

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



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

MUDr. Tomáš Kotulák

2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze

Školitel: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc

OBSAH

ABSTRAKT (CZ)	4
ABSTRACT (EN)	5
1. ÚVOD	6
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	10
3. MATERIÁL A METODIKA	11
4. VÝSLEDKY	14
5. DISKUZE	17
6. ZÁVĚRY	20
7. POUŽITÁ LITERATURA	21
8. TABULKY A GRAFY	25
9. SEZNAM PUBLIKACÍ	36

ABSTRAKT (CZ)

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.

V našich studiích jsme zvolili jako vhodný model stresového stavu pacienty podstupující elektivní kardiochirurgický výkon s použitím mimotělního oběhu.

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

ABSTRACT (EN)

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 counteracting insulin signalling at the postreceptor level.

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.

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).

Stresová hyperglykémie je důsledkem zvýšených hladin kortizolu, cytokinů, růstového hormonu, katecholaminů a glukagonu vedoucích ke 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.

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)

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'Anesthésiologie-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 (4,4 - 6,1 mmol/l) kontrolu glykémie v emergentních situacích. Důrazně doporučují vyloučení velkého kolísání glykémie.

Bílá tuková tkáň, a to 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 inzulinové rezistence, hyperlipidémie, a rozvoji metabolického syndromu (Ichai et al. 2010, Bulló et al. 2003, Hotamisligil et al. 2003). Tuková tkáň je 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).

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 molekulární hmotnosti 20 kDa, který byl primárně izolován z myších embryí (Nishimura et al. 2000). FGF-21 je metabolický regulátor, který má vztah k lipidovému metabolismu, metabolismu glukózy, inzulinové 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.

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).

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 prodlouženou 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). Velice zajímavou studii publikovalo Leuvenské 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. Tyto malé adipocyty mají výraznou schopnost absorbovat glukózu a triglyceridy a redukuje tak jejich možný škodlivý vliv (Langouche et al. 2010, Marques et al. 2013).

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.

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Vzhledem k vlivu některých adipokinů na inzulínovou 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 inzulínorezistence. Předpokládáme, že u těchto pacientů může dojít k významným změnám endokrinní funkce tukové tkáně, které mohou hrát roli při vzniku hyperglykémie a inzulínové rezistence u kriticky nemocných pacientů. Bližší identifikace těchto změn může v budoucnu umožnit jejich terapeutickou modulaci s pozitivním ovlivněním hyperglykémie a inzulínorezistence u kriticky nemocných pacientů.

Cílem projektu je blíže objasnit etiopatogenezu inzulínové 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 inzulínové senzitivity a metabolismu glukózy (triglyceridy, inzulín, 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 dynamiku plazmatických koncentrací FGF-21 a A-FABP a jejich souvislost s hyperglykemií a systémovým zánětem v perioperačním období u kardiochirurgických pacientů

3. MATERIÁL A METODIKA

Do obou studií byli zařazeni pacienti mužského pohlaví podstupující elektivní kardiokirurgický 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.

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.)

Pro stanovení mRNA exprese byly vzorky 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.

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 %.

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.

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 (interkvartilové 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 přiložených studií

4. VÝSLEDKY

Cílem první studie bylo sledování mRNA exprese FGF-21 v epikardiální a podkožní tukové tkáni a v kosterním svalu v průběhu elektivního kardiologického výkonu s použitím mimotělního oběhu. Dále jsme sledovali dynamiku změn sérových hladin FGF-21 v průběhu kardiologického 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. V tabulce 1 jsou uvedeny klinické charakteristiky pacientů zařazených do studie. (Tabulka 1.)

Sérové koncentrace FGF-21 narůstaly v průběhu operace s maximem 6 hodin po operaci s návratem k bazální hladině 96 hodin po operaci (obr. 1). 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. 1). 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. 1). Hladiny sledovaných cytokinů IL-6, IL-8, TNF- α a MCP-1 měly maximum do 6 hodin po operaci (obr. 2).

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. 3C) ani v podkožní tukové tkáni (obr. 3B) zatímco v epikardiální tukové tkáni došlo k signifikantnímu nárůstu mRNA exprese FGF-21 (obr. 3A).

Na začátku operace byla v kosterním svalu FGF-21 proteinová exprese 4.7krát vyšší ($p=0,014$) než v podkožní tukové tkáni (obr. 3D)

Cílem druhé 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 podskupiny diabetiků nebo nediabetiků. Jedenáct pacientů mělo T2DM léčený metforminem, 2 pacienti inzulínem, 5 pacientů a 4 pacienti byli léčeni pouze dietou. Hyperlipidémií mělo 13 pacientů a z toho 10 bylo léčeno atorvastatinem, dva fluvastatinem a jeden rosuvastatinem. V tabulce 2 jsou uvedeny klinické charakteristiky pacientů zařazených do studie (Tabulka 2.).

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. 4). 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. 4). Sérová hladina inzulínu měla maximální hodnotu u obou studijních skupin 6 hodin po operaci

a zůstala zvýšená po celou dobu sledování. Ve skupině diabetiků byla hladina sérového inzulínu signifikantně vyšší než ve skupině nediabetiků (obr. 4).

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. 5).

Kardiochirurgický výkon neměl signifikantní vliv na A-FABP mRNA expresi v tukové a svalové tkáni (obr. 6). 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. 6).

5. DISKUZE

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 první 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, inzulinová rezistence a systémová zánětlivá odpověď organismu způsobené kardiochirurgickým výkonem s použitím mimotělního oběhu jsou doprovázeny významným a časným vzestupem hladiny cirkulujícího FGF-21. 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 spíše s nutností pooperační léčby inzulinem? Navíc tato skupina měla signifikantně vyšší AUC sérového FGF-21. Jedno z možných vysvětlení těchto rozdílů je, že pacienti, kteří u nichž bylo pooperačně nutné podávat inzulin pro výraznější hyperglykémii, měli vyšší stupeň inzulinové rezistence. Proto u nich byl kompenzatorní vzestup exprese FGF-21 ve svalové tkáni vyšší.

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 inzulinové 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 inzulinové rezistence - je spojen s rozdílnou expesí FGF-21 ve svalu.

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 inzulinové 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.

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).

V naší studii jsme prokázali, že kardiochirurgická 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 inzulinové senzitivity a zánětlivých dějů můžeme konstatovat, že tento faktor je u kardiochirurgických 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.

6. ZÁVĚRY

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 prognostických faktorů některých kritických stavů. Oba faktory se nepochybně podílejí na regulaci 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.

7. POUŽITÁ 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. Baxa CA, Sha RS, Buelt MK, et al. Human adipocyte lipid-binding protein purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry.* 1989; 28:8683-8690
3. Bulló, M, Garcia-Lorda, P, Megias, I. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res.* 2003,11, s 525-531.
4. Dungan, KM., Braithwaite, SS., Preiser, JC.: Stress hyperglycaemia. *Lancet* 2009, 373, s 1798-1807
5. Engstrom, G, Hedblad, B, Stawenov, 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.
6. Finfer S, Chittock DR, Su SY.: Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med* 2009, 360, s 1283-1297
7. 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
8. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR, et al. Adipose

tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Mar 25;316(2):129-39

9. 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
10. 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
11. Hotamisligil, GS, Shargill, NS & Spiegelman, BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α - direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993, 259, s 87-91.
12. Hotamisligil, GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obesity* 2003, 27, Suppl. 3, s S53-S55.
13. 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
14. 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]
15. 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

16. Marques MB, Langouche L, et al. Endocrine, metabolic, and morphologic alterations of adipose tissue during critical illness. *Crit Care Med.* 2013 41:317-25.
17. McCowen, KC., Malhotra, A., Bistrian, BR.: Stress-induced hyperglycemia. *Crit Care Clin* 2001, 17, s 107 - 124
18. 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.
19. 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
20. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, et al. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology.* 2000; 141:3388-3396
21. Van Den Berghe, G., Wilmer, A., Hermans, G.: Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 2006, 354(5):449-461
22. 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
23. 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.

24. 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
25. 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
26. 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.

8. TABULKY A GRAFY

	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 ± 0,79	27,81 ± 0,67	30,63 ± 1,29	NS
Body surface area (m ²)	2,02 ± 0,04	1,96 ± 0,05	2,08 ± 0,07	NS
HOMA index T0	4,31 ± 0,71	4,39 ± 1,04	4,24 ± 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 ± 0,10	4,13 ± 0,17	4,01 ± 0,10	NS
Glykémie T0 (mmol/l)	6,1 ± 0,29	6,3 ± 0,49	5,8 ± 0,28	NS
Glykémie T3 (mmol/l)	8,5 ± 0,41	9,5 ± 0,62	7,5 ± 0,24	p = 0,005
Glykémie T5 (mmol/l)	6,3 ± 0,24	5,8 ± 0,29	6,9 ± 0,30	p = 0,027
CRP at T2 (mg/l)	1,4 ± 0,52	0,4 ± 0,11	2,5 ± 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

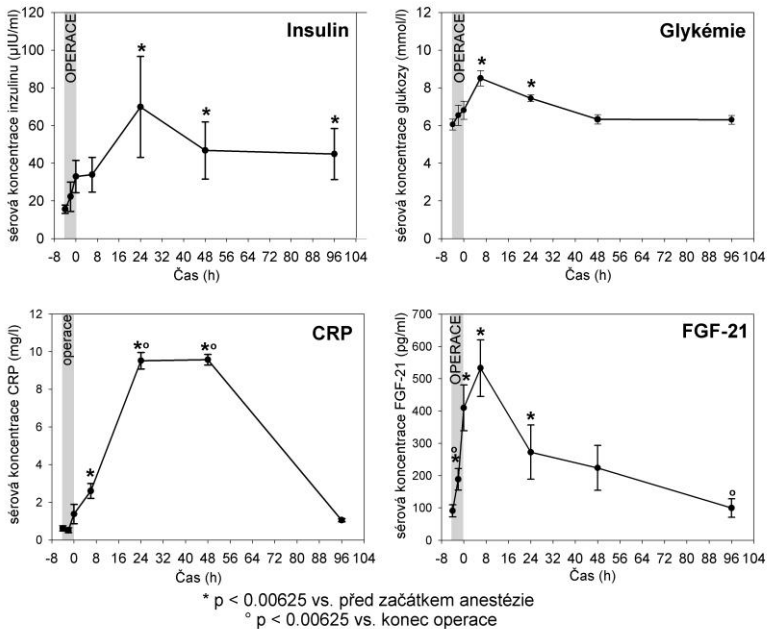
Klinická charakteristika souboru pacientů rozdělených na podskupinu s pooperační inzulinovou terapií (IT podskupina) a bez inzulinové terapie (NT podskupina). Výsledky jsou vyjádřeny jako medián (interkvartilové rozpětí) nebo průměr ± střední chyba průměru (SEM). Pro výpočet statistické významnosti byl 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

	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

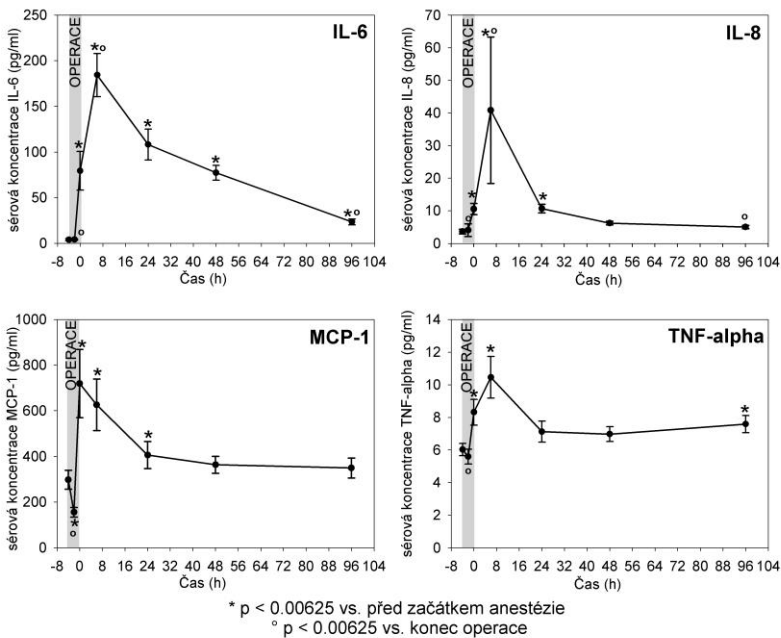
Tabulka 2

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.



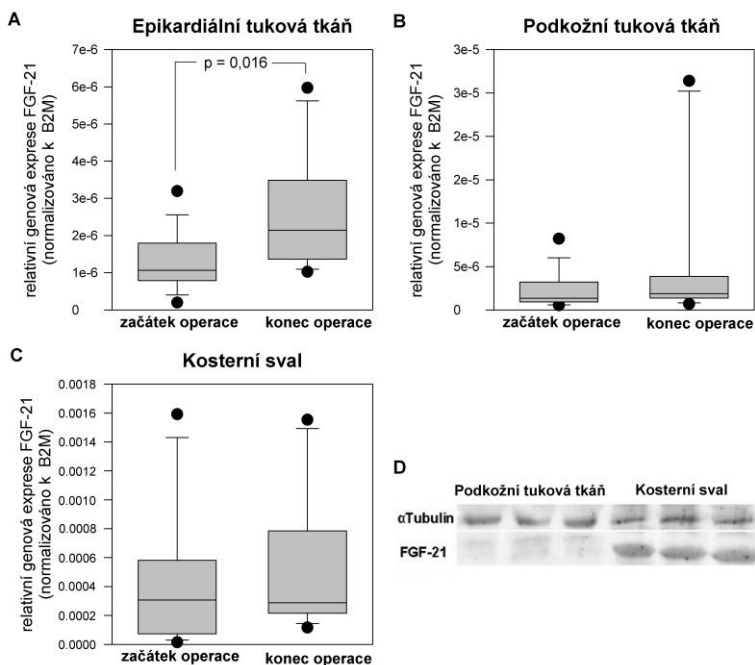
Obr 1

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.



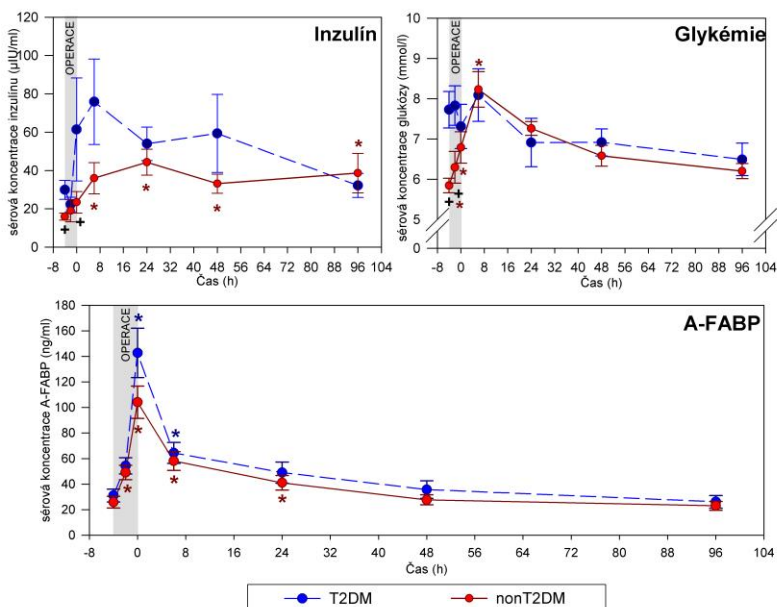
Obr 2

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.



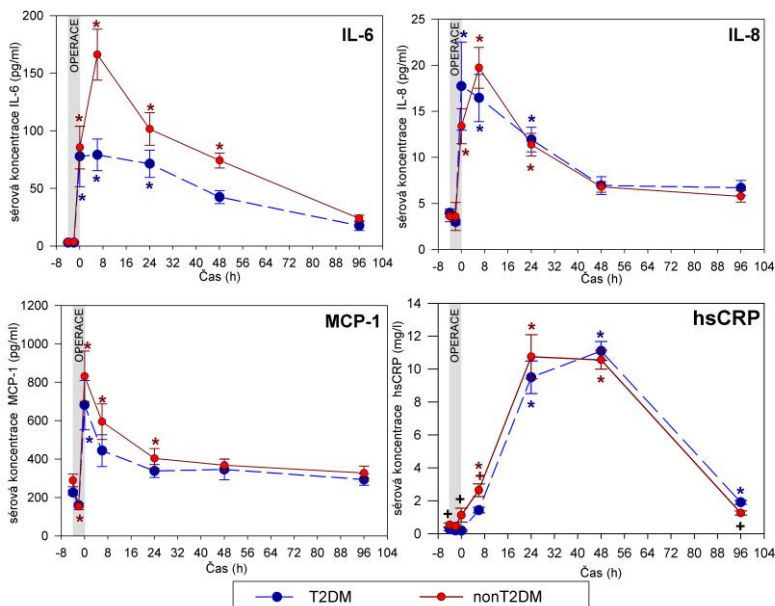
Obr 3

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 svaly na začátku operace (D). 70 μ g proteinového lyzátu protein bylo použito na každou detekci a jako kontrola byl alpha-tubulin.



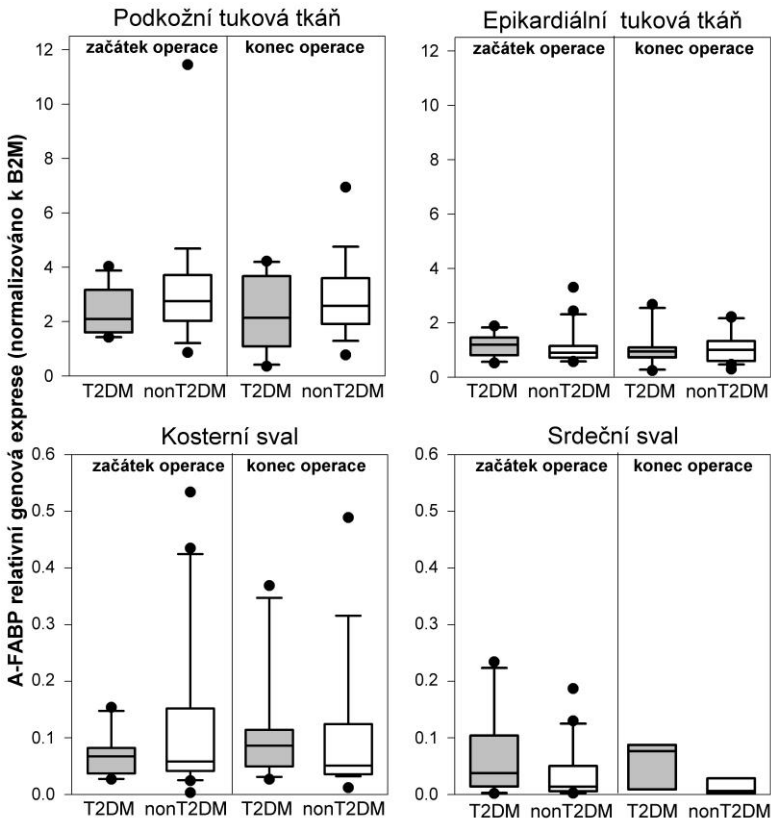
Obr 4

Sérové koncentrace inzulínu, 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 \pm 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.



Obr 5

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.



Obr 6

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).

9. SEZNAM PUBLIKACÍ

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace
 - a) s impact factorem
 - 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)
 - b) bez IF
 - 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)

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF

- 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)
- Riha 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., Střiteský, 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).

b) 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., Stříteský M **První endarterektomie arteria pulmonalis v 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., Pind'ák, 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., Pind'ák, 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. **Očist'ovací metody a akutní selhání ledvin: načasování, výběr metody a dávka RRT** Anest. Intenziv. Med., 19, č. 1, 2008,23-31. (Přehled).