



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Úloha tukové tkáně a jejích produktů při rozvoji inzulínové rezistence a
systémové zánětlivé reakce**

MUDr. Tomáš ROUBÍČEK

Praha 2009

Obsah

1	Úvod - tuková tkáň a její význam při vzniku diabetes mellitus 2. typu a metabolického syndromu	10
2	Systém renin-angiotenzin-aldosteron a tuková tkáň	15
2.1	Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron v tukové tkáni	16
2.2	Vliv inhibice systému renin-angiotenzin-aldosteron na vznik DM 2. typu	18
3	Hyperglykémie kriticky nemocných pacientů.....	21
3.1	Příčiny hyperglykémie a inzulínorezistence u kriticky nemocných.....	23
3.1.1	Stresové hormony – úloha hormonů hypofýzy a nadledvin.....	23
3.1.2	Prozánětlivé cytokiny a role tukové tkáně	24
3.1.3	Oxidační stres	25
3.1.4	Léky a výživa	25
3.1.5	Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a inzulínová rezistence u kriticky nemocných pacientů	26
4	Chronická renální insuficience a zánětlivý stav	27
4.1	MIAC syndrom	27
5	Diferenciace preadipocytů.....	31
5.1	Pref-1	32
6	Cíle dizertační práce	34
7	Metodika studií.....	35
7.1	Systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a inzulínová rezistence u kriticky nemocných	35
7.1.1	Soubor vyšetřovaných osob	35
7.1.2	Antropometrické vyšetření a odběr vzorků krve a tukové tkáně	36
7.1.3	Stanovení exprese mRNA pro angiotenzinogen, angiotenzin-konvertující enzym a receptor pro angiotenzin II.....	36
7.1.4	Statistická analýza	37
7.2	Úloha tukové tkáně při vzniku systémového zánětu u pacientů s chronickým selháním ledvin	38
7.2.1	Soubor vyšetřovaných osob	38
7.2.2	Antropometrické vyšetření a sběr vzorků krve a tukové tkáně.....	38
7.2.3	Hormonální a biochemické analýzy	39
7.2.4	Stanovení expresí mRNA	39
7.2.5	Imunohistochemické stanovení imunokompetentních buněk	40
7.2.6	Statistická analýza	40
7.3	Pref-1 a inzulínová rezistence	41
7.3.1	Soubor vyšetřovaných osob	41
7.3.2	Antropometrické vyšetření a sběr vzorků krve a tukové tkáně.....	41
7.3.3	Hormonální a biochemické analýzy	42
7.3.4	Stanovení exprese mRNA pro Pref-1	42
7.3.5	Statistická analýza	43
8	Výsledky.....	44
8.1	Systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a inzulínová rezistence u kriticky nemocných	44
8.2	Úloha tukové tkáně při vzniku systémového zánětu u pacientů s chronickým selháním ledvin	49
8.2.1	Antropometrické parametry a klinické charakteristiky souboru	49
8.2.2	Sérové koncentrace hormonů a cytokinů a jejich vztah k BMI a CRP	49
8.2.3	Změny exprese mRNA hormonů tukové tkáně a cytokinů a vztah k hladinám v cirkulaci.....	52

8.2.4	Imunohistochemické vyšetření tukové tkáně	53
8.3	Pref-1 a inzulínová rezistence	55
8.3.1	Exprese mRNA Pref-1 v podkožní a viscerální tukové tkáni u pacientek s obezitou a u kontrolní skupiny štíhlých žen	55
8.3.2	Srovnání kontrolní skupiny, pacientek s obezitou a obezitou a DM 2. typu....	56
8.3.3	Vliv diety s velmi nízkým obsahem kalorií na antropometrické, biochemické a hormonální parametry u obézních pacientek a obézních pacientek s DM 2. typu.....	58
9	Diskuze.....	61
9.1	Systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a inzulínová rezistence u kriticky nemocných	61
9.2	Úloha tukové tkáně při vzniku systémového zánětu u pacientů s chronickým selháním ledvin	63
9.3	Pref-1 a inzulínová rezistence	66
10	Závěr.....	67
11	Literatura	68
12	Seznam publikovaných článků a abstrakt	78
13	Příloha – Plná znění vybraných článků se vztahem k tématu práce.....	82

Souhrn:

Hyperglykémie a inzulínová rezistence jsou související patofyziologické stavy, které zvyšují riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob. Současné poznatky naznačují, že hlavní příčinou vzniku inzulínové rezistence může být porucha funkce tukové tkáně a následně ektopická akumulace lipidů ve svalové a jaterní tkáni. Tuková tkáň slouží organismu jako hlavní zásobárna energie. Funguje však také jako endokrinně aktivní orgán, pro což svědčí sekrece značného množství biologicky aktivních molekul jako jsou cytokiny, prozánětlivé a v menší míře i protizánětlivé faktory nebo komponenty systému renin-angiotenzin-aldosteron. Některé komponenty lokálního systému renin-angiotenzin-aldosteron produkované tukovou tkání mohou přímo vyvolávat lokální inzulínovou rezistenci v tukové tkáni.

K hyperglykémii a inzulínové rezistenci dochází také u kriticky nemocných pacientů a vystupňování tohoto stavu je spojeno s vyšší morbiditou a mortalitou. Naše předchozí studie prokázala, že tuková tkáň hraje v průběhu kritického onemocnění významnou roli při vzniku hyperglykémie díky zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů. První část této dizertační práce je proto zaměřena na lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron u kriticky nemocných pacientů jakožto další systém tukové tkáně, který je spojen s inzulínovou rezistencí. Naše studie prokázala, že kardiochirurgický zákrok zvýšil expresi mRNA pro angiotenzinogen v epikardiální ale nikoliv v podkožní tukové tkáni, což naznačuje možné zapojení systému renin-angiotenzin-aldosteron epikardiální tukové tkáně do vzniku lokální a případně i systémové inzulínové rezistence.

Další skupinou pacientů, která je ohrožena inzulínovou rezistencí a rychlým rozvojem aterosklerózy a následnými kardiovaskulárními komplikacemi, jsou pacienti s chronickým selháním ledvin. Druhá část této dizertační práce je proto zaměřena na změny, které prodělává tuková tkáň u pacientů s chronickým selháním ledvin a především pak na produkci prozánětlivých faktorů a lokální zánětlivou reakci v tukové tkáni. V naší práci jsme vycházeli z hypotézy, že zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni může ovlivňovat systémový prozánětlivý stav u pacientů s chronickým selháním ledvin na hemodialyzační léčbě a následně tak přispívat k vyšší kardiovaskulární mortalitě. Naše studie ukazuje, že tuková tkáň pacientů se selháním ledvin může být významným zdrojem prozánětlivých cytokinů a aktivace imunokompetentních buněk v tukové tkáni může představovat důležitou a

univerzální část systémové zánětlivé reakce, která zhoršuje inzulínovou rezistenci u pacientů se selháním ledvin.

Regulace rozdílných aspektů biologie tukové tkáně, především pak metabolismu, diferenciaci preadipocytů a doby přežití adipocytů, jsou nezbytné požadavky pro udržení adekvátního lipidového a glukózového metabolismu včetně normální citlivosti tkání na působení inzulínu. Preadipocytární faktor 1 (Pref-1) je relativně nově objevený protein, u kterého bylo prokázáno, že působí jako inhibitor diferenciaci preadipocytů. Ve třetí části práce jsme vycházeli z hypotézy, že Pref-1 může zásadním způsobem ovlivňovat glukózovou homeostázu a inzulínovou rezistenci u obézních pacientů s/bez DM 2. typu. Naše studie prokázala vyšší hladiny Pref-1 u obézních pacientů s DM 2. typu oproti zdravým jedincům a obézním pacientům bez DM 2. typu. Vyšší hladiny Pref-1 u obézních pacientů s DM 2. typu mohou potencionálně zhoršovat inzulínovou rezistenci a tím vést k výraznější poruše glukózového metabolismu. Léky snižující hladinu Pref-1 by v budoucnosti mohly vést komplexním mechanismem ke zlepšení inzulínové senzitivity u pacientů s inzulínovou rezistencí.

Summary:

Hyperglycemia and insulin resistance are tightly interconnected pathophysiological conditions that increase the risk for development of cardiovascular diseases. Our current knowledge indicates that one of important reasons leading to the development of insulin resistance could lie in a dysfunction of adipose tissue with subsequent ectopic lipids accumulation in muscles and liver. Adipose tissue represents the main body storage site of energy. Furthermore, adipose tissue is also an active endocrine organ producing numerous biologically active molecules, e.g. cytokines, proinflammatory or to a lesser degree anti-inflammatory factors or components of the renin-angiotensin-aldosterone system. Some of the components of the local renin-angiotensin-aldosterone system produced by the adipose tissue can directly induce local insulin resistance within the adipose tissue.

Hyperglycemia and insulin resistance are also common in critically ill patients and exaggeration of insulin resistance in these patients is accompanied by increased morbidity and mortality. Our previous study has demonstrated that adipose tissue plays an important role in the development of hyperglycemia and insulin resistance in critically ill patients by production of numerous proinflammatory cytokines. First part of this dissertation thesis is therefore focused on changes of local renin-angiotensin system in critically ill patients, because this system is tightly connected to the insulin resistance. In our study we found, that cardiac surgery increases angiotensinogen mRNA expression in epicardial but not in subcutaneous adipose tissue suggesting the possible involvement of epicardial adipose tissue in the process of development of local and possibly systemic insulin resistance in these patients.

Another group of patients endangered by insulin resistance and accelerated atherosclerosis with subsequent cardiovascular complications are patients with chronic kidney failure. The main focus of the second part of this dissertation thesis is the possible role of adipose tissue of patients with chronic kidney failure in the development of systemic inflammatory response. We tested the hypothesis that increased production of proinflammatory cytokines in the adipose tissue may influence the systemic proinflammatory state in patients with chronic kidney failure. Our study shows that adipose tissue of patients with kidney failure may represent a significant source of proinflammatory cytokines and activation of immunocompetent cells residing in adipose tissue may play an important and universal role in the

systemic inflammatory response, which worsen the insulin resistance in patients with kidney failure.

Appropriate regulation of different aspects of adipose tissue biology, including its metabolism, preadipocyte differentiation and apoptosis are necessary prerequisites for maintenance of adequate lipid and glucose metabolism including the normal degree of insulin sensitivity. Preadipocyte factor 1 (Pref-1) is a relatively recently discovered protein that inhibits preadipocyte differentiation. In this part dissertation thesis we therefore tested the hypothesis that circulating and/or local Pref-1 levels may fundamentally influence the glucose homeostasis and insulin resistance in obese patients with or without type 2 diabetes mellitus. Our study shows increased Pref-1 level in obese patients with type 2. diabetes mellitus compared to the both healthy subjects and obese patients without type 2 diabetes mellitus. Higher levels of Pref-1 in obese diabetic patients may potentially worsen insulin resistance. Drugs decreasing the Pref-1 level could in the future potentially lead to improvement of insulin sensitivity by a complex mechanism in patients with insulin resistance.

Poděkování:

Úvodem bych chtěl vyjádřit veliké poděkování mému školiteli Prof. MUDr. Martinovi Haluzíkovi, DrSc. za vedení v průběhu mého doktorského studia, předání zkušeností potřebných k vědecké práci a vedení a podněty při vypracování doktorské dizertační práce. Zároveň bych chtěl poděkovat Prof. MUDr. Štěpánovi Svačinovi, DrSc. MBA, který mi jako přednosta III. interní kliniky 1. LF UK a VFN v Praze vytvořil vynikající podmínky k postgraduálnímu studiu a další práci. Děkuji také pracovnícím naší laboratoře, paní Jitce Jahodové, Renatě Pavlovičové, Mgr. Markétě Bártlové a dalším za laboratorní zpracování vzorků a vynikající spolupráci.

Všem výše uvedeným děkuji za velice přátelský přístup během mého postgraduálního studia.

Seznam použitých zkratek:

ACE	angiotenzin-konvertující enzym
Apo-E	apolipoprotein E
ASP	acylation stimulating protein
AT ₁ R	receptor typu 1 pro angiotenzin II
BMI	body mass index
CETP	cholesterol ester transfer protein
CMP	cévní mozková příhoda
CRP	C-reaktivní protein
DM	diabetes mellitus
GLUT-4	glukózový transportér 4
HAART	highly active antiretroviral treatment
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HGF	hepatocyte growth factor
HIV	human imunodeficiency virus
ICAM	inter-cellular adhesion molecule 1
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IL	interleukin
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MEK/ERK	mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase
MIAC	malnutrition, inflammation, atherosclerosis, calcifications syndrom
MIF	macrophage migration inhibitory factor
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphat
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
Pref-1	preadipocyte factor-1
SAT	podkožní tuková tkáň
SEM	střední chyba průměru
TGF- β	transforming growth factor β
TNF- α	tumor necrosis factor α
VAT	viscerální tuková tkáň
VCAM	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Úvod - tuková tkáň a její význam při vzniku diabetes mellitus 2. typu a metabolického syndromu

Diabetes mellitus 2. typu (DM 2. typu) je onemocnění, které výrazně zvyšuje riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob. Tyto nemoci se pak stávají hlavními příčinami morbidity a mortality diabetiků (1). Prevalence DM 2. typu celosvětově velmi rychle roste a předpokládá se, že v roce 2030 bude tímto onemocněním postiženo více než 366 miliónů osob (2). Ačkoliv primární příčina DM 2. typu není stále známa, je všeobecně akceptováno, že v rozvoji tohoto onemocnění hraje klíčovou roli inzulinová rezistence periferních tkání v kombinaci s relativní insuficiencí inzulinové sekrece (3). Pro DM 2. typu je typická komplexní metabolická porucha vedoucí k prozánětlivému, hyperkoagulačnímu stavu, který predisponuje pacienty ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění, a který je spojen s dalšími rizikovými faktory pro aterosklerózu včetně dyslipidémie, arteriální hypertenze, zánětu a poruch hemostázy (1). Úzké spojení obezity/inzulinové rezistence, DM 2. typu, dyslipidémie a dalších nemocí v rámci tzv. metabolického syndromu bylo prokázáno v mnoha klinických studiích (4; 5). Kombinace těchto onemocnění představuje významný rizikový faktor pro rozvoj akcelerované aterosklerózy a souvisejících komplikací (6; 7). Mechanizmy, které spouštějí inzulinovou rezistenci, zůstávají i přes velké pokroky výzkumu v této oblasti stále objasněny pouze částečně. Současné poznatky však naznačují, že jednou z důležitých příčin vzniku inzulinové rezistence může být komplexní porucha funkce tukové tkáně a následně ektopická akumulace lipidů a jejich metabolitů ve svalové a jaterní tkáni.

Bílá tuková tkáň slouží organismu jako hlavní zásobárna energie. Uložená energie ve formě triglyceridů je uvolňována v období nedostatku potravy a slouží jako zdroj energie pro ostatní tkáně. Tuková tkáň však také funguje jako endokrinně aktivní orgán, pro což svědčí sekrece celé řady biologicky účinných molekul - například leptinu, adiponektinu, resistinu, TNF- α , IL-6 a PAI-1 (viz také Tab. 1) (6; 8-11). Tyto cytokiny (adipokiny) regulují četné a mnohdy klíčové aspekty fyziologických pochodů včetně ovlivnění příjmu potravy, energetického metabolismu, imunitních funkcí a reprodukce. Tuková tkáň je dnes považována za klíčový orgán regulující energetickou rovnováhu včetně metabolismu glukózy a lipidů. Porucha tukové tkáně se pak projeví právě dysregulací těchto pochodů. Tuková tkáň se může podílet svou

endokrinní (dys)funkcí na rozvoji inzulínové rezistence a ovlivnění kardiovaskulárního systému u pacientů s obezitou, DM 2. typu i u kriticky nemocných pacientů (12-17). Předpokládá se, že především více metabolicky aktivní viscerální tuková tkáň by mohla být místem, kde začíná subklinický zánět, který může posléze vést k dalším onemocněním a metabolickým komplikacím (18).

Tuková tkáň produkuje nejen prozánětlivé faktory a hormony (8-11), ale také mnoho jiných molekul mezi nimiž jsou i komponenty systému renin-angiotenzin-aldosteron (19-21). Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron je zapojen do změn orgánové struktury a jejich funkcí ovlivněním genové exprese, růstu, fibrózy a zánětlivé odpovědi, přičemž v současné době je tento systém zkoumán také v tukové tkáni pro svůj možný příspěvek k rozvoji lokální i systémové inzulínové rezistence (22-24). Ukazuje se, že některé komponenty systému renin-angiotenzin-aldosteron produkované tukovou tkání mohou přímo vyvolávat inzulínovou rezistenci například zvýšenou produkcí volných kyslíkových radikálů a snížení produkce leptinu a adiponektinu (25; 26). Naše předchozí studie prokázala, že i tuková tkáň hraje v průběhu kritického onemocnění významnou roli při vzniku hyperglykémie u kriticky nemocných díky zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů (27). První část této dizertační práce je proto zaměřena na další systém tukové tkáně, který je spojen s inzulínovou rezistencí, lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron. Pracovní hypotézou bylo, že i tento systém v tukové tkáni prodělává v průběhu kritického onemocnění významné změny a může se tak podílet na vzniku systémové inzulínové rezistence a následných komplikací při kritickém onemocnění.

Další početnou skupinou pacientů, která je ohrožena rychlým rozvojem aterosklerózy a následnými kardiovaskulárními komplikacemi, jsou pacienti s chronickým selháním ledvin (28; 29). I přes značné pokroky v technice hemodialýzy zůstává úroveň mortality u skupiny pacientů s chronickým selháním ledvin léčených hemodialyzační léčbou stále vysoká (30). Tradiční rizikové faktory jako hypertenze, chronické srdeční selhání, dyslipidémie a DM 2. typu mohou pouze částečně vysvětlit značné zvýšení kardiovaskulární mortality u této skupiny pacientů. Proto jsou zvažovány i další netradiční faktory, které mohou k tomuto stavu přispívat (28; 31). Malnutrition, inflammation, atherosclerosis, calcifications (MIAC) syndrom je v poslední době stále častěji zmiňován jako hlavní příčina zvýšené kardiovaskulární mortality u pacientů s chronickým selháním ledvin (32). Tuková tkáň produkuje celou řadu prozánětlivých

cytokinů, a je tedy v organismu významným zdrojem těchto faktorů jak u pacientů s obezitou, aterosklerózou a/nebo s DM 2. typu, tak u kriticky nemocných (27; 33). Další část této práce je proto zaměřena na změny, které prodělává tuková tkáň u pacientů s chronickým selháním ledvin a především pak na produkci prozánětlivých faktorů a lokální zánětlivou reakci v tukové tkáni u této skupiny pacientů. Naší hypotézou bylo, že zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni může ovlivňovat systémový prozánětlivý stav u pacientů s chronickým selháním ledvin na hemodialyzační léčbě a následně tak přispívat k vyšší kardiovaskulární mortalitě.

Regulace rozdílných aspektů biologie tukové tkáně, především pak metabolismu, diferenciaci preadipocytů a doby přežití adipocytů, jsou nezbytné požadavky pro udržení adekvátního lipidového a glukózového metabolismu. Preadipocytární faktor 1 (Pref-1) je relativně nově objevený protein, u kterého bylo prokázáno, že působí podobně jako například angiotenzin II jako inhibitor diferenciaci preadipocytů ve zralé adipocyty (34). Hypotézou, kterou jsme ověřovali v této části dizertace, bylo, že Pref-1 může zásadním způsobem ovlivňovat glukózovou homeostázu a inzulínovou rezistenci. Poslední část práce je proto zaměřena na metabolické charakteristiky, které jsou spojeny se změnami sérové hladiny Pref-1 u osob s obezitou s/bez DM 2. typu v porovnání se zdravými jedinci.

Tab. 1 – Proteiny a další faktory produkované a secernované bílou tukovou tkání a jejich funkce v organismu.

Substance	Biologický účinek
Leptin	Signál pro centrální nervovou soustavu o celkových energetických zásobách organismu
Adiponektin	Zvyšuje inzulínovou senzitivitu, působí protizánětlivě a zpomaluje progresi aterosklerózy
Resistin	Zvyšuje inzulínovou rezistenci, systémová zánětlivá odpověď
TNF- α	Lipolýza, zvyšuje spotřebu energie a inzulínovou rezistenci
Interleukin-6	Prozánětlivý, lipolytický, snižuje inzulínovou senzitivitu
Adipsin	Aktivuje alternativní cestu komplementu
ASP (acylation stimulating protein)	Stimuluje syntézu triacylglycerolů v bílé tukové tkáni
Angiotenzinogen	Prekurzor angiotenzinu II, zapojen do regulace arteriálního krevního tlaku, zvyšuje inzulínovou rezistenci
PAI-1	Inhibuje aktivaci plazminogenu, brání fibrinolýze
Tkáňový faktor	Iniciuje koagulační kaskádu
VEGF (vascular endothelial growth factor)	Stimuluje angiogenezu v bílé tukové tkáni
Visfatin	Inzulinomimetický účinek
Monobutyrin	Vasodilatace a indukce novotvorby cév
TGF- β (transforming growth factor- β)	Regulace řady procesů v bílé tukové tkáni včetně proliferace preadipocytů a diferenciaci, růst a apoptóza adipocytů
IGF-1 (insulin-like growth factor 1)	Stimuluje proliferaci a diferenciaci adipocytů
HGF (hepatocyte growth factor)	Stimuluje diferenciaci a růst adipocytů
MIF (macrophage migration inhibitory factor)	Imunoregulace
Pref-1 (preadipocyte factor-1)	Inhibice diferenciaci preadipocytů
Lipoproteinová lipáza	Enzym stimuluje hydrolýzu lipoproteinů v chylomikrách a VLDL (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou)
CETP (cholesterol ester	Přenáší estery cholesterolu mezi lipoproteiny

transfer protein)	
Apo-E	Proteinová součást lipoproteinů
Prostaglandiny	Regulace mnoha buněčných pochodů, aktivní během zánětu, hemokoagulace, ovulace a sekrece žaludeční kyseliny
Estrogeny	Produkovány aromatázou, tuková tkáň je v podstatě hlavní zdroj estrogenů u mužů a žen po menopauze
Glukokortikoidy	Produkovány 11-hydroxysteroid-dehydrogenázou 2. typu, která přeměňuje kortison na kortizol v bílé tukové tkáni
Apelin	Biologická úloha není dosud známa, ale pravděpodobně spojení s energetickou zásobou organismu

Upraveno dle Fonseca-Alaniz M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Journal de Pediatria*, 2007. (11)

2 Systém renin-angiotenzin-aldosteron a tuková tkáň

Systém renin-angiotenzin-aldosteron je tradičně vnímán jako důležitý regulační mechanismus systémového krevního tlaku, homeostázy vody a elektrolytů (35; 36). Pozitivní korelace mezi plazmatickou hladinou angiotenzinogenu a krevním tlakem byla poprvé popsána v roce 1979 (37). Tento systém představuje hormonální kaskádu, na jejímž počátku je syntéza reninu juxtaglomerulárními buňkami sousedícími s aferentní arterioulou ledvinného glomerulu (38). Renin je syntetizován jako preprohormon a po enzymatickém štěpení je ukládán v granulích juxtaglomerulárních buněk a připraven k sekreci (39).

Aktivní sekrece reninu je regulována 4 nezávislými faktory (40): 1) prostřednictvím renálního systému baroreceptorů v aferentní arteriole, který reaguje na změny perfuzního tlaku ledvin; 2) reakce na změny koncentrace NaCl registrované buňkami macula densa distálního tubulu; 3) stimulací sympatiku přes β -1 adrenergní receptory; a 4) negativní zpětnou vazbou pomocí působení angiotenzinu II na juxtaglomerulární buňky.

Regulace uvolnění reninu je klíčová v celém řízení systému renin-angiotenzin-aldosteron. Po uvolnění do systémové cirkulace renin působí jako enzym a štěpí játry produkovaný angiotenzinogen, který se svou molekulovou hmotností řadí mezi globuliny, na biologicky inaktivní decapeptid angiotenzin I (39). Ten je dále hydrolyzován angiotenzin-konvertujícím enzymem (ACE) na angiotenzin II, který je biologicky velmi aktivní a váže se na čtyři druhy receptorů (41). Vazba na receptor typu 1 pro angiotenzin II (AT_1R) je nejvíce prozkoumána (42). Jejím prostřednictvím vzniká účinek na kardiovaskulární systém (vasokonstrikce, zvýšení krevního tlaku, zvýšení kontraktility myokardu, hypertrofie srdce a cév), na ledviny (renální tubulární reabsorpce natria, inhibice uvolnění reninu), na sympatikus a na kůru nadledvin (stimulace syntézy aldosteronu). Vazba na AT_1R také ovlivňuje buněčný růst, proliferaci buněk, zánětlivou odpověď a oxidační stres. Daleko slabší vazba na receptor typu 2 (AT_2R) způsobuje vasodilataci, má antiproliferační účinky a ovlivňuje apoptózu. Vazbou na receptor typu 4 (AT_4R) dochází k ovlivnění funkcí endotelu jako například vyplavení molekuly PAI-1. Účinky vazby na receptor typu 3 (AT_3R) nejsou dosud objasněny.

Ačkoliv systém renin-angiotenzin-aldosteron hraje důležitou roli v udržení normální cirkulační homeostázy, kontinuální nebo neadekvátní aktivace tohoto systému se

podílí na patofyziologických dějích jako jsou například sekundární nebo esenciální arteriální hypertenze, srdeční selhání a dalších stavech vedoucích k retenci tekutin ve tkáních (např. jaterní cirhóza nebo nefrotický syndrom) (43; 44). Extravazální retence tekutin vede k hypoperfuzi ledvin díky redukcí efektivního cirkulujícího objemu, což vyvolává hypersekreci reninu vedoucí k sekundárnímu hyperaldosteronizmu, který ale dále přispívá k progresi otoků. Navíc účinek zvýšení angiotenzinu II při srdečním selhávání na periferní vaskulární rezistenci zvyšuje „dotížení“ (afterload) levé komory a urychluje progresi komorové dysfunkce (45).

Blokáda systému renin-angiotenzin-aldosteron je v posledních dvou desetiletích s úspěchem používána u řady patofyziologických stavů jmenovaných výše (46-51). Léčivý můžeme ovlivnit tento systém na několika úrovních. První skupinu představují inhibitory ACE, druhou blokátory receptoru typu 1 pro angiotenzin II (sartany), a od roku 2007 je možné používat novou látku aliskiren, což je přímý inhibitor reninu (52; 53). Blokátory ACE a blokátory receptoru pro angiotenzin jsou v současné době používány v léčbě arteriální hypertenze, diabetické nefropatie, poinfarktové dysfunkce levé komory a chronického srdečního selhání, přičemž jejich použití je spojeno se zlepšením přežití a prospěšnými účinky na kardiovaskulární systém a ledviny u vysoce rizikových pacientů (50).

2.1 Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron v tukové tkáni

Produkce komponent systému renin-angiotenzin-aldosteron (angiotenzinogenu a následně angiotenzinu II, angiotenzin-konvertujícího enzymu, receptoru typu 1 pro angiotenzin II) byla prokázána kromě ledvin také v řadě různých tkání jakou jsou například nadledviny, mozek, srdce a cévy (35). Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron je zapojen do změn orgánové struktury a jejich funkcí ovlivněním genové exprese, růstu, fibrózy a zánětlivé odpovědi (22; 24). Známý je podíl renálního systému renin-angiotenzin-aldosteron na fibrotické přestavbě ledvin u zánětlivých a metabolických onemocnění, pro které je v současné době s dobrým terapeutickým efektem využívána farmakologická blokáda systému renin-angiotenzin-aldosteron (54).

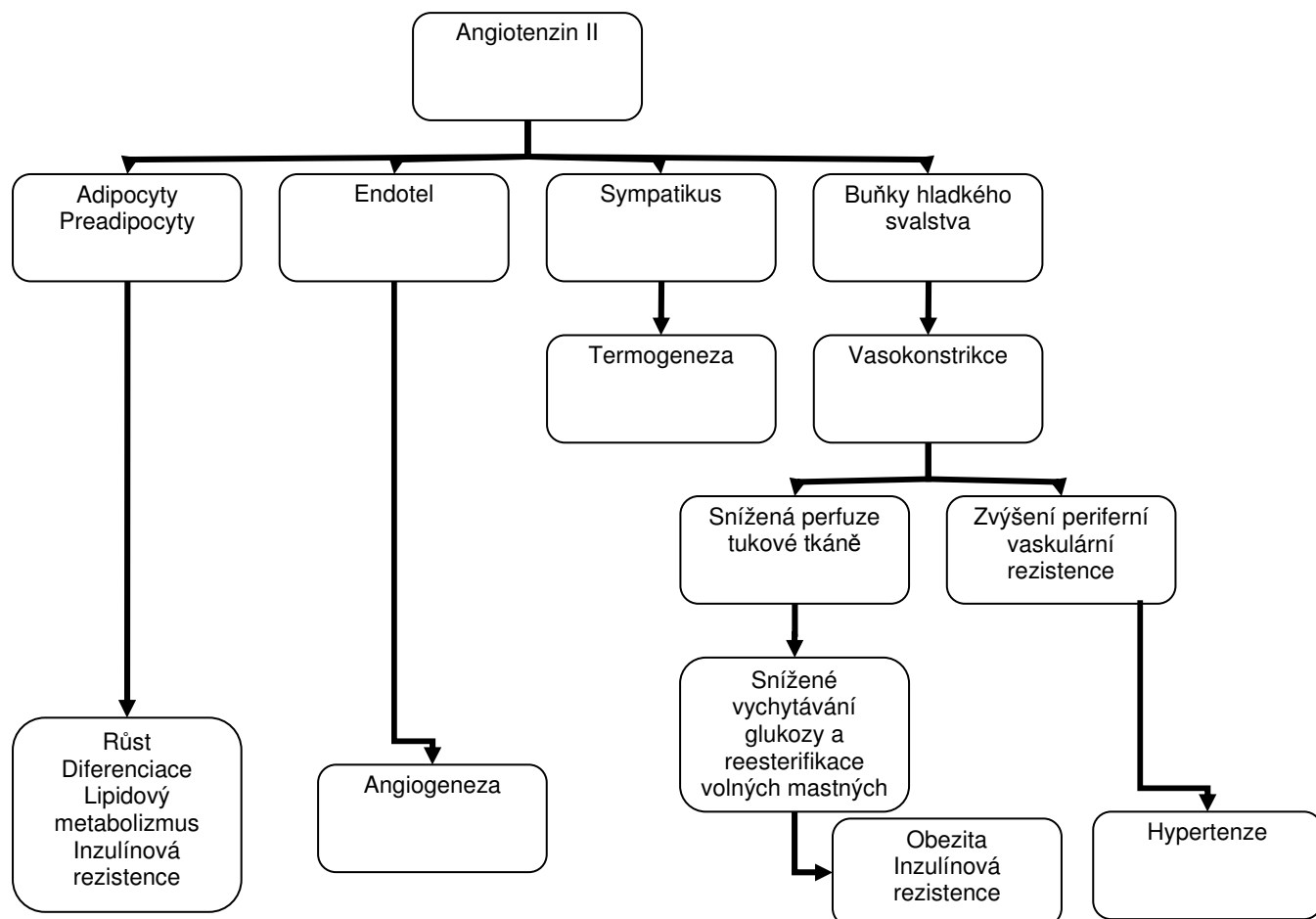
V tukové tkáni byla prokázána produkce nejen prozánětlivých faktorů a hormonů (8-10; 12), ale také mnoha jiných molekul mezi nimi i komponent systému renin-

angiotenzin-aldosteron (19-21). Sekrece angiotenzinogenu byla detekována v lidské tukové tkáni, v primokultuře adipocytů a v preadipocytech (54), přičemž v preadipocytech je tvorba angiotenzinu II v průběhu diferenciacce zvýšená (55). U potkanů s dietně vyvolanou obezitou a arteriální hypertenzí byla zjištěna vyšší exprese mRNA pro angiotenzinogen v tukové tkáni a zvýšené koncentrace plazmatického angiotenzinogenu a angiotenzinu II, což svědčí pro významný podíl adipocytární produkce těchto látek u obezity (56).

Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně je v současné době studován pro svůj možný příspěvek k rozvoji systémové inzulínové rezistence (22; 23). Poslední studie ukazují, že některé komponenty systému renin-angiotenzin-aldosteron (například angiotenzin II) produkované tukovou tkání mohou přímo vyvolávat inzulínovou rezistenci, zvyšovat produkci volných kyslíkových radikálů a snižovat produkci leptinu a adiponektinu (25; 26).

Obr. 1 - Předpokládané účinky angiotenzinu II.

Upraveno dle Engeli S et al., Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. Hypertension 2000. (19)



2.2 Vliv inhibice systému renin-angiotenzin-aldosteron na vznik DM 2. typu

Mnoho velkých klinických randomizovaných studií s léčivými inhibujícími systémem renin-angiotenzin-aldosteron podávanými za účelem terapie jiných chorob než je DM 2. typu prokázalo, že incidence DM 2. typu je statisticky významně snížena u nediabetiků léčených inhibitory ACE a blokátory receptoru typu 1 pro angiotenzin II (57-61). Za účelem vyhodnocení těchto studií byla již provedena celá řada meta-analýz (62-64). Meta-analýza, kterou provedli Andraws a Brown v roce 2007 zahrnuje 13 studií, které vyhověly požadavkům na randomizaci a její zaslepení, měly zakončené sledovací období a objektivní zhodnocení výsledků dle zásad správného

provedení meta-analýz (65; 66). Hodnocené studie s inhibitory ACE byly studie CAPPP (použitá látka captopril) (58), STOP-2 (enalapril, lisinopril) (67), HOPE (ramipril) (61), ALLHAT (lisinopril) (68), SOLVD-Montreal substudy (enalapril) (60), ANBP-2 (enalapril) (69), PEACE (trandolapril) (70) a ASCOT-BPLA (perindopril) (71). Mezi studiemi se sartany byly hodnoceny studie LIFE (losartan) (57), CHARM-Overall (candesartan) (48), SCOPE (candesartan) (72), ALPINE (candesartan) (73) a VALUE (valsartan) (74).

V hodnocených studiích bylo sledováno celkem 93 451 pacientů, přičemž 41 950 pacientů užívalo buď inhibitory ACE nebo sartany a zbytek pacientů užíval buď placebo nebo jinou kontrolní medikaci. Antagonisté systému renin-angiotenzin-aldosteron snížili incidenci DM 2. typu z 9 % u neléčených na 7,1 % u léčených pacientů, což představuje 26% snížení rizika (OR 0,74, 95% interval spolehlivosti 0,66 – 0,81, $p < 0,001$). Účinek byl srovnatelný u studií hodnotící pouze pacienty s arteriální hypertenzí (OR 0,73, 95 % interval spolehlivosti 0,66 – 0,82, $p < 0,001$) se studiemi hodnotícími klinické účinky inhibice systému renin-angiotenzin-aldosteron u pacientů s aterosklerózou a srdečním selháním (OR 0,67, 95 % interval spolehlivosti 0,50 – 0,90, $p = 0,008$). Inhibitory ACE a sartany mají na incidenci DM 2. typu srovnatelný efekt. 8 studií s inhibitory ACE prokázalo snížení odds incidence DM 2. typu o 28 % (OR 0,72, 95 % interval spolehlivosti 0,63 – 0,84, $p < 0,001$) a 5 studií se sartany prokázalo redukci odds o 27 % (OR 0,73, 95 % interval spolehlivosti 0,64 – 0,84, $p < 0,001$). Poslední poznatky tedy potvrzují, že inhibice systému renin-angiotenzin-aldosteron přispívá k prevenci DM 2. typu.

Molekulární mechanismus snížené incidence DM 2. typu při inhibici systému renin-angiotenzin-aldosteron nebyl dlouhou dobu znám. Poslední údaje naznačují, že zvýšená lokální hladina angiotenzinu II přímo ovlivňuje inzulínovou signální kaskádou na úrovni aktivace fosfatidyl-inositol-3-kinázy a zvyšuje lokální oxidační stres v tukové tkáni (25). Experimentální studie na myších s geneticky a dietně indukovanou obezitou dokázala, že léčba s blokátory receptoru typu 1 pro angiotenzin II brání poklesu plazmatických hladin adiponektinu (26). Také studie s lidskými adipocyty ukazuje, že léčba telmisartanem (blokátor receptoru typu 1 pro angiotenzin II) stimuluje transkripci genu pro adiponektin (75). To naznačuje, že angiotenzin II snižuje sérové hladiny adiponektinu, což může dále přispívat k rozvoji inzulínové rezistence. Angiotenzin II vznikající v tukové tkáni také inhibuje diferenciaci preadipocytů ve zralé adipocyty, což potenciálně může vést ke snížení počtu

adipocytů, snížené kapacity tukové tkáně k ukládání tuků, následnému ukládání tuků ve svalech a jaterní tkáni, a zvýšení inzulínové rezistence (22). K pochopení kompletního mechanismu, který je odpovědný za snížení incidence DM 2. typu při inhibici systému renin-angiotenzin-aldosteron, je ale nutné provedení dalších experimentálních a klinických studií.

3 Hyperglykémie kriticky nemocných pacientů

Naprostá většina akutních onemocnění nebo zranění je provázena vznikem intolerance glukózy, hyperglykemií a inzulínovou rezistencí (76-78). Hyperglykémie kriticky nemocných je definována jako zvýšení hladiny glykémie nad fyziologickou mez v akutní fázi těžšího onemocnění. Tento jev je přítomen jak u jedinců s dosud zcela normálními hladinami glykémie, tak i u diabetiků, kde se tato změna může projevit těžkou dekompenzací diabetu (77).

Tato akutní hyperglykemická reakce byla dlouho považována za adaptační reakci organismu na aktuální ohrožení, která umožňuje zvýšený vstup glukózy do buněk non-inzulín dependentních tkání a zlepšuje přežití kriticky nemocných pacientů.

Nové informace, které byly získány v posledních několika letech, ale vedly ke změně tohoto pohledu na stresovou hyperglykémii. Dle dnešních poznatků je hyperglykémie u kriticky nemocných spojena se zvýšenou morbiditou (zvýšený výskyt infekcí (79; 80), periferní polyneuropatie (81), poruchy koagulace (82) a další) i zvýšenou mortalitou (78; 83). Bylo prokázáno, že zvýšená hladina glukózy hraje významnou roli při ovlivnění kaskády zánětlivých cytokinů a tvorby volných kyslíkových radikálů v průběhu akutního onemocnění (13; 84).

Doba strávená v hyperglykémii u kriticky nemocných pacientů pozitivně koreluje s působením akutních stresorů a stavem glukózového metabolismu v premorbidním období charakterizovaným hladinou glykovaného hemoglobinu (HbA1c) (85). Pacienti s nižší vstupní hodnotou HbA1c jsou méně predisponováni ke vzniku hyperglykémie v průběhu kritického onemocnění než pacienti s vyššími, ale stále normálními hladinami HbA1c. Prognóza nemocných bez anamnézy DM přijatých do nemocnice se vstupní glykemií nalačno více než 7 mmol/l je spojena se zvýšeným rizikem komplikací a úmrtí (86). Prevalence výskytu hyperglykémie u pacientů s infarktem myokardu (IM) je udávána až 70% (87) a u pacientů s cévní mozkovou příhodou (CMP) 10-40% (více než 50% s elevací HbA1c) (88). Inzulínorezistence kriticky nemocných obdobně jako hyperglykémie koreluje se závažností akutního stavu. Hyperglykémie již v rozmezí 6,1 – 8,0 mmol/l u nediabetiků je spojena s téměř 4x vyšším rizikem úmrtí ve srovnání s normoglykemickými jedinci (87).

Tab. 2 - Účinky hyperglykémie na orgánové systémy u kriticky nemocných

Imunitní systém
<ul style="list-style-type: none">• ↓ aktivace komplementu• ↓ adhezní schopnosti granulocytů• ↓ fagocytózy• ↓ chemotaxe• ↓ oxidační vzplanutí

Kardiovaskulární systém - myokard
<ul style="list-style-type: none">• ↑ oxidační stres• ↓ kontraktilita• ↑ elektrická nestabilita• ↑ arytmie

Neurologický systém
<ul style="list-style-type: none">• acidóza mozkové tkáně• ↑ laktátu v mozku• ↑ propustnost hematoencefalické bariéry• ↑ výskyt periferní polyneuropatie

Koagulace
<ul style="list-style-type: none">• ↑ plazmatický aktivátor plazminogenu• ↓ fibrinolýza• trombocyty<ul style="list-style-type: none">○ změny vlastností membrány○ ↑ reaktivita○ ↑ vazba na fibrinogen○ ↑ tvorba tromboxanu A₂○ ↑ tvorba inozitol trifosfátu○ ↑ mobilizace kalcia

Tab. 3 - Důsledky hyperglykémie u kriticky nemocných

<ul style="list-style-type: none">• ↑ výskyt infekcí (infekce ran, pneumonie, močové infekce)• ↑ multiorgánového selhání• ↑ výskyt periferní polyneuropatie• ↑ poruchy koagulace

3.1 Příčiny hyperglykémie a inzulinorezistence u kriticky nemocných

3.1.1 Stresové hormony – úloha hormonů hypofýzy a nadledvin

Při výskytu hyperglykémie u kriticky nemocných pacientů se jedná o komplexní změnu v regulaci metabolických a hormonálních funkcí v průběhu akutní (hodiny až dny) a následně chronické fáze stresu (dny až týdny) (77). Dochází k výraznému ovlivnění sekrece adenohipofyzárních hormonů s následným ovlivněním činnosti periferních endokrinních žláz a dalších orgánů (89). Především v chronické fázi kritického onemocnění je pulzatilní sekrece hormonů adenohipofýzy značně snížena (90). Dysfunkce adenohipofýzy je v poslední době dávána také do souvislosti se sníženou hladinou ghrelinu v průběhu akutní fáze závažné choroby (78).

Stresová reakce vyvolává v organizmu vyplavení celé řady hormonů, které v mnoha případech přímo ovlivňují vznik hyperglykémie u kriticky nemocných. Jedná se o katecholaminy, které vyvolávají inzulinorezistenci v jaterní i svalové tkáni negativním ovlivněním postreceptorové inzulinové signální kaskády (49). Důsledkem je zvýšená jaterní glukoneogeneza, zvýšená svalová a jaterní glykogenolýza a akcelerovaná lipolýza. Uvedené negativní účinky jsou navíc potencovány vlivem katecholaminů na snížení sekrece inzulinu (91). Glukagon vyvolává zvýšení glukoneogeneze a jaterní glykogenolýzy (92). Glukokortikoidy i růstový hormon způsobují inzulinorezistenci kosterního svalstva, zvýšenou lipolýzu a potencují jaterní glukoneogenezu (77). Kombinace výše uvedených jevů tedy vede k hyperglykémii, která vzniká především z důvodu značné inzulinorezistence periferních tkání, relativně snížené sekrece inzulinu beta-buňkami pankreatu a zvýšené produkce glukózy jaterní tkání.

Tab. 4 - Účinky periferních hormonů na metabolismus glukózy

<ul style="list-style-type: none">• Katecholaminy<ul style="list-style-type: none">○ ↑ jaterní glukoneogeneza○ ↑ jaterní a svalová glykogenolýza○ ↑ lipolýza○ ↓ sekrece inzulínu• Glukagon<ul style="list-style-type: none">○ ↑ jaterní glukoneogeneza○ ↑ jaterní glykogenolýza• Glukokortikoidy, Růstový hormon<ul style="list-style-type: none">○ ↑ jaterní glukoneogeneza○ ↑ lipolýza○ ↑ inzulínorezistence kosterního svalstva
--

3.1.2 Prozánětlivé cytokiny a role tukové tkáně

Velmi důležitou roli při vzniku hyperglykémie u kriticky nemocných hraje zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α a dalších), které rovněž negativně interferují s inzulínovou signální kaskádou (93). Bylo prokázáno, že na produkci cytokinů v průběhu akutní choroby se podílejí orgány různě. Hlavním zdrojem těchto působků jsou imunokompetentní buňky ať již cirkulující či usazené v různých orgánech. Při modelovém pokusu na vepřích s vyvoláním hyperglykémie a inzulínorezistence za použití endotoxinu se v biotických preparátech ukázaly ledviny a tuková tkáň jako místa s největším vzestupem cytokinů (13). V ledvinách byl pozorován desetinásobný vzestup IL-6, TNF- α i IL-10 v porovnání s jinými tkáněmi. Tuková tkáň vykazovala podobně tří- až desetinásobný vzestup TNF- α . Významnou úlohu tukové tkáně při vzniku inzulínorezistence potvrzuje také naše studie, při které byla měřena exprese cytokinů v subkutánní a epikardiální tukové tkáni odebrané pacientům na počátku a na konci kardiochirurgického zákroku (12). Výrazné změny byly zjištěny v expresi mRNA pro interleukin-6, resistin, MCP-1 a TNF- α . Tuková tkáň se tak může svojí produkcí prozánětlivých cytokinů podílet na systémové inzulínové rezistenci u kriticky nemocných pacientů a přispívat tak ke vzniku komplikací, které s hyperglykemií u kriticky nemocných souvisejí.

Prozánětlivé cytokiny se podílejí na regulaci metabolismu u kriticky nemocných mnoha různými mechanismy. Klíčovou roli hraje buď jejich přímý efekt na buňky a inzulínovou signální kaskádu nebo působení prostřednictvím hormonů ovlivňujících hladinu glukózy. Jedná se například o aktivaci osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny a následné vyplavení kortizolu (94). Jedním z nejdůležitějších cytokinů

v této složité a navzájem provázané síti se zdá být TNF- α , který přímo stimuluje jaterní glukoneogenezu a výrazně zvyšuje lipolýzu v tukových buňkách (95). TNF- α má také vliv na vznik inzulínové rezistence ovlivněním inzulínem indukované fosforylace tyrosinu na inzulínovém receptoru (96). To vede ke vzniku defektní translokace glukózového transportéru 4 (GLUT-4), způsobí snížené vychytávání glukózy a vznik inzulínové rezistence u inzulín-dependentních tkání, jako jsou srdeční a kosterní svalovina a adipocyty (97; 98). V experimentu TNF- α také přímo inhibuje sekreci inzulínu pankreatickými B-buňkami in vitro (99).

3.1.3 Oxidační stres

Kriticky nemocní pacienti jsou ohroženi oxidačním stresem (84). Oxidační stres je charakterizován zvýšeným množstvím volných kyslíkových radikálů nebo jiných reaktivních forem kyslíku v organismu. Hlavními zástupci volných kyslíkových radikálů jsou hydroxylový (OH \cdot) a superoxidový radikál (O $_2\cdot^-$), které obsahují nepárové elektrony, jež jsou odpovědné za jejich vysokou reaktivitu a nestabilitu (100). Působení volných kyslíkových radikálů je spojeno se škodlivými účinky na DNA, lipidy, a bílkoviny, a vede k dysfunkci mitochondrií a jiným biochemických abnormalitám (101). Tyto poruchy se mohou relativně výrazně projevit i v Langerhansových ostrůvcích pankreatu. B-buňky pankreatu mají totiž relativně slabý antioxidační systém a mohou tak být oxidačním stresem poškozovány více než buňky ostatní (102). To může také částečně vysvětlovat neschopnost B-buněk pankreatu adekvátně reagovat na změny plazmatické hladiny glukózy dostatečnou sekrecí inzulínu. Volné kyslíkové radikály mohou být také odpovědné za aktivaci stresových metabolických cest mezi něž patří například aktivace nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) (103). Aktivace tohoto faktoru negativně interferuje s inzulínovou signální kaskádou a stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů (104).

3.1.4 Léky a výživa

Podávání glukózových infuzí stejně jako komplexní parenterální a enterální výživy na jednotkách intenzivní péče může vést k relativně výraznému vzestupu glykémie, zejména při neadekvátní léčbě hyperglykémie nedostatečnými dávkami inzulínu. Ke zvýšení glykémie může také přispět řada léků používaných na jednotkách intenzivní

péče, především pak katecholaminy, glukokortikoidy, thiazidová diuretika, retrovirové léky, fenytoin, cyklosporin a celá řada dalších (105).

Tab. 5 - Příčiny hyperglykémie kriticky nemocných

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Vyplavení stresových hormonů<ul style="list-style-type: none">○ glukokortikoidy, katecholaminy, glukagon, růstový hormon• Oxidační stres• Léky<ul style="list-style-type: none">○ katecholaminy, glukokortikoidy, diuretika, cyklosporin, retrovirové léky, phenytoin,...• Výživa |
|--|

3.1.5 Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a inzulinová rezistence u kriticky nemocných pacientů

Tuková tkáň hraje při vzniku inzulinorezistence v průběhu kritického onemocnění významnou úlohu díky přítomnosti imunokompetentních buněk a zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou například interleukin-6, resistin, MCP-1 a TNF- α (12). Zvýšení hladin těchto cytokinů v systémové cirkulaci pak dále ovlivňuje systémovou inzulinovou rezistenci. Zda jsou do změn, které se v průběhu kritického onemocnění odehrávají u kriticky nemocných v tukové tkáni zapojeny i další systémy, není dosud do detailů objasněno. Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně také ovlivňuje systémovou inzulinovou rezistenci a mnohé klinické studie zmiňované výše dokazují, že blokáda tohoto systému prostřednictvím použití ACE inhibitorů snižuje incidenci DM 2. typu. Role systému renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně při vzniku inzulinové rezistence v průběhu kritického onemocnění dosud zkoumána nebyla.

4 Chronická renální insuficience a zánětlivý stav

Vzrůstající množství důkazů jasně dokládá, že pacienti s chronickým onemocněním ledvin jsou ohroženi rychlým rozvojem aterosklerózy a následnými kardiovaskulárními komplikacemi včetně vysokého rizika úmrtí na kardiovaskulární příhodu (28; 29; 48; 106; 107). Jedinci s chronickým onemocněním ledvin většinou umírají na následky kardiovaskulárních příhod před tím, než dospějí do stádia chronického selhání ledvin s nutností hemodialyzační léčby (48; 106). I přes značné pokroky v technice hemodialýzy zůstává úroveň mortality u skupiny pacientů s chronickým selháním ledvin léčených hemodialyzační léčbou stále vysoká (30). Důvody špatné prognózy pacientů s onemocněním ledvin a snaha o zlepšení tohoto stavu jsou v poslední době objektem rozsáhlého výzkumu. Chronické onemocnění ledvin zhoršuje arteriální hypertenzi a dyslipidémii, což ale vede k opět další progresi renální insuficience. Diabetická nefropatie navíc představuje ve vyspělých zemích hlavní příčinu chronického selhání ledvin (29). Arteriální hypertenze, dyslipidémie a diabetes mellitus jsou hlavní rizikové faktory pro rozvoj endotelové dysfunkce a progresi aterosklerózy. Tradiční rizikové faktory jako hypertenze, chronické srdeční selhání, dyslipidémie a DM 2. typu však mohou pouze omezeně vysvětlit značné zvýšení kardiovaskulární mortality u této skupiny pacientů. Proto jsou zvažovány i další netradiční faktory, které mohou k tomuto stavu přispívat (28; 31).

4.1 MIAC syndrom

Malnutrition, inflammation, atherosclerosis, calcifications (MIAC) syndrom je v poslední době stále častěji zmiňován jako hlavní příčina zvýšené kardiovaskulární mortality u pacientů s chronickým selháním ledvin (32). Jedinci s chronickým onemocněním ledvin trpí malnutricí, pro kterou svědčí nízké hladiny albuminu, prealbuminu a transferinu (31). Onemocnění, která jsou spojena se subklinickým zánětem jako jsou například DM 2. typu a arteriální hypertenze jsou často spojeny s chronickým onemocněním ledvin. Proto je také těžké rozlišit, jestli se v časných stádiích jedná o přímý efekt renální insuficience na progresi zánětlivého stavu. Renální insuficience způsobuje změny složení plazmy a struktury endotelu a jeho funkce, což usnadňuje vznik endoteliálního poškození (29). To pak může hrát úlohu ve spuštění případně potenciaci již probíhajícího zánětlivého procesu. Dyslipidémie

spojená s chronickým onemocněním ledvin také přispívá k zánětlivému procesu (108). Zvýšený LDL cholesterol aktivuje systém renin-angiotenzin-aldosteron, stimuluje NADPH oxidázu, což vede ke zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů, a stimuluje zvýšení IL-6 a dalších cytokinů. Tyto změny pak přispívají k endoteliální dysfunkci, remodelaci cév a vzniku hypertenze (108; 109). Dochází také ke zvýšení triglyceridů. HDL cholesterol je významným antioxidantem a působí jako ochranný prvek pro endotel před účinkem prozánětlivých cytokinů (29). Snížení HDL cholesterolu při chronickém onemocnění ledvin pak vede k právě vyššímu účinku prozánětlivých cytokinů na endotelové buňky. Terapie statiny, která zlepšuje dyslipidémii u pacientů s chronickým onemocněním ledvin, má pak také za následek snížení proteinurie a pomalejší progresi ztráty ledvinných funkcí (110).

Změny ve složení lipoproteinů stejně jako změny způsobené účinky angiotenzinu II na funkci endotelu stimulují a zvyšují účinky prozánětlivých mechanismů (73). Většina pacientů s chronickým onemocněním ledvin má zvýšené hladiny CRP, fibrinogenu, IL-6, TNF- α , D-dimerů a adhezních molekul E-selectinu, VCAM-1 a ICAM-1 (111). Neznáme dosud všechny mechanismy, které k tomuto stavu vedou. Předpokládá se, že zvýšení zánětlivých mediátorů je způsobeno zvýšeným oxidačním stresem, akumulací postsynteticky modifikovaných proteinů, pozdními produkty glykace a dalšími látkami, které jsou normálně u zdravých jedinců odstraňovány ledvinami. Mezi příčiny zánětlivého stavu mohou patřit přidružené komorbidity, oxidační stres, infekce, faktory spojené s hemodialýzou a dialyzátem (112). Zhoršení ledvinných funkcí u pacientů s chronickou renální insuficiencí a akumulace uremických toxinů může zvyšovat oxidační stres a zánětlivou reakci, což ale opět následně vede k endoteliální dysfunkci a další progresi aterosklerózy.

Významnou roli při zvýšení cirkulujících prozánětlivých cytokinů u pacientů s chronickým onemocněním ledvin může mít zvýšený oxidační stres (113). Mechanismy zvýšeného oxidačního stresu mohou zahrnovat aktivaci NADPH oxidázy, myeloperoxidázy mitochondriální oxidázy a dalších enzymů. NADPH oxidáza je stimulována angiotenzinem II a dalšími faktory (114). Myeloperoxidáza je přítomna v neutrofilech a makrofázích, a bylo také prokázáno, že je ve zvýšené míře exprimována v lidských ateromových plátech (115). Zvýšený oxidační stres pak může opět díky poškození endotelu přispívat k progresi aterosklerózy.

U onemocnění ledvin dochází také k aktivaci systému renin-angiotenzin-aldosteron

(viz výše). Angiotenzin II stimuluje NADPH oxidázu, což vede ke zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů a přispívá tak k endoteliální dysfunkci a remodelaci cév (116). Stimulace AT₁ receptoru angiotenzinem II vede tedy ke zvýšení volných kyslíkových radikálů, následně zvýšení prozánětlivých mediátorů včetně cytokinů, chemokinů, adhezních molekul a PAI-1. Tyto faktory společně s již zmiňovanými mechanizmy vedou k endoteliální dysfunkci, remodelaci cév a progresi aterosklerózy (117).

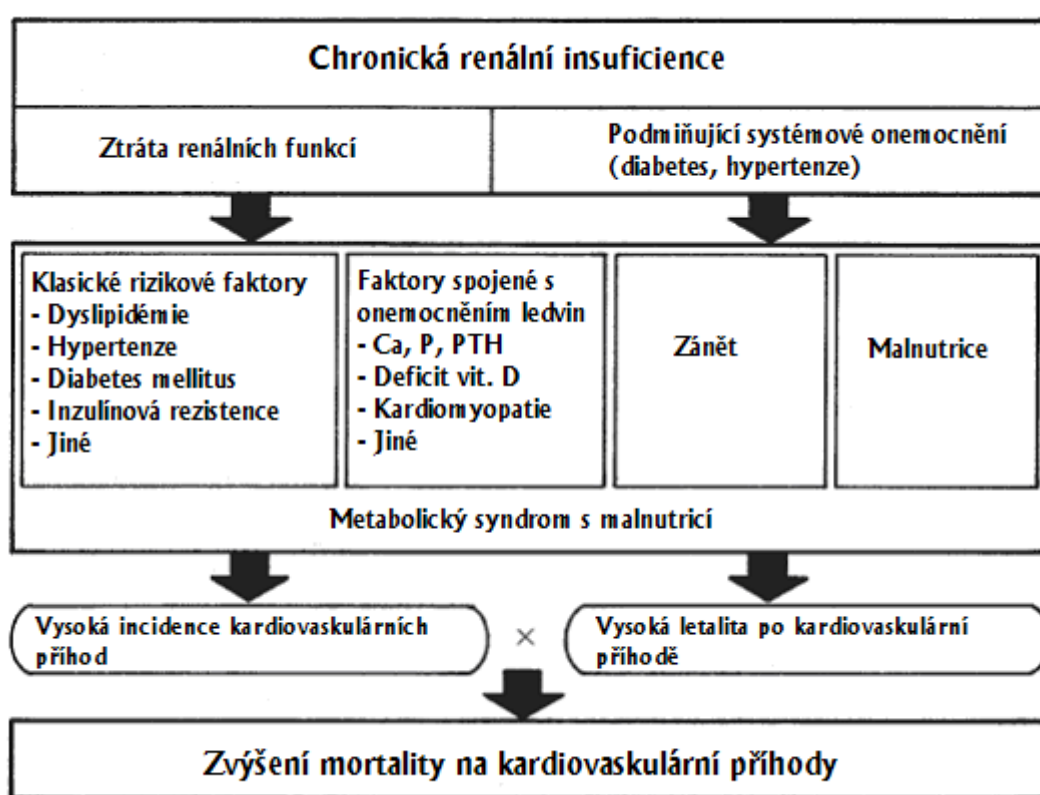
Dalším faktorem poškozujícím pacienty s chronickým onemocněním ledvin je zvýšení intravaskulárních kalcifikací (118). Dochází k aktivaci mechanismů vedoucích ke vzniku kalcifikací, a naopak inhibitory kalcifikace jsou potlačeny, což vede k procesu metastatické vaskulární kalcifikace. Tento proces je důležitý v rozvoji vaskulárního poškození, které je spojeno s chronickým selháním ledvin. Akcelerovaná hypertenze následně vede ke zvýšené prevalenci ischemické choroby srdeční, srdečního selhání a cévních mozkových příhod.

Pacienti s chronickou renální insuficiencí a především pacienti s chronickým selháním ledvin s nutností hemodialyzační léčby mají zvýšenou morbiditu a mortalitu v důsledku kardiovaskulárních příhod a jejich komplikací. K tomuto stavu jistě značnou měrou přispívá zvýšené množství prozánětlivých faktorů a vyšší míra oxidačního stresu, které vedou k poškození endotelu a rychlejší progresi aterosklerózy. Ke vzniku prozánětlivého stavu u pacientů na hemodialyzační léčbě může přispívat mnoho různých mechanismů. Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, tuková tkáň je infiltrována imunokompetentními buňkami a produkuje celou řadu prozánětlivých faktorů. Například u kritického onemocnění se tuková tkáň podílí na produkci a zvýšení systémových hladin prozánětlivých cytokinů významnou měrou (27). Je tedy otázkou, jakým způsobem ovlivňuje tuková tkáň svojí produkcí prozánětlivých cytokinů zánětlivý stav u pacientů s chronickým onemocněním ledvin.

Obr. 2 - Chronická renální insuficience jako metabolický syndrom spojený s malnutricí.

Chronická renální insuficience představuje metabolický syndrom spojený s malnutricí. Jestliže chceme snížit velmi vysoké riziko kardiovaskulárních příhod a jejich mortality, musíme snížit jejich incidenci a také snížit riziko letality po jednotlivých případech.

Upraveno dle Shoji T. et Nishizawa Y., Chronic kidney disease as a metabolic syndrom with malnutrition – need for strict control of risk factors. Internal medicine 2005. (119)



5 Diferenciace preadipocytů

Regulace rozdílných aspektů biologie tukové tkáně, především pak metabolismu, diferenciace preadipocytů ve zralé adipocyty (adipogeneze) a doby přežití adipocytů, jsou nezbytné požadavky pro udržení adekvátního lipidového a glukózového metabolismu. Diferenciace tukové tkáně je extenzivně studována *in vitro* za účelem objasnění molekulárních a buněčných pochodů, které jsou za různé fáze pochodů odpovědné. Dané mechanismy jsou velmi komplexní a dosud ne detailně prozkoumané. Porozumění těmto procesům je však nezbytné pro pochopení fyziologických i patofyziologických stavů a pro výzkum nových léčebných metod a prevenci onemocnění jednak z nadbytku tukové tkáně (obezity), ale také nedostatku tukové tkáně (lipodystrofie a lipoatrofie). Preadipocyty představují buněčnou linii, která je odvozena z multipotentní kmenové buňky původem z mesodermu, a která je schopna přeměny v adipocyt, chondrocyt, osteoblast nebo myocyt (viz Obr. 3).

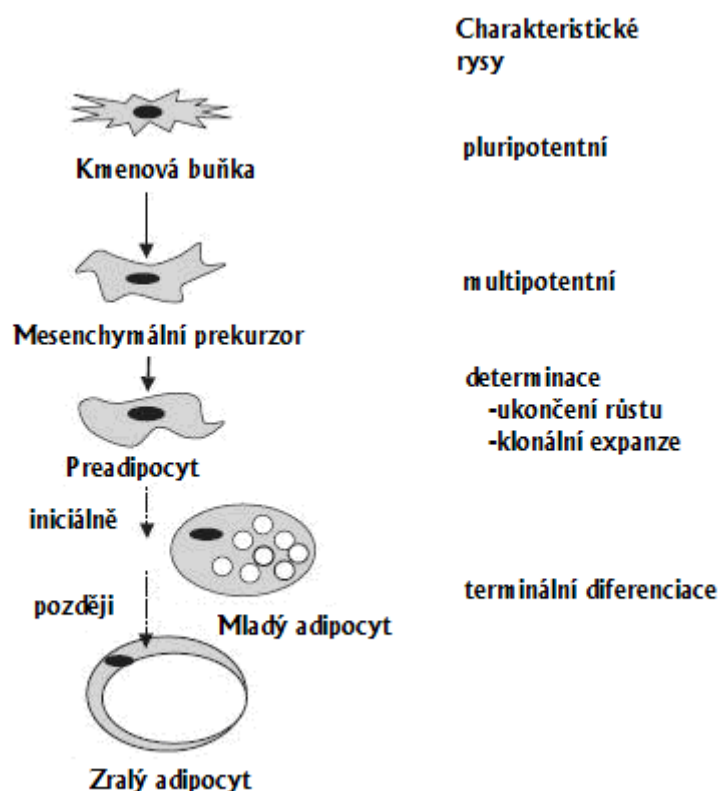
Adipogeneza začíná již před narozením. Po porodu dochází k rychlé expanzi tukové tkáně jako výsledku rostoucí velikosti a počtu buněk. Potenciál tvorby nových adipocytů je ale zachován i v dospělosti. Dietní faktory tento proces ovlivňují, neboť hlodavci krmění potravou s vysokým obsahem cukrů nebo tuků vykazují hyperplazii adipocytů (11).

Diferenciace preadipocytů v adipocyty je velmi přesně řízený proces. Hormonální a nutriční signály ovlivňují diferenciaci preadipocytů jak pozitivně tak negativně a svoji úlohu hrají také vzájemné mezibuněčné interakce v tukové tkáni (11; 120). Diferenciace preadipocytů je například inhibována angiotenzinem II vznikajícím v tukové tkáni v rámci lokálního působení systému renin-angiotenzin-aldosteron, což potenciálně může vést ke snížení počtu adipocytů, snížené kapacitě tukové tkáně k ukládání tuků a zvýšení inzulinové rezistence (22). Mezi další faktory, které ovlivňují diferenciaci preadipocytů, patří TGF- β , IGF-1, glukokortikoidy a mnohé další (11).

Obr. 3 - Schématický diagram procesu diferenciacie preadipocytů.

Současné znalosti týkající se diferenciacie preadipocytů naznačují, že z prekurzorové pluripotentní kmenové buňky se vyvíjí mesenchymální prekurzorová buňka s potenciálem k diferenciaci do myoblastu, chondroblastu, osteoblastu a adipocytu.

Upraveno dle Fonseca-Alaniz M.H. et al., Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr* 2007. (11)



5.1 Pref-1

Preadipocytární faktor-1 (Pref-1) patří mezi relativně nově objevené proteiny, které také inhibují diferenciaci adipocytů a to jak *in vitro* tak *in vivo* (34). Pref-1 je produkovan preadipocyty v průběhu jejich diferenciacie a je tedy výborným znakem, podle kterého mohou být preadipocyty rozpoznávány (121). Solubilní Pref-1 se podílí jak parakrinne tak endokrinne na inhibici diferenciacie preadipocytů v adipocyty prostrednictvím aktivacie MEK/ERK (122; 123). Myší modely s nedostatečnou nebo naopak nadmernou hladinou Pref-1 jasne prokazaly význam role Pref-1 v procese adipogeneze (124-126). Na modelu myši se zvýšenou expresí Pref-1 (126) byla prokazána odolnost k rozvoji obezity způsobené dietou s vysokým obsahem tuků, což

se projevuje snížením počtu adipocytů a absolutní hmoty tukové tkáně. Tyto myši vykazovaly ale také velkou inzulinovou rezistenci hlavně díky sníženému vychytávání glukózy v kosterním svalstvu a tukové tkáni. Myši se zvýšenou expresí Pref-1 mají tedy velkou inzulinovou rezistenci i přes snížené množství tukové tkáně. Myši se zvýšenou expresí Pref-1 akumulují diacylglyceroly preferenčně v kosterním svalstvu ale ne v jiných inzulin-senzitivních tkáních (126). Mechanismus tohoto účinku stále není objasněn. Naopak myši s deficitem Pref-1 vykazují nižší růst a abnormality skeletu stejně jako zvýšené ukládání tuků a vznik obezity při podávání diety s vysokým obsahem tuků (124). Tyto studie potvrzují úlohu Pref-1 v procesu diferenciaci adipocytů.

Porucha tukové tkáně s odolností vůči obezitě vyvolané dietou s vysokým obsahem tuků a inzulinová rezistence při zvýšené expresi Pref-1 patří mezi lipodystrofie. Lipodystrofie představují heterogenní skupinu různých onemocnění, které jsou charakterizovány úbytkem tukové tkáně. Úbytek tukové tkáně může být buď vrozený nebo získaný, a lokalizovaný nebo generalizovaný. Jestliže je lipodystrofie generalizovaná, je spojena s inzulinovou rezistencí. Expresie Pref-1 je dále například zvýšena v tukové tkáni pacientů infikovaných HIV, kteří mají lipodystrofii způsobenou HAART (highly active antiretroviral treatment), především pak proteázovými inhibitory (127). Při této formě léčby je lipodystrofie poměrně častá (incidence 20-50%) a je charakterizována nejen úbytkem podkožního tuku preferenčně na končetinách a obličeji, ale také hyperlipidemií a inzulinovou rezistencí a naopak přírůstkem viscerálního tuku (128).

Zatím není jasné, jakým způsobem Pref-1 ovlivňuje další cytokinovou kaskádu. Nalezení receptoru, jehož prostřednictvím se uskutečňuje přenesení signálu Pref-1 je nezbytné v porozumění molekulovému mechanismu odpovědného za přesnou úlohu tohoto faktoru v adipogenezi. Zcela recentně je možné také měřit nejen expresi mRNA Pref-1 v různých tkáních, ale také celkovou hladinu Pref-1 v plazmě. To umožní dále definovat množství a roli Pref-1 u jednotlivých chorob, kde hlavní roli hraje inzulinová rezistence, tedy především u DM 2. typu a obezity.

6 Cíle dizertační práce

Tato dizertační práce je zaměřena na úlohu tukové tkáně a jejích produktů při rozvoji inzulinové rezistence a systémové zánětlivé reakce u různých skupin pacientů a patofyziologických stavů.

Cílem první části práce bylo zjistit, zda kritické onemocnění vede ke změnám lokálního systému renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a zda se tyto změny mohou podílet na vzniku inzulinové rezistence a hyperglykémie u těchto pacientů. Vycházeli jsme z hypotézy, že systém renin-angiotenzin-aldosteron v tukové tkáni prodělává v průběhu kritického onemocnění významné změny a může se podílet na vzniku systémové inzulinové rezistence a následných komplikací při kritickém onemocnění.

Další část této práce se zaměřuje na změny, které prodělává tuková tkáň u pacientů s chronickým selháním ledvin a především pak na produkci prozánětlivých faktorů a lokální zánětlivou reakci v tukové tkáni u této skupiny pacientů. Vycházeli jsme z hypotézy, že zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni může přispívat k systémovému prozánětlivému stavu u pacientů s chronickým selháním ledvin na hemodialyzační léčbě a následně tak vést k rychlejší progresi aterosklerózy a k vyšší kardiovaskulární mortalitě. Cílem druhé části práce bylo blíže charakterizovat zánětlivý stav podkožní a viscerální tukové tkáně u pacientů s chronickým selháním ledvin a porovnat výsledky se zdravými jedinci.

Preadipocytární faktor 1 (Pref-1) je relativně nově objevený protein, u kterého bylo prokázáno, že působí jako inhibitor diferenciacie adipocytů (34). Pref-1 může potencionálně ovlivňovat i glukózovou homeostázu a inzulinovou rezistenci. Zde jsme vycházeli z předpokladu, že hladiny Pref-1 mohou být zvýšeny u chorob charakterizovaných inzulinovou rezistencí. Cílem této části práce bylo porovnat expresi genu pro Pref-1 v podkožní a viscerální tukové tkáni pacientů s obezitou se skupinou zdravých štíhlých kontrolních subjektů. Dále pak porovnat sérové hladiny Pref-1 u zdravých jedinců, u obézních pacientů s/bez DM 2. typu a posoudit změny hladin Pref-1, vyvolané několikatýdenním podáváním nízkokalorické diety.

7 Metodika studií

Jednotlivé studie byly prováděny ve spolupráci 3. interní kliniky, Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, 2. kliniky kardiovaskulární chirurgie a 1. chirurgické kliniky 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze. Studie byly schváleny Etickou komisí 1. LF UK a VFN. Každý pacient zařazený do studie podepsal informovaný souhlas, byla od něho odebrána demografická data, anamnéza a provedeno fyzikální a laboratorní vyšetření. Studie byly prováděny v souladu s Helsinskou deklarací.

7.1 Systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a inzulínová rezistence u kriticky nemocných

7.1.1 Soubor vyšetřovaných osob

Cílem studie bylo posoudit změny lokálního systému renin-angiotenzin-aldosteron subkutánní a viscerální tukové tkáně u pacientů v průběhu kritického onemocnění. Jako model kritického onemocnění byl zvolen kardiochirurgický zákrok. Do studie bylo zařazeno 10 pacientů (6 mužů a 4 ženy, průměrný věk 56 ± 14 let, body mass index (BMI) 27 ± 3 kg/m²), kteří podstoupili plánovaný kardiochirurgický zákrok (7 pacientů s provedením aorto-koronárního bypassu, 3 plastiky chlopně; trvání operačního zákroku $4,6 \pm 1,2$ hodiny). Klinické charakteristiky pacientů jsou uvedeny v tab. 6.

Jeden pacient měl DM 2. typu na inzulínoterapii, 7 pacientů mělo arteriální hypertenzi, přičemž 6 z těchto pacientů bylo léčeno antihypertenzivy (2 inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu (ramipril), žádný blokátory receptoru pro angiotenzin II) před zahájením studie. 5 pacientů mělo dyslipidémii a 2 z nich byli léčeni statiny. Žádný z pacientů neměl maligní nádor, onemocnění štítné žlázy nebo akutní infekční onemocnění.

Tab. 6 - Klinické charakteristiky pacientů podstupujících kardiochirurgický zákrok. Vyjádřeno jako n (počet pacientů); průměr ± střední chyba průměru.

Počet pacientů (muži/ženy)	10 (6/4)
Body mass index (kg/m ²)	27 ± 3
Věk (roky)	56 ± 14
Trvání chirurgického zákroku (hodiny)	4,6 ± 1,2
Dyslipidémie	5
Arteriální hypertenze	7
Diabetes mellitus 2. typu	1

7.1.2 Antropometrické vyšetření a odběr vzorků krve a tukové tkáně

Antropometrické vyšetření pacientů bylo provedeno jeden den před operací. Každý pacient byl zvážen a byl spočítán BMI. Krevní vzorky pro měření sérových koncentrací inzulínu a plazmatické glykémie byly odebírány před začátkem anestezie a po konci operačního zákroku (v době příjmu na jednotku pooperační intenzivní péče). Párové vzorky podkožní a epikardiální tukové tkáně byly odebírány na začátku a na konci plánovaného operačního zákroku z podkožní (hrudní oblast) a epikardiální tukové tkáně, která nebyla poškozena chirurgickým zákrokem. V každém vzorku bylo odebráno přibližně 100 mg tkáně a uloženo v 1 ml stabilizačního média RNA lateru (RNAlater, Qiagen, Německo) a zmrazeno v - 80°C do doby další analýzy. Plazmatická glykémie byla měřena přístrojem ABL 700 (Radiometer Medical A/S, Kodaň Dánsko). Sérové koncentrace inzulínu byly měřeny s použitím kitu pro sérové adipokiny LINCoplex (panel B) na přístroji Luminex®200 (Linco Research, USA). Sérové koncentrace adipokinů byly měřeny s použitím komerčních RIA kitů (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA). Senzitivita byla 1,0 ng/ml a intra- a intervariabilita analýz byla 1,8 %, resp. 9,3 %.

7.1.3 Stanovení exprese mRNA pro angiotenzinogen, angiotenzin-konvertující enzym a receptor pro angiotenzin II

Celková RNA byla extrahována z podkožní a epikardiální tukové tkáně homogenizací na přístroji MagNA Lyser Instrument s MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Germany) prostřednictvím MagNA Pure Compact RNA Isolation

(Tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Koncentrace RNA byla stanovena prostřednictvím absorbance na 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf AG, Germany). Všechny vzorky měly 260/280 nm absorbní poměr $1,89 \pm 0,1$. Integrita RNA byla testována pomocí vizualizace 18S a 28S ribozomálních proužků na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem. 0,1 – 1 ug celkové RNA bylo použito pro reverzní transkripci k syntéze prvního řetězce cDNA s použitím oligo(dT)₁₈ primeru dle instrukcí z RevertAid First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas Life Science, Lithuania). Genová exprese angiotenzinu, angiotenzin-konvertujícího enzymu a receptoru 1 pro angiotenzin II byla stanovena na přístroji ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s použitím TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, NO AmpErase[®] UNG and specific TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Všechny PCR pro každý gen byly amplifikovány samostatně. Kontroly bez templátu cDNA byly provedeny při každé analýze a všechny vzorky byly zkoumány minimálně dvakrát. Vzestup fluorescence byl měřen v reálném čase a údaje byly získány jako počet cyklických hodnot (C_T). Pro účely kompenzace odchylek v počátečním množství RNA a účinnosti reverzní transkripce byl použit beta-2 mikroglobulin jako endogenní reference a výsledky byly normalizovány k těmto hodnotám. Relativní genová exprese byla počítána s použitím rovnice $2^{-\Delta\Delta(C_T \text{ cytokine} - C_T \text{ B2M})}$.

7.1.4 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena s použitím softwaru SigmaStat (Jandel Scientific, USA). Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Změny genové exprese v průběhu kardiochirurgické operace byly hodnoceny s použitím párového t-testu. Výsledky byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

7.2 Úloha tukové tkáně při vzniku systémového zánětu u pacientů s chronickým selháním ledvin

7.2.1 Soubor vyšetřovaných osob

Cílem studie bylo blíže charakterizovat zánětlivý stav podkožní a viscerální tukové tkáně u pacientů s chronickým selháním ledvin. Do studie bylo zařazeno 15 žen se selháním ledvin (průměrný věk $55,4 \pm 2,3$ roku; průměrný BMI $27,6 \pm 1,1$ kg/m²), které podstoupily transplantaci ledvin. Příčiny chronického selhání ledvin byly: polycystické onemocnění ledvin (6 pacientů), chronická glomerulonefritida (3 pacienti), analgetická nefropatie (2 pacienti), vaskulární nefroskleróza (3 pacienti) a Alportův syndrom (1 pacient). 10 pacientek mělo arteriální hypertenzi, 10 pacientek mělo hyperlipidémii a 4 z těchto pacientek byly léčeny statiny (atorvastatin 10 mg denně).

V kontrolní skupině bylo 17 zdravých žen, které neužívaly žádné léky (průměrný věk $55,1 \pm 2,5$ roku, BMI $27,1 \pm 1,1$ kg/m²), a které podstoupily plánovanou cholecystektomii pro cholelithiázu. Chronická cholecystitida byla vyloučena pomocí břišní sonografie a normálních hodnot CRP. Mikroskopické nálezy byly revidovány nezávislým patologem, který nebyl informován o klinických údajích a nebyl prokázán ani akutní ani chronický zánět žlučníku. Nikdo z kontrolních subjektů neměl diabetes mellitus, přičemž diabetici byli ze studie vyloučeni i ve skupině pacientů s chronickým renálním selháním.

7.2.2 Antropometrické vyšetření a sběr vzorků krve a tukové tkáně

Antropometrické vyšetření bylo provedeno jeden den před operací. Všechny subjekty byly změřeny a zváženy a byl spočítán BMI. Odběry krevních vzorků pro hormonální vyšetření byly odebrány před započítím anestezie. Sérum bylo získáno centrifugací a vzorky byly následně zamrazeny při -80°C a uchovány pro další analýzu.

Vzorky podkožní (z oblasti břicha) a viscerální (perirenální tuková tkáň) tukové tkáně pro analýzu exprese mRNA a histopatologické vyšetření byly odebrány na počátku operace. Všechny vzorky byly odebrány přibližně ze stejné oblasti u všech pacientů. Vzorky tkáně byly odebrány z míst, které nebyly před tím chirurgicky mechanicky poškozeny, aby bylo zabráněno vlivu lokálního poškození na měřené tkáňové parametry. Vzorky tkání byly uloženy do stabilizačního media RNAlater reagent

(Qiagen, Hilden, Německo) a uloženy při -80°C pro další analýzu.

7.2.3 Hormonální a biochemické analýzy

Sérové hladiny leptinu, adiponektinu a resistinu byly měřeny komerčními ELISA kity (BioVendor, Brno, Česká republika a Linco Research, St Charles, MI, USA). Sérové koncentrace IL-6, TNF- