the supernatant was discarded, and the cell pellet was dissolved in PBS. After centrifugation the supernatant was discarded and the pellet was dissolved in DEGAS buffer (0.01 M PBS with 0.5 M EDTA, pH 8 and 1% BSA). Magnetic activated cell sorting technique (MiniMacs Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) using microbeads coated with CD14 antibody (MACS CD14 MicroBeads; Miltenyi Biotec) was used to isolate monocytes from cell pellet.

Determination of A-FABP mRNA expression

Tissue samples were homogenized on a MagNA Lyser Instrument using MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and QIAzol Lysis Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Total RNA was extracted from the homogenized sample of subcutaneous and epicardial adipose tissue using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit

(Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Total RNA from the homogenized skeletal muscle and isolated monocytes was extracted on MagNA Pure instrument using MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). RNA concentration was determined from absorbance at 260 nm on a BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The integrity of the RNA was checked by visualization of 18S and 28S ribosomal bands on 1 % agarose gel with ethidium bromide. Reverse transcription was performed using 0.25µg of total RNA to synthesize the first strand cDNA using the random primers as per the instructions of the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Measurements of A-FABP gene expression were performed on an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using TaqMan® Universal PCR Master Mix, NO AmpErase® UNG and specific TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and nuclease-free water (Fermentas Life Science, Vilnius, Lithuania). Controls with no template cDNA were performed with each assay and all samples were run in duplicate at a minimum. The increase in fluorescence was measured in real time and threshold cycle (CT) values were obtained. To compensate for variations in the amount of RNA used and the variable efficiency of reverse transcription, the target gene Ct number was normalized to the endogenous control beta-2-microglobulin (B2M) or LRP10 and the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to calculate relative gene expression.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed on SigmaStat software (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). The results are expressed as median (interquartile range) or mean \pm standard error of the mean (SEM). Normality of all data was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test.

Changes of hormonal levels during perioperative and postoperative state were evaluated using one-way repeated measure analysis of variance (RM ANOVA) and multiple comparisons versus control group test – Dunnett's method. Differences in gene expression between different tissues during operation were evaluated using one-way RM ANOVA and all pairwise multiple comparison procedures – Fisher LSD method. Differences between diabetic and non-diabetic subjects were evaluated using unpaired t-test or Mann-Whitney rank sum test, according to the normality of data. Correlations were analyzed using Spearman's or Pearson's correlation test, according to the normality of data. In all statistical tests p values <0.05 were considered significant.

Results

Clinical characteristics of study participants

Clinical characteristics of study subjects are shown in Table 1. There were no differences between diabetic and non-diabetic patients with respect to age, body mass index (BMI), body surface area (BSA), lipid profile and BNP (brain natriuretic peptide). Diabetic subjects showed higher levels of baseline glucose, insulin, HOMA index and glycated hemoglobin, while their hsCRP values were slightly, but significantly, lower. Baseline A-FABP levels tended to be higher in patients with diabetes, although the difference did not reach statistical significance.

Serum glucose, hormonal and cytokine concentrations during and after surgery.

In both study groups serum A-FABP concentrations during and after the surgical procedure followed the same pattern, peaking at the end of the surgery and returning to baseline levels 24 to 48 hours after the end of the procedure (Figure 1). No significant difference in A-FABP area under the curve (AUC) between the groups or its concentrations throughout the study period could be seen, although the maximum increase tended to be higher in the T2DM group (4.6-fold vs. 4.0 fold, $p = 0.078$). Serum glucose levels culminated 6 hours after the end of the surgery and normalized 48 hours thereafter with no difference between both groups except for the values at baseline and prior to the start of extracorporeal circulation, which were higher in diabetic subjects (Figure 1). Serum insulin concentrations started to rise in both T2DM and nonT2DM subjects already during the operation reaching their peaks at 8 to 16 hours after the start of the procedure and remaining significantly elevated for almost the whole study period. The increase was more pronounced in subjects with diabetes mellitus (Figure 1). Serum CRP concentrations peaked in both groups at 24 to 48 hours after the end of the surgery and returned to near normal values towards the end of the study period, while IL-6, IL-8 and MCP-1 reached their maximum levels immediately after the end of the surgical procedure. Again, no significant difference could be seen between T2DM and nonT2DM subjects at any of the studied timepoints (Figure 2).

A-FABP mRNA expression in adipose tissue, muscle and peripheral monocytes

No significant influence of the performed surgery on A-FABP mRNA expression was detected in either of the studied adipose or muscle tissues (Figure 3). A-FABP mRNA

expression in epicardial adipose tissue was significantly lower than in subcutaneous adipose tissue both at the start and the end of the surgery, while it did not differ between skeletal and myocardial muscle at any of the studied timepoints (Figure 3). In peripheral monocytes A-FABP mRNA expression showed a 4.9-fold increase at the end of the surgery compared to baseline ($p < 0.05$) followed by a significant decrease 24 hours after the end of the surgery (Figure 4).

Relationship of A-FABP plasma levels and mRNA expression with anthropometric, biochemical, and hormonal parameters

In the whole study population serum A-FABP area under the curve correlated positively with baseline HbA1c ($R = 0.511$; $p = 0.006$) and IL-8 area under the curve ($R = 0.701$; $p < 0.001$). A-FABP mRNA expression in subcutaneous adipose tissue at the start of the surgery correlated positively with age ($R = 0.417$; $p = 0.025$) and negatively with BSA ($R = -0.434$; $p = 0.017$) and HOMA index ($R = -0.425$; $p = 0.0305$). In epicardial adipose tissue A-FABP mRNA expression showed positive correlation with HDL cholesterol ($R = 0.55$; $p = 0.0014$), while correlating negatively only with BSA ($R = -0.362$; $p = 0.046$). A-FABP mRNA expression in peripheral monocytes correlated positively with A-FABP serum concentrations ($R = 0.625$; $p < 0.001$).

Discussion

Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) is a recently introduced fat-derived protein involved in metabolic regulations, low-grade inflammation and the development of atherosclerosis. In the present study we show that its systemic levels and mRNA expression in circulating monocytes, albeit not in adipose or muscle tissue, are significantly increased by major cardiac surgery along with parameters of insulin resistance and systemic inflammation suggesting a possible role of A-FABP in the development of perioperative insulin resistance and hyperglycemia of critically ill.

A growing number of epidemiological studies have demonstrated a positive relationship of A-FABP with metabolic derangements associated with increased adiposity in humans. Several cross-sectional studies have shown a positive correlation between circulating A-FABP and components of metabolic syndrome including obesity, insulin resistance and dyslipidemia (Tonjes et al. 2012, Xu et al. 2006, Cabré et al. 2008). In a recent prospective trial by Tso et al elevated A-FABP levels predicted the development of type 2 diabetes

mellitus independently of obesity and insulin resistance during a 10-year follow-up (Tso et al. 2007). Moreover, serum A-FABP levels were shown to be increased in patients with coronary artery disease (CAD) verified by coronary angiography (Doi et al. 2011) and were independently associated with cardiovascular morbidity and mortality in another trial on subjects with CAD (Eynatten et al. 2012). In our study serum A-FABP reached relatively higher baseline levels in both groups as compared to previously published data (Doi et al. 2011). Interestingly, no significant difference between diabetic and non-diabetic individuals could be detected. These findings could most probably be explained by a high prevalence of other components of metabolic syndrome (obesity, dyslipidemia) and by the presence of ischemic heart disease in most of the subjects of both study groups.

Increased production of proinflammatory cytokines and adipokines is a well-established mechanism leading to the development of insulin resistance and hyperglycemia in patients undergoing major cardiac surgery (Kremen et al. 2006, Mazurek et al. 2003, Kotulak et al. 2011). Despite its potentially important role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and other obesity-related disorders, minimum data are available about the production, secretion and function of A-FABP during critical illness or surgery-related stress response. Here we demonstrate that systemic A-FABP levels rapidly increase (4- to 5-fold) in response to surgical stress with a subsequent decrease to almost basal levels 24 hours after the procedure. This pattern shows a striking similarity to peri- and postoperative glycemic excursions and serum levels of proinflammatory cytokines assessed in the study (IL-6, IL-8, MCP-1) suggesting thus that circulating A-FABP might be an acute stress response protein as well as play a role in the development of perioperative insulin resistance and hyperglycemia of critically ill. Similarly to baseline levels, no difference could be observed in A-FABP concentrations between diabetic and non-diabetic subjects throughout the whole study period. This finding seems in line with the absence of difference in other studied factors between the 2 groups including blood glucose, insulin and proinflammatory cytokines indicating that metabolic control during and after the performed surgery reached comparable levels in both groups.

Epicardial adipose tissue has been previously identified as an important source of inflammatory mediators under basal conditions (Mazurek et al. 2003) and cardiac surgery increased mRNA expression of proinflammatory cytokines in both epicardial and subcutaneous adipose tissue (Kremen et al. 2006). In our previous study we demonstrated that circulating levels and epicardial adipose tissue mRNA expression of fibroblast growth factor 21 (FGF-21), which is another novel factor involved in metabolic regulations, were

markedly increased by cardiac surgery (Kotulak et al. 2011). In the present trial baseline mRNA expression of A-FABP was significantly higher in subcutaneous than in epicardial adipose tissue. This is in accordance with findings by Fisher et al who demonstrated that A-FABP mRNA and protein production is elevated in subcutaneous as compared to visceral adipose depot in both lean and obese subjects (Fisher et al. 2001). Surprisingly, no effect of cardiac surgery could be seen on mRNA expression of A-FABP in either of the studied adipose tissue pools. As circulating A-FABP levels peaked at the same time the second tissue sample was taken, these findings suggest that neither subcutaneous nor visceral (epicardial) adipose tissue is the primary source of elevated serum A-FABP during cardiac surgery and that, in contrast to e.g. heart-type fatty acid binding protein (H-FABP), another type of FABP which was shown to increase in response to operation-related injury to the heart muscle, A-FABP is not a significant marker of local tissue damage. This was further confirmed by the results of A-FABP mRNA expression in skeletal and heart muscle which was considerably lower than in adipose tissue and was also unaffected by the performed surgery.

Although originally A-FABP has been considered adipocyte specific, macrophages were shown to be other potentially important source of A-FABP. In experimental models on primary human monocytes and monocytic cell lines A-FABP mRNA expression became evident after stimulation with both natural and synthetic peroxisome-proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) agonists (Pelton et al. 1999). In macrophages lacking A-FABP (A-FABP $-/-$) significant reduction in the expression of several inflammatory cytokines was described (Makowski et al. 2005). Moreover, after exposition to modified lipoproteins A-FABP $-/-$ macrophages showed reduced inflammatory cytokine production and ability to accumulate cholesterol (Makowski et al. 2005). Apolipoprotein E (ApoE) deficient and A-FABP $-/-$ mice were protected against the development of atherosclerosis, while adipocyte A-FABP $+/+$, ApoE $-/-$ and macrophage A-FABP $-/-$ mice showed similar reduction on atherosclerosis compared to total A-FABP deficient mice (Makowski et al. 2001). In a human study on patients undergoing carotid endarterectomy, macrophage A-FABP mRNA expression was increased in unstable carotid plaques (Agardh et al. 2011). Another recent study on patients with rheumatoid arthritis demonstrated increased A-FABP expression in several types of immune cells including synovial macrophages and B-cells (Andrés Cerezo et al 2013). Taken together, experimental animal and human data strongly indicate a possible role of macrophage A-FABP in atherogenic processes and inflammation. In the present study we analyzed mRNA expression of A-FABP in

peripheral monocytes, which are considered circulating precursors of macrophages (Mraz et al. 2011). Strikingly, we found a substantial increase in A-FABP expression at the end of the procedure which practically normalized after 24 hours. This early peak followed by a relatively rapid normalization almost duplicates the peri- and postoperative excursions of serum A-FABP suggesting that peripheral monocytes might be one of the primary sources of increased circulating A-FABP under surgical stress. Moreover, peripheral monocytes have previously been shown to be important mediators of low-grade inflammation. Considering the role of A-FABP in the production of proinflammatory cytokines and activation of endoplasmic reticulum stress in macrophages (Erbay et al. 2009), up-regulation of A-FABP mRNA in monocytes might substantially increase their proinflammatory state, which in turn can potentially contribute to the development of surgery-related hyperglycemia and insulin resistance.

A recent experimental study demonstrated the existence of direct effects of A-FABP on cardiomyocytes resulting in acute inhibition of their contraction. The negative inotropic effect was dependent on A-FABP concentration (Lamounier-Zepter et al. 2009). Thus elevated levels of circulating or locally produced A-FABP might, at least theoretically, influence the development of heart dysfunction. To test this hypothesis we analyzed the relationship between circulating A-FABP and serum brain natriuretic peptide (BNP), a marker of heart failure. However, we were not able to find any significant relationship between circulating BNP and serum A-FABP in the whole cohort as well as in either of the subgroups. Further *in vivo* studies are needed to evaluate the possible influence of A-FABP on heart function in various patient populations.

We are aware of several limitations of our study. The relatively small number of study subjects and high interindividual variability of some of the measured parameters might have been a potential source of bias throughout the statistical analysis. Full-scale studies on larger populations with a more diverse spectrum of critical conditions involving also protein analysis of investigated tissues should be the aim of future research on this topic.

We have demonstrated that irrespectively of the presence of diabetes mellitus elective cardiac surgery induces significant increase in plasma A-FABP that corresponds with hyperglycemia, hyperinsulinemia and proinflammatory response. Peripheral monocytes, and not adipose tissue, seem to be one of the main contributors to this increase. Our data suggest that circulating A-FABP might be involved in acute perioperative stress response with a potential role in the development of perioperative insulin resistance and hyperglycemia of critically ill.

Acknowledgements: This work was supported by MHCR RVO-VFN 64165 and IGA NT13299-4 to MH .

References

AGARDH HE, FOLKERSEN L, EKSTRAND J, MARCUS D, SWEDENBORG J, HEDIN U, GABRIELSEN A, PAULSSON-BERNE G: Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine* 269: 200–210, 2011.

ANDRÉS CEREZO L, KUKLOVÁ M, HULEJOVÁ H, VERNEROVÁ Z, PEŠÁKOVÁ V, PECHA O, VEIGL D, HALUZÍK M, PAVELKA K, VENCOVSKÝ J, SENOLT L: The level of fatty acid-binding protein 4, a novel adipokine, is increased in rheumatoid arthritis and correlates with serum cholesterol levels. *Cytokine* 2013 May 25. [Epub ahead of print]

BAO Y, LU Z, ZHOU M, LI H, WANG Y, GAO M, WEI M, JIA W: Serum levels of adipocyte fatty acid binding protein are associated with the severity of coronary artery disease in chinese women. *PLoS One* 28: 19115, 2011.

BAXA CA, SHA RS, BUELT MK, SMITH AJ, MATARESE V, CHINANDER LL, BOUNDY KL, BERNLOHR DA: Human adipocyte lipid-binding protein purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry* 28: 8683-8690, 1989.

BLAHA J, KOPECKY P, MATIAS M, HOVORKA R, KUNSTYR J, KOTULAK T, LIPS M, RUBES D, STRITESKY M, LINDNER J, SEMRAD M, HALUZIK M: Comparison of three protocols for tight glycemic control in cardiac surgery patients. *Diabetes Care* 32: 757-761, 2009

BOORD JB, FAZIO S, LINTON MF: Cytoplasmic fatty acid binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* 13: 141-147, 2002.

CABRÉ A, LÁZARO I, GIRONA J, MANZANARES JM, MARIMÓN F, PLANA N, HERAS M, MASANA L: Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res.* 49: 1746-1751, 2008.

DOI M, MIYOSHI T, HIROHATA S, NAKAMURA K, USUI S, TAKEDA K, IWAMOTO M, KUSACHI S, KUSANO K, ITO H: Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly man. *Cardiovascular Diabetology* 10: 1475-2840, 2011.

ERBAY E, BABAIEV VR, MAYERS JR, MAKOWSKI L, CHARLES KN, SNITOW ME, FAZIO S, WIEST MM, WATKINS SM, LINTON MF, HOTAMISLIGIL GS: Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med* 15: 1383-1391, 2009

FINFER S, CHITTOCK DR, SU SY, BLAIR D, FOSTER D, DHINGRA V, BELLOMO R, COOK D, DODEK P, HENDERSON WR, HÉBERT PC, HERITIER S, HEYLAND DK, MCARTHUR C, MCDONALD E, MITCHELL I, MYBURGH JA, NORTON R, POTTER J, ROBINSON BG, RONCO JJ: Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med* 360 1283-1297, 2009

FISHER RM, ERIKSSON P, HOFFSTEDT J, HOTAMISLIGIL GS, THÖRNE A, RYDÉN M, HAMSTEN A, ARNER P: Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia* 44: 1268-1273, 2001.

FURUHASHI M, TUNCMAN G, GÖRGÜN CZ, MAKOWSKI L, ATSUMI G, VAILLANCOURT E, KONO K, BABAIEV VR, FAZIO S, LINTON MF, SULSKY R, ROBL JA, PARKER RA, HOTAMISLIGIL GS: Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*. 447 959–965, 2007

FURUHASHI M, FUCHO R, GÖRGÜN CZ, TUNCMAN G, CAO H, HOTAMISLIGIL GS: Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest* 118: 2640-2650, 2008.

HALUZÍKOVÁ D, DOSTÁLOVÁ I, KAVÁLKOVÁ P, ROUBÍČEK T, MRÁZ M, PAPEZOVÁ H, HALUZÍK M: Serum concentrations of adipocyte fatty acid binding protein in patients with anorexia nervosa. *Physiol Res* 58: 577-581, 2009.

HOTAMISLIGIL GS, JOHNSON RS, DISTEL RJ, ELLIS R, PAPAIOANNOU VE, SPIEGELMAN BM: Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274: 1377-1379, 1996

HUNT CR, RO JH, DOBSON DE, MIN HY, SPIEGELMAN BM: Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3786-3790, 1986

KOTULÁK T, DRÁPALOVÁ J, KOPECKÝ P, LACINOVÁ Z, KRAMÁŘ P, ŘÍHA H, NETUKA I, MALÝ J, HOUSA D, BLÁHA J, SVAČINA Š, HALUZÍK M: Increased Circulating and Epicardial Adipose Tissue mRNA Expression of Fibroblast Growth Factor-21 After Cardiac Surgery: Possible Role in Postoperative Inflammatory Response and Insulin Resistance. *Physiol Res* 60: 757-767, 2011.

KREMEN J, DOLINKOVA M, KRAJICKOVA J, BLAHA J, ANDERLOVA K, LACINOVA Z, HALUZIKOVA D, BOSANSKA L, VOKURKA M, SVACINA S, HALUZIK M: Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4620-4627, 2006.

LAMOUNIER-ZEPTER V, LOOK C, ALVAREZ J, CHRIST T, RAVENS U, SCHUNCK WH, EHRHART-BORNSTEIN M, BORNSTEIN SR, MORANO I: Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res* 105: 326–334, 2009.

MAKOWSKI L, BOORD JB, MAEDA K, BABAEV VR, UYSAL KT, MORGAN MA, PARKER RA, SUTTLES J, FAZIO S, HOTAMISLIGIL GS, LINTON MF: Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nature Medicine* 7: 699–705, 2001.

MAKOWSKI L, BRITTINGHAM KC, REYNOLDS JM, SUTTLES J, HOTAMISLIGIL GS: The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor γ and I κ B kinase activities. *J Biol Chem* 280: 12888–12895, 2005

MAZUREK T, ZHANG L, ZALEWSKI A, MANNION JD, DIEHL JT, ARAFAT H, SAROV-BLAT L, O'BRIEN S, KEIPER EA, JOHNSON AG, MARTIN J, GOLDSTEIN BJ, SHI Y: Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 108: 2460-2466, 2003.

MRAZ M, LACINOVA Z, DRAPALOVA J, HALUZIKOVA D, HORINEK A, MATOULEK M, TRACHTA P, KAVALKOVA P, SVACINA S, HALUZIK M: The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus, *J Clin Endocrinol Metab* 96: 606-613, 201

PELTON PD, ZHOU L, DEMAREST KT, BURRIS TP: PPAR γ activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 456-458, 1999.

TÖNJES A, KRALISCH S, LÖSSNER U, KOVACS P, BLÜHER M, STUMVOLL M, FASSHAUER M: Metabolic and genetic predictors of circulating adipocyte fatty acid-binding protein. *Int J Obes (Lond)* 36: 766-773, 2012.

TSO AW, XU A, SHAM PC, WAT NM, WANG Y, FONG CH, CHEUNG BM, JANUS ED, LAM KS: Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care* 30: 2667-2672, 2007.

TUNCMAN G, ERBAY E, HOM X, DE VIVO I, CAMPOS H, RIMM EB, HOTAMISLIGIL GS: A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 6970–6975, 2006.

UYSAL KT, SCHEJA L, WIESBROCK SM, BONNER-WEIR S, HOTAMISLIGIL GS: Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 141: 3388-3396, 2000.

VAN DEN BERGHE G, WOUTERS P, WEEKERS F, VERWAEST C, BRUYNINCKX F, SCHETZ M, VLASSELAERS D, FERDINANDE P, LAUWERS P, BOUILLON R: Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 345: 1359-1367, 2001

VAN DEN BERGHE G: *Endocrinology in intensive care medicine: new insights and therapeutic consequences*. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* 64 167-187, 2002.

VON EYNATTEN M, BREITLING LP, ROOS M, BAUMANN M, ROTHENBACHER D, BRENNER H: Circulating adipocyte fatty acid-binding protein levels and cardiovascular morbidity and mortality in patients with coronary heart disease: a 10-year prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 2327-2335, 2012.

XU A, WANG Y, XU JY, STEJSKAL D, TAM S, ZHANG J, WAT NM, WONG WK, LAM KS: Adipocyte fatty acid binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 52: 405-413, 2006.

XU A, TSO AW, CHEUNG BM, WANG Y, WAT NM, FONG CH, YEUNG DC, JANUS ED, SHAM PC, LAM KS: Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-years prospective study. *Circulation* 115: 1537-1543, 2007.

SEZNAM PUBLIKACÍ

Původní práce publikované v impaktovaných časopisech, které jsou podkladem disertace:

Tomas Kotulak, Jana Drapalova, Michael Lips, Zdena Lacinova, Petr Kramar, Hynek Riha, Ivan Netuka, Jiri Maly, Jan Blaha, Jaroslav Lindner, Stepan Svacina, Milos Mraz and Martin Haluzik.: **Cardiac Surgery Increases Serum Concentrations of Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein and its mRNA Expression in Circulating Monocytes but not in Adipose Tissue.** Physiological Research Physiol Res. 2013 Nov 1. [Epub ahead of print] (Původní sdělení - IF 1,531 z r. 2012)

Kotulák, T., Drápalová, J., Kopecký, P., Lacinová, Z., Kramář, P., Říha, H., Netuka, I., Malý, J., Housa, D., Bláha, J., Svačina, Š., Haluzík, M. **Increased circulating and epicardial adipose tissue mRNA expression of fibroblast growth factor-21 after cardiac surgery: possible role in postoperative inflammatory response and insulin resistance.** Physiol Res. 2011, 60(5), 757-767. (Původní sdělení - IF 1,555 z r. 2011)

Další původní práce v impaktovaných časopisech:

Netuka I, Stepankova P, Urban M, Maly J, Szarszoi O, Dorazilova Z, Kotulak T, Pirk J. **Is severe cardiac dysfunction a contraindication for complex combined oncotherapy of Hodgkin's lymphoma? Not any more.** ASAIO J. 2013 May-Jun;59(3):320-1. (Původní sdělení - IF 1,491 z r. 2012)

Pirk J, Maly J, Szarszoi O, Urban M, Kotulak T, Riha H, Neuzil P, Netuka I. **Total artificial heart support with two continuous-flow ventricular assist devices in a patient with an infiltrating cardiac sarcoma.** ASAIO J. 2013 Mar-Apr;59(2):178-80. (Původní sdělení - IF 1,491 z r. 2012)

Pirk J, Malek I, Netuka I, Hoskova L, Pokorna E, Kotulak T, Urban M. **Heart transplantations at the Heart Center IKEM, Prague, Czech Republic.** Clin Transpl. 2012;135-43. (Původní sdělení - IF 1,634 z r. 2012)

Ríha H, Kotulák T, Březina A, Hess L, Kramář P, Szárszoi O, Netuka I, Pirk J. **Comparison of the effects of ketamine-dexmedetomidine and sevoflurane-sufentanil anesthesia on cardiac biomarkers after cardiac surgery: an observational study.** Physiol Res. 2012;61(1):63-72. Epub 2011 Dec 20. (Původní sdělení - IF 1,555 z r. 2011)

Riha H, Kotulak T, Syrovatka P, Netuka I. eComment: **Hemodynamic monitoring with LiDCOplus system in the patients supported by isolated right ventricular assist device.** Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2011 Jul;13(1):57. (IF 1,112 z roku 2012)

Bláha, J., Kopecký, P., Matias, M., Hovorka, R., Kunstýř, J., Kotulák T., Lipš, M., Rubeš, D., Stříteský, M., Lindner, J., Semrád, M., and Haluzík, M., **Comparison of Three Protocols for Tight Glycemic Control in Cardiac Surgery Patients.** Diabetes Care. 2009 May;32(5):757-61 (Původní sdělení IF 7,349).

Netuka, I., Malý, J., Szarszoi, O., Skalský, I., Říha, H., Kotulák, T., Novotný, J., Hulman, M., Pirk, J. **Single-stage extensive chronic type A dissecting aortic aneurysm repair and continuous-flow ventricular assist device implantation.** Journal of heart and lung transplantation, 2009, vol. 28, no. 5, p. 523-526. (Původní sdělení IF 3,323)

Kunstyr J., Lincova D., Mourad M., Lips M., Cermak T., Kotulak T., Blaha J., Rubes D., Matias M., Stritesky M. **A retrospective analysis of Terlipressin infusion in patients with refractory hypotension after cardiac surgery**
J Cardiovasc Surg 2008, 49: 381-7. (Původní sdělení IF 1,57).

Rohn V., Šlais M., Kotulák T., Pšenička M. **Pulmonary Valve Replacement for Pacing Electrodes: Related Bacterial Endocarditis**
Ann Thorac Surg. 2008 Jun;85(6):2128-30. (Původní sdělení IF 2,02).

Ostatní původní práce v recenzovaných časopisech bez IF:

Pirk, J., Málek, I., Netuka, I., Hošková, L., Pokorná, E., Kotulák, T., Urban, M. **Heart transplantations at the Heart Center IKEM, Prague, Czech Republic.** Clinical transplants. 2012, 28(28), 135-143. (Původní sdělení)

Malý, J., Želízko, M., Netuka, I., Janek, B., Szárszoi, O., Kotulák, T., Marek, T., Pirk, J. **Cévní komplikace při transkatetrové implantaci aortální chlopně v IKEM.** Rozhledy v chirurgii. 2011, 90(2), 106-110. (Původní sdělení).

Netuka, I., Malý, J., Szárszoi, O., Říha, H., Turek, D., Urban, M., Skalský, I., Kotulák, T., Dorazilová, Z., Pirk, J. **Technika implantace a zkušenosti s dočasnou mechanickou srdeční podporou při selhání pravé komory.** Rozhledy v chirurgii. 2011, 90(2), 88-94. (Původní sdělení).

Netuka I, Szarszoi O, Maly J, Adamira M, Turek D, Besik J, Urban M, Riha H, Kotulak T, Pirk J. **Comprehensive management of severe intestinal bleeding in a patient supported for 94 days by the biventricular Levitronix CentriMag system.**

Heart Surg Forum. 2010 Dec;13(6):E409-10. (Původní sdělení).

Szárszoi, O., Netuka, I., Malý, J., Bešík, J., Skalský, I., Říha, H., Kotulák, T., Pirk, J. **Vliv "CorCap Cardiac Support Device" na remodelaci levé komory srdeční: jednoleté sledování u prvního pacienta v IKEM.** Cor et Vasa. 2009, 51(10), 717-719. (Původní sdělení)

Želízko, M., Janek, B., Netuka, I., Malý, J., Kotulák, T., Marek, T., Kautznerová, D., Luha, O. **Perkutánní implantace aortální chlopně u nemocné s těsnou aortální stenózou.** Intervenční a akutní kardiologie. 2009, 8(1), 43-46. (Původní sdělení)

Adamíra, M., Juštík, P., Pirk, J., Skalský, I., Kotulák, T., Lánská, V. **Náhrada aortální chlopně u nemocných ve věku nad 80 let.** Cor et Vasa, 2009, roč. 51, č. 5, s. 322-326. (Původní sdělení)

Kunstýř J, Lindner J, Jansa P, Mayer E, Kotulák T, Lipš M, Bláha J, Rubeš D, Matias M., Střítěský M **První endarterektomie arteria pulmonalisv ČR.** Anest. Intenziv. Med., 16, 2005, č. 2, s. 101–104.. (Původní sdělení)

Přehledné články:

Říha, H., Syrovátka, P., Kramář, P., Pindřák, M., Říhová, L., Matloch, Z., Netuka, I., Kotulák, T. **Levosimendan u pacientů s mechanickou srdeční podporou.** Kardiologická revue. 2013, 15(2), 104-106. (Přehled)

Říha, H., Kramář, P., Syrovátka, P., Rzyman, R., Říhová, L., Netuka, I., Malý, J., Kettner, J., Pirk, J., Kotulák, T. **Mechanická srdeční podpora.** Anesteziologie a intenzivní medicína. 2012, 23(3), 133-136. (Přehled)

Kotulák, T., Říha, H., Haluzík, M. **Hyperglykémie a její kontrola u dospělých pacientů v intenzivní péči.** Časopis lékařů českých. 2011, 150(1), 20-23. (Přehled)

Riha H, Netuka I, Kotulak T, Maly J, Pindak M, Sedlacek J, Lomova J. **Anesthesia management of a patient with a ventricular assist device for noncardiac surgery.** Semin Cardiothorac Vasc Anesth. 2010 Mar;14(1):29-31. (Přehled).

Říha, H., Netuka, I., Kotulák, T., Malý, J., Pindřák, M., Kellovský, P., Kopáč, F., Hodr, D., Szárszoi, O., Kettner, J., Al-Hiti, H., Dorazilová, Z., Marek, T., Skalský, I., Pirk, J.

Dysfunkce pravé komory po implantaci levostranné mechanické srdeční podpory.

Vnitřní lékařství. 2010, 56(1), 30-36. ISSN 0042-773X.

Říha, H., Kotulák, T., Březina, A., Hess, L., Ošťádal, B., Pirk, J. **Kardioprotektivní účinky inhalačních a intravenózních anestetik.** Cor et Vasa. 2011, 53(12), 683-692. (Přehled).

Říha, H., Kotulák, T., Netuka, I., Pindřák, M., Kramář, P., Syrovátka, P., Kellovský, P., Říhová, L., Malý, J., Szárszoi, O., Turek, D., Kettner, J., Pirk, J., **Intenzivní péče o pacienty po implantaci mechanických srdečních podpor.** Cor et Vasa. 2011, 53(1-2), 94-98. ISSN 0010-8650. (Přehled)

Kotulák T. **Očišťovací metody a akutní selhání ledvin: načasování, výběr metody a dávka RRT** Anest. Intenziv. Med., 19, č. 1, 2008,23-31. (Přehled).

Abstrakta a přednášky:

Kotulák, T. **Ultrafiltrace a kardiorenální syndrom.** VII.kongres České společnosti intenzivní medicíny. Praha, CZ. 12.06.2013 - 14.06.2013. Zorg. ČSIM.

Pirk, J., Málek, I., Netuka, I., Hošková, L., Pokorná, E., Kotulák, T., Urban, M. **Heart transplantations at the Heart Center IKEM,** Prague, Czech republic. In: Everly, M., Terasaki, P. Clinical transplants 2012. 1 vyd. Los Angeles, California: Terasaki

Foundation Laboratory, 2013, s. 135-143. ISBN 1-880318-21-0.

Kotulák, T. **Perioperative hemodynamic monitoring - LIDCO**. Silesian Unit of the Polish Association of Regional Anaesthesia and Pain Therapy. Wisla, PL. 10.05.2013 - 12.05.2013.

Lomová, J., Pirk, J., Langhammer, P., Kotulák, T., Skibová, J., Říha, H. **Long-term outcome of 650 octogenarians undegoing Cardiac Surgery at IKEM**. 31th Annual Symposium: Clinical Update In Anesthesiology, Surgery and Perioperative Medicine. Curacao, NL. 20.01.2013 - 25.01.2013. Zorg. The Department of Anesthesiology of the Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA.

Matloch, Z., Říha, H., Kotulák, T., Netuka, I. **Thromboelastogrphy (TEG) guided transfusion management reduces blood products consumption and costs in adult cardiac surgery**. The AAGBI Annual Congress. Dublin, IE. 18.09.2013 - 20.09.2013. Zorg. AAGBI.

Kotulák, T., Říha, H. **Zvláštnosti monitorace pacientů s oběhovou podporou**. XV. kardioanesteziologické vědecké dny s mezinárodní účastí. Pardubice, CZ. 30.05.2013 - 31.05.2013. Zorg. KARIM 1.LF UK a VFN.

Kotulák, T. **Infekce stimulačních systémů - nový problém, o kterém musím něco vědět**. VII. kongres České společnosti intenzivní medicíny. Praha, CZ. 12.06.2013 - 14.06.2013. Zorg. ČSIM.

Kotulák T. **Acute Kidney Injury in Cardiac Surgery prevention and therapy** Astana, KZ. 07.09.2013 - 08.09.2013. Zorg. National Research Center for Cardiac Surgery.

Pirk, J., Málek, I., Pokorná, E., Kotulák, T. **Heart transplant program in IKEM 1984-2013**. II. International Congress of Cardiac Surgery. Astana, KZ. 07.09.2013 - 08.09.2013. Zorg. National Research Center for Cardiac Surgery.

Matloch, Z., Říha, H., Kotulák, T., Netuka, I. **Thromboelastography (TEG) guided transfusion management reduces blood products consumption and costs in adult cardiac surgery**. AAGBI Annual Congress. Dublin, IE. 18.09.2013 - 20.09.2013. Zorg. AAGBI.

Kotulák, T. **Jak používám IHD na JIP**. VII.kongres České společnosti intenzivní medicíny. Praha, CZ. 12.06.2013 - 14.06.2013. Zorg. ČSIM.

Říha, H., Kramář, P., Syrovátka, P., Pind'ák, M., Rzyman, R., Netuka, I., Malý, J., Szárszoi, O., Kotulák, T. **Péče o pacienta s VAD hospitalizovaného na kardiokirurgickém pracovišti: weaning či transport k následné léčbě do transplantačního centra?** XIV. kardioanesteziologické dny. Pardubice, CZ, 14.06.2012 - 15.06.2012. Anesteziologie a intenzivní medicína. 2013, 24(1), 59. ISSN 1214-2158.

Kotulák, T. **Metabolic Syndrome In Cardiac Surgery**. 31th Annual Symposium: Clinical

Update in Anesthesiology, Surgery and Perioperative Medicine. Curacao, NL. 20.01.2013 - 25.01.2013. Zorg. The Department of Anesthesiology of the Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA.

Kotulák, T. **Jak používám KDIGO doporučení u svých pacientů s AKI.** Světový den ledvin: Akutní poškození ledvin. Praha, CZ. 13.03.2013 - 13.03.2013. Zorg. Mezinárodní federace pro nemoci ledvin a Mezinárodní nefrologická společnost.

Kotulák, T. **Mimotělní eliminace u kriticky nemocných.** Kurz dialyzační. Praha, CZ. 28.03.2013. Zorg. IPVZ.

Kotulák, T. **Předanestetické vyšetření u pacienta s onemocněním srdce - co je opravdu důležité pro praxi?.** XX. kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. Brno, CZ. 19.09.2013 - 21.09.2013. Zorg. ČSARIM.

Kotulák, T. **Infúzní léčba koloidy a elektrolyty.** Předatestační kurz VFN. VFN. 04.03.2013. Zorg. KARIM VFN.

Kotulák, T. **Pacient s diabetes melitus.** XIX.kongres ČSARIM. Hradec Králové, CZ. 13.09.2012 - 15.09.2012. Zorg. ČSARIM.

Kotulák, T. **Metabolický syndrom a kritický stav.** 14. PG kurz Sepse a MODS. Ostrava, CZ. 24.01.2012 - 27.01.2012. Zorg. ČSFS.

Skalský, I., Martinča, T., Szárszoi, O., Sedláček, K., Bytešník, J., Wichterle, D., Kotulák, T., Kautzner, J., Pirk, J. **Výsledky a vývoj indikací k minimálně invazivní chirurgické implantaci epikardiálních stimulačních elektrod.** 20. výroční sjezd České kardiologické společnosti. Brno, CZ. 13.05.2012 - 16.05.2012. Zorg. Česká kardiologická společnost. In: XX. výroční sjezd České kardiologické společnosti: Kniha abstrakt [on-line]. Praha: Česká kardiologická společnost, 2012, s. 1.

Skalský, I., Martinča, T., Marek, T., Pirk, J., Kramář, P., Říha, H., Kotulák, T., Hodr, D. **Výsledky operací mitrální chlopně z minimálně invazivního přístupu (2008 - 2011).** V. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie ČLS JEP a 16. Hejhalův den. Brno, CZ. 04.11.2012 - 06.11.2012. Zorg. Česká společnost kardiovaskulární chirurgie ČLS JEP. In: V. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie ČLS JEP a 16. Hejhalův den. Praha: Česká společnost kardiovaskulární chirurgie, 2012, s. 15.

Kotulák, T. **Current Management of Stress Hyperglycemia.** 30th Annual Symposium: Clinical Update In Anesthesiology, Surgery and Perioperative Medicine. Rio Grande, PR. 15.01.2012 - 20.01.2012. Zorg. Mount Sinai School of Medicine.

Pirk, J., Kotulák, T., Szárszoi, O., Malý, J., Kramář, P., Netuka, I. **10 let programu VAD v IKEM - nové možnosti - total artificial heart.** V. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie ČLS JEP a 16. Hejhalův den. Brno, CZ. 04.11.2012 - 06.11.2012. Zorg. Česká společnost kardiovaskulární chirurgie. In: V. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie ČLS JEP a 16. Hejhalův den. Praha: Česká

společnost kardiovaskulární chirurgie, 2012, s. 118.

Kotulák, T. **Cílový tlak během mimotělního oběhu - praxe vs. EBM.** XIX.kongres ČSARIM. Hradec Králové, CZ. 16.09.2012 - 15.09.2012. Zorg. ČSARIM.

Pirk, J., Netuka, I., Říha, H., Kotulák, T., Urban, M., Mašín, J. **Nine years of ventricular assist device program in IKEM.** 30th Cardiovascular Surgical Symposium. Züers, AT. 03.03.2012 - 10.03.2012. Zorg. Karl Landstiner Institute of Cardiovascular Surgical Research Johann Meinhart.

Lomová, J., Szárszoi, O., Kotulák, T., Říha, H., Pirk, J., Pind'ák, M., Mašín, J. **Jehovah's Witnesses in Bloodless Cardiac Surgery.** 30th Annual Symposium: Clinical Update In Anesthesiology, Surgery and Perioperative Medicine. Rio Grande, PR. 15.01.2012 - 20.01.2012. Zorg. Mount Sinai School of Medicine.

Kotulák, T. **ESA-erythropoesu stimuluující agensa jejich využití v klinické praxi.** XV.Žaludovy dny. Ústí nad Labem, CZ. 07.04.2011 - 08.04.2011. Zorg. ČSIM, ČSARIM.

Kotulák, T. **Plicní hypertenze a možnosti jejího ovlivnění v intenzivní péči.** XVIII. kongres ČSARIM, satelitní sympozium Linde Gas a.s.: Oxid dusnatý v současné a budoucí klinické praxi. Praha, CZ. 06.10.2011. Zorg. ČSARIM.

Říha, H., Kotulák, T., Březina, A., Hess, L., Ošťádal, B., Pirk, J. **Kardioprotektivní**

účinky inhalačních a intravenózních anestetik. Cor et Vasa. 2011, 53(12), 683-692.
ISSN 0010-8650.

Drpalova, J., Kavalkova, P., Bartlova, M., Kopecky, P., Kotulák, T., Haluzik, M. **The influence of deep hypothermia on the endocrine function of adipose tissue.** 36th FEBS Congress of the Biochemistry for Tomorrows Medicine. Torino, IT, 25.06.2011 - 30.06.2011. Zorg. European Biochemical Societies. FEBS Journal. 2011, 278(suppl. s1), 177. ISSN 1742-464X.

Kotulák, T. **Čím může anesteziolog prospět funkci ledvin.** Specializační kurz Aktuální otázky perioperační medicíny. Praha, CZ. 07.02.2011 - 09.02.2011. Zorg. IPVZ.

Říhová, L., Syrovátka, P., Říha, H., Malý, J., Pindák, M., Kotulák, T., Kopáč, F., Želízko, M., Dorazilová, Z., Netuka, I., Pirk, J. **Nitrosrdeční pravo-levý zkrat jako příčina závažné hypoxémie u pacienta s mechanickou srdeční podporou.** 18. kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. ČSARIM. Praha, CZ. 06.10.2011 - 08.10.2011. Zorg. ČSARIM. In: 18. kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. Sborník abstrakt. Praha: Občanské sdružení ČSARIM, 2011, s. 60. ISBN 978-80-260-0541-4.

Kotulák, T. **Transfuzní politika na kardiochirurgické jednotce intenzivní péče.** XIII. kardioanesteziologické vědecké dny s mezinárodní účastí. Pardubice, CZ. 26.05.2011 - 27.05.2011. Zorg. KARIM, 1.LF UK a VFN v Praze. .

Kotulák, T. **Prevence AKI v praxi.** V.česko-slovenský kongres intenzivní medicíny. Praha, CZ. 11.05.2011 - 13.05.2011. Zorg. ČSIM.

Říha, H., Kotulák, T., Netuka, I., Pindák, M., Kramář, P., Syrovátka, P., Říhová, L., Dorazilová, Z., Pirk, J. **Antikoagulace u pacientů s mechanickými srdečními podporami.** 13. kardioanesteziologické dny. Pardubice, CZ, 26.05.2011 - 27.05.2011. Anesteziologie a intenzivní medicína. 2011, 22(4), 230. ISSN 1214-2158.

Kotulák, T. **Videolaryngoskopie.** 19. Hoderův den. Praha, CZ, 11.11.2010. Anesteziologie a intenzivní medicína. 2011, 22(3), 178-179. ISSN 1214-2158.

Kotulák, T. **ESA-erythropoézu stimuluující agens a jejich použití v praxi.** 13. Postgraduální kurz Sepse a MODS. Ostrava, CZ. 25.01.2011 - 28.01.2011. Zorg. ČSARIM.

Pirk, J., Malý, J., Želízko, M., Netuka, I., Kotulák, T., Janek, B. **The experience with TAVI in IKEM.** 29th Cardiovascular Surgical Symposium. 6th Cardiac Surgery Update and Progress. Zürs, AT. 26.02.2011 - 05.03.2011.

Drápalová, J., Kotulák, T., Kopecký, P., Bártlová, M., Lacinová, Z., Haluzík, M. **Hluboká hypotermie snižuje zánětlivou reakci v tukové tkáni: studie u pacientů podstupujících elektivní kardiochirurgickou operaci.** 47. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 14.04.2011 - 16.04.2011. Zorg. Česká diabetologická společnost. Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa. 2011, 14(suppl. 1), 35-36, č. abstr. 44. ISSN 1211-

9326.

Kotulák, T. **Kontrola glykémie u dospělých kriticky nemocných.** Výživa - nedílná součást léčby závažných chorob. VI. ročník konference s mezinárodní účastí. Praha, CZ. 23.11.2011 - 24.11.2011. Zorg. IKEM. In: Výživa - nedílná součást léčby závažných chorob : sborník abstrakt. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zdravotně sociální fakulta, 2011, s. 16-17. ISBN 978-80-7394-318-9.

Říha, H., Hess, L., Březina, A., Kramář, P., Kotulák, T. **Kombinace midazolam-dexmedetomidin-ketamin v kardioanestezii.** Referátový výběr z anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. 2011, 58(1 (Suppl)), 4-5. ISSN 1212-3048.

Kotulák, T. **Nedialyzační léčba AKI a postinjury prevention.** 13. Postgraduální kurz Sepse a MODS. Ostrava, CZ. 25.01.2011 - 28.01.2011. Zorg. ČSARIM.

Lomová, J., Netuka, I., Říha, H., Kotulák, T., Malý, J., Pindřák, M., Mašín, J. **Simultaneous Temporary CentriMag BiVentricular Assist Devices and Extracorporeal Membrane Oxygenator for Extended Use for Refractory Cardiogenic Shock.** Case report. 29th Annual Symposium, Clinical Update In Anesthesiology, Surgery and Perioperative Medicine. St. Martin, US. 16.01.2011 - 21.01.2011. Zorg. The Department of Anesthesiology of the Mount Sinau School of Medicine.

Kotulák, T. **Aktuální otázky perioperační medicíny.** Praha, CZ. 07.02.2011 - 09.02.2011. Zorg. IPVZ.

Kotulák, T. **Cardio-Renal Syndromes**. 29th Annual Symposium: Clinical Update in Anesthesiology, Surgery and Perioperative Medicine. St. Martin, US. 16.01.2011 - 21.01.2011. Zorg. The Mount Sinai School of Medicine.

Říhová, L., Syrovátka, P., Říha, H., Malý, J., Pindřák, M., Kotulák, T., Kopáč, F., Želízko, M., Dorazilová, Z., Netuka, I., Pirk, J. **Nitrosrdeční pravo-levý zkrat jako příčina závažné hypoxémie u pacienta s mechanickou srdeční podporou**. 18. kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. ČSARIM. Praha, CZ, 06.10.2011 - 08.10.2011. Zorg. ČSARIM. Anesteziologie a intenzivní medicína. 2011, 22(6), 367-368. ISSN 1214-2158.

Kotulák, T. **Kardio-renální syndrom - perioperační souvislosti**. XII. kardioanesteziologické vědecké dny s mezinárodní účastí. Pardubice, CZ. 15.04.2010 - 16.04.2010. Zorg. ČSARIM.

Netuka, I., Malý, J., Szárszoi, O., Říha, H., Turek, D., Skalský, I., Málek, I., Hegarová, M., Dorazilová, Z., Kotulák, T., Pirk, J. **Přínos implantabilní levostranné mechanické srdeční podpory u kriticky nemocných před transplantací srdce**. IV. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie. České Budějovice, CZ, 04.11.2010 - 05.11.2010. Zorg. Česká společnost kardiovaskulární chirurgie. Cor et Vasa (Kardio). 2010, 52(10), 670. ISSN 0010-8650.

Kotulák, T. **Syntetické koloidy**. 12. PG kurz Sepse a MODS. Ostrava, CZ. 26.01.2010 -

29.01.2010. Zorg. CSFS.

Kotulák, T., Říha, H., Netuka, I., Malý, J. **Rescue indikace venovenózního ECMO u těžké virové pneumonie H1N1.** Anesteziologie a intenzivní medicína. 2010, 21(5), 280-281. ISSN 1214-2158.

Kotulák, T. **Výživa u pacientů anesteziologickoresuscitačního oddělení. Výživa - nedílná součást léčby závažných chorob,** V. ročník mezinárodní konference. Poděbrady, CZ. 18.11.2010 - 19.11.2010. Zorg. IKEM, Lázně Poděbrady, Česká lékařská komora, Česká asociace sester.

Malý, J., Želízko, M., Netuka, I., Janek, B., Kotulák, T., Szárszoi, O., Marek, T., Pirk, J. **Transkatetrová implantace aortální chlopně Medtronic CoreValve v IKEM.** IV. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie. České Budějovice, CZ, 04.11.2010 - 05.11.2010. Zorg. Česká společnost kardiovaskulární chirurgie. Cor et Vasa (Kardio). 2010, 52(10), 668. ISSN 0010-8650.

Kotulák, T. **Jak může péče o dárce modulovat funkci transplantovaných orgánů?.** 17. kongres ČSARIM. Zlín, CZ. 09.09.2010 - 11.09.2010. Zorg. ČSARIM.

Kotulák, T., Drápalová, J., Kopecký, P., Mráz, M., Říha, H., Bláha, J., Kramář, P., Netuka, I., Malý, J., Křemen, J., Kotrlíková, E., Svačina, Š., Haluzík, M. **Změny sérových koncentrací a genové exprese fibroblastového růstového faktoru-21 po kardiochirurgické operaci: možný význam při vzniku pooperační inzulínové**

rezistence. 46. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 22.04.2010 - 24.04.2010. Zorg. Česká diabetologická společnost. Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa. 2010, 13(suppl. 1), 25-26, č. abstr. 20. ISSN 1211-9326.

Želízko, M., Malý, J., Janek, B., Netuka, I., Kotulák, T., Marek, T., Pirk, J.
Transkatetrová implantace aortální chlopně CoreValve. In: Intervenční a akutní kardiologie. 1 vyd. Olomouc: Solen, 2010, s. B9-B13. ISBN 978-80-87327-33-3.

Skalský, I., Martinča, T., Malý, J., Netuka, I., Pirk, J., Kramář, P., Říha, H., Kotulák, T., Hodr, D. **Naše zkušenosti s minimálně invazivními kardiochirurgickými výkony z minithorakotomie na mimotělním oběhu (2008-2010).** IV. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie. České Budějovice, CZ, 04.11.2010 - 05.11.2010. Zorg. Česká společnost kardiovaskulární chirurgie. Cor et Vasa (Kardio). 2010, 52(10), 672. ISSN 0010-8650.

Kotulák, T. **Non-renální indikace (C)RRT.** CCNEPHRO 2010. III.konference "Nefrologie kritických stavů!". Zlín, CZ. 08.09.2010. Zorg. Aesculap Akademie, KAR IKEM.

Říha, H., Netuka, I., Kotulák, T., Malý, J., Pindřák, M., Sedláček, J., Lomová, J.
Anesthesia management of a patient with a ventricular assist device for noncardiac surgery. Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia. 2010, 14(1), 29-31. ISSN 1089-2532.

Kotulák, T. **Nonrenální indikace RRT**. IV.česko-slovenský kongres intenzivní medicíny. Brno, CZ. 12.05.2010 - 14.05.2010. Zorg. ČSIM.

Kotulák, T. **Jak může péče o dárce modulovat funkci transplantovaných orgánů?**. III. česko-slovenský transplantační kongres. Špindlerův Mlýn, CZ. 16.09.2010 - 18.09.2010. Zorg. Česká transplantační společnosti.

Kotulák, T., Říha, H. **Rescue indikace venovenozního ECMO u těžké virové pneumonie H1N1**. VI. celostátní konference Umělá plicní ventilace. Mladá Boleslav, CZ. 16.02.2010 - 18.02.2010. Zorg. ČSARIM.

Pirk, J., Hošková, L., Málek, I., Skalský, I., Netuka, I., Kotulák, T., Pokorná, E. **26 years of heart transplantation programme in IKEM**. 20th World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons. Chennai, IN, 20.10.2010 - 23.10.2010. Zorg. World Society of Cardio-Thoracic Surgeons. The heart surgery forum. 2010, 13(suppl. 2), S115. ISSN 1098-3511.

Kotulák, T. **Kontrola homeostázy u kriticky nemocných**. Kurz: "Novinky v intenzivní medicíny 2010". Praha, CZ. 13.12.2010 - 17.12.2010. Zorg. IPVZ.

Kotulák, T. **Jak ochránit ledviny v perioperačním období? - co dělat a čemu se vyhnout?**. Aktuální otázky perioperační medicíny. Specializační kurz. Praha, CZ. 06.04.2010 - 08.04.2010. Zorg. IPVZ.

Kotulák, T. **Infekce, sepsa a obezita**. 11. PG kurz Sepsa a MODS. Ostrava, CZ. 20.01.2009 - 23.01.2009.

Pirk, J., Netuka, I., Malý, J., Skalský, I., Szárszoi, O., Říha, H., Kotulák, T., Kettner, J. **Implantable left ventricular assist devices (LVADs) - indications and experience with their use at IKEM**. Poster. 19th World Congress World Society of Cardio-Thoracic Surgeons. Buenos Aires, AR. 04.11.2009 - 06.11.2009. Zorg. World Society of Cardio-Thoracic Surgeons. In: 19th World Congress World Society of Cardio-Thoracic Surgeons. Abstract Book. Chicago: World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, 2009, s. 263, č. abstr. P 285.

Sedláček, J., Říha, H., Pindák, M., Hošková, L., Kotulák, T., Pirk, J. **Následná péče o pacienta s mechanickou srdeční podporou a úspěšnou retransplantací srdce**. Poster. 16. národní kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (ČSARIM). České Budějovice, CZ, 01.10.2009 - 03.10.2009. Zorg. ČSARIM. Anesteziologie a intenzivní medicína. 2009, 20(5), 280, č. abstr. P012. ISSN 1214-2158.

Kotulák, T. **První perkutánní implantace aortální chlopně v České republice**. XI. kardiosteziozozogické vědecké dny s mezinárodní účastí. Pardubice, CZ. 16.04.2009 - 17.04.2009. Zorg. ČSARIM.

Netuka, I., Malý, J., Szárszoi, O., Skalský, I., Říha, H., Kotulák, T., Novotný, J., Pirk, J. **Single-stage Extensive Chronic type a dissecting aortic aneurysm repair and**

continuous-flow ventricular assist device implantation. Journal of heart and lung transplantation. 2009, 28(5), 523-526. ISSN 1053-2498. IF 3,541.

Skalský, I., Netuka, I., Malý, J., Martinča, T., Dorazilová, Z., Pirk, J., Kotulák, T.
Recovery těžké dysfunkce LK při neléčené aortální stenose na dlouhodobé levostranné mechanické srdeční podpoře Heartmate II. Poster. 17. výroční sjezd České kardiologické společnosti. Brno, CZ. 10.05.2009 - 13.05.2009. Zorg. Česká kardiologická společnost.

Pirk, J., Netuka, I., Malý, J., Skalský, I., Szárszoi, O., Říha, H., Kotulák, T., Kettner, J.
Implantable left ventricular assist devices (LVADS)- indications and experience with their use at IKEM. Joint Meeting. 27th Cardiovascular Surgical Symposium. 4th Cardiac Surgery Update and Progress. Zürs, AT. 28.02.2009 - 07.03.2009. In: Joint Meeting. 27th Cardiovascular Surgical Symposium. 4th Cardiac Surgery Update and Progress. Abstracts. Vienna: E & E Professional Congress Organization, 2009, s. 38.

Lomová, J., Kotulák, T., Pirk, J. **Cardiac surgery in octogenarians.** Perioperative Care for the geriatric patient. Praha, CZ. 14.06.2009 - 16.06.2009.

Malý, J., Želízko, M., Kotulák, T., Netuka, I., Janek, B., Marek, T., Ulman, J., Kautznerová, D. **Aortální stenóza: multidisciplinární projekt.** 17. výroční sjezd České kardiologické společnosti. Brno, CZ. 10.05.2009 - 13.05.2009. Zorg. Česká kardiologická společnost.

Marek, T., Želízko, M., Janek, B., Kotulák, T., Malý, J., Netuka, I., Straka, F. **Perkutánní náhrada aortální chlopně - časně echokardiografické výsledky.** Echodny 2009. Špindlerův Mlýn, CZ, 18.09.2009 - 19.09.2009. Cor et Vasa. 2009, 51(9), 646. ISSN 0010-8650.

Říha, H., Skalský, I., Kotulák, T., Netuka, I., Kellovský, P., Pindák, M., Březina, A., Kopáč, F., Říhová, L., Kettner, J., Pirk, J. **Vliv plicní cévní rezistence na funkci levostranné mechanické srdeční podpory - kazuistika.** III. česko-slovenský kongres intenzivní medicíny. Hradec Králové, CZ, 13.05.2009 - 15.05.2009. Anesteziologie a intenzivní medicína. 2009, 20(4), 213. ISSN 1214-2158.

Kotulák, T. **Prevence renálního selhání na ICU - fikce nebo reálná možnost?.** III. česko-slovenský kongres intenzivní medicíny. Hradec Králové, CZ. 13.05.2009 - 15.05.2009. Zorg. Česká společnost intenzivní medicíny.

Kotulák, T. **Prevention of acute kidney injury.** 28th Annual Symposium. Bahamas, BS. 17.01.2009 - 22.01.2009. Zorg. Mount Sinai School of Medicine, New York.

Koželuhová, M., Peichl, P., Kotulák, T., Skalský, I., Vančura, V., Čihák, R., Bytešník, J., Kautzner, J. **Současné možnosti nefarmakologické léčby recidivujících komorových tachykardií.** Poster. 17. výroční sjezd České kardiologické společnosti. Brno, CZ. 10.05.2009 - 13.05.2009. Zorg. Česká kardiologická společnost.

Kotulák, T. **Perioperační protekce ledvin.** 16. národní kongres České společnosti

anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (ČSARIM). České Budějovice, CZ.
01.10.2009 - 03.10.2009. Zorg. ČSARIM.

Želízko, M., Janek, B., Malý, J., Netuka, I., Kotulák, T., Marek, T., Pirk, J. **Perkutánní implantace aortální chlopně - zkušenosti IKEM se systémem CoreValve**. Invazivní kardiologie v Českém ráji. Hrubá Skála, CZ. 08.10.2009 - 09.10.2009. Zorg. 1. interní klinika LF UK a FN HK.

Kotulák, T. **Selhání ledvin a RRT**. 11. PG kurz Sepse a MODS. Ostrava, CZ. 20.01.2009 - 23.01.2009.

Kotulák, T. **Extrakorporální eliminační metody**. Intenzivní metabolická péče a umělá výživa v klinické praxi. Praha, CZ. 04.11.2008. Zorg. Centrum výzkumu diabetu, metabolismu a výživy 3.lékařské fakulty UK, Academia Medica Pragensis.

Kotulák, T. **Technika ultrafiltrace a dialýzy**. Specializační kurz perfúziologie. Praha, CZ. 27.05.2008 - 29.05.2008. Zorg. IPVZ.

Kotulák, T. **Obézní pacient na ICU**. II. česko-slovenský kongres intenzivní medicíny a 13. Minářovy dny. Plzeň, CZ. 04.06.2008 - 06.06.2008. Zorg. ČSIM ČLS JEP.

Skalský, I., Martinča, T., Malý, J., Szárszoi, O., Netuka, I., Pirk, J., Kotulák, T., Wurmová, Š. **Naše zkušenosti s využitím torakoskopu v kardiochirurgii (2006 - 2008)**. 3. sjezd

České společnosti kardiovaskulární chirurgie. Brno, CZ. 06.11.2008 - 07.11.2008. Zorg.
Česká společnost kardiovaskulární chirurgie. In: 3. sjezd České společnosti
kardiovaskulární chirurgie. Sborník abstrakt s programem. Praha: Česká společnost
kardiovaskulární chirurgie, 2008, s. nestr., č. abstr. 49.

Říha, H., Březina, A., Pindřák, M., Kopáč, F., Říhová, L., Kotulák, T. **Kardiogenní šok
při akutním infarktu myokardu - současné možnosti jeho léčby.** V. anesteziologické
dny Vysočiny. Jihlava, CZ. 30.10.2008 - 31.10.2008. Zorg. ČSARIM. In: V.
anesteziologické dny Vysočiny. Sborník přednášek a abstrakt. Jihlava: EKON, 2008, s. 55-
57. ISBN 80-902743-0-7.

Říha, H., Pindřák, M., Kotulák, T., Netuka, I., Malý, J., Kopáč, F., Říhová, L., Pirk, J.
Percutaneous tracheostomy in the patients with mechanical circulatory support. 11th
International Congress of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia. Berlín, DE. 14.09.2008
- 18.09.2008. Zorg. Society of Cardiovascular Anesthesiologists.

Kotulák, T. **Extrakorporální eliminační metody.** Intenzivní metabolická péče a umělá
výživa v klinické praxi. Praha, CZ. 11.11.2008. Zorg. Centrum výzkumu diabetu,
metabolizmu a výživy 3.lékařské fakulty UK, Academia Medica Pragensis.

Kunstýř, J., Lincová, D., Mourad, M., Lipš, M., Čermák, T., Kotulák, T., Bláha, J., Rubeš,
D., Matias, M., Stříteský, M. **A retrospective analysis of Terlipressin infusion in
patients with refractory hypotension after cardiac surgery.** Journal of cardiovascular
surgery. 2008, 49(3), 381-387. ISSN 0021-9509. IF 0,754.

Netuka, I., Pirk, J., Malý, J., Skalský, I., Szárszoi, O., Říha, H., Kotulák, T., Kettner, J.
Implantabilní levostranná srdeční podpora - indikace a zkušenosti v IKEM. 3. sjezd
České společnosti kardiologické chirurgie. 14. Hejhalův den. Brno, CZ, 06.11.2008 -
07.11.2008. Cor et Vasa (Kardio). 2008, 50(11), K 227. ISSN 0010-8650.

Kotulák, T. **Post-op management & Anti-Coagulation Protocol.** HM-II LVAS Surgical
Training. Praha, CZ. 21.04.2008 - 22.04.2008. Zorg. Thoratec.

Kotulák, T. **Plicní hypertenze u operovaných chlopenních vad z pohledu anesteziologa.**
16. výroční sjezd České kardiologické společnosti. Brno, CZ. 24.05.2008 - 27.05.2008.
Zorg. Česká kardiologická společnost.

Kotulák, T. **Extrakorporální eliminační metody.** Intenzivní metabolická péče a umělá
výživa v klinické praxi. Praha, CZ. 13.11.2008. Zorg. Centrum výzkumu diabetu,
metabolizmu a výživy 3.lékařské fakulty UK, Academia Medica Pragensis.

Kotulák, T. **Anesthesia & pre op Preparation.** Haemodynamic Monitoring & Antibiotic
protocol. HM-II LVAS Surgical Training. Praha, CZ. 21.04.2008 - 22.04.2008. Zorg.
Thoratec.

Kotulák, T. **Péče o zemřelé dárce orgánů.** II. česko-slovenský kongres intenzivní
medicíny a 13. Minářovy dny. Plzeň, CZ. 04.06.2008 - 06.06.2008. Zorg. ČSIM ČLS JEP.

Kotulák, T. **Diagnostika a léčba renálního selhání v kardiochirurgii.** X. Kardioanesteziologické vědecké dny. Pardubice, CZ. 27.03.2008 - 28.03.2008. Zorg. ČSARIM.

Kotulák, T. **Plicní hypertenze u chlopenních srdečních vad.** Kardio 2008 - Co by měl vědět anesteziolog a intenzivista o srdečním selhání. Praha, CZ. Zorg. IPVZ.

Kotulák, T. **Obezita a metabolický syndrom v intenzivní péči.** Endokrinologie kritických stavů. Pardubice, CZ. Zorg. KARIM 1. LF UK a VFN v Praze.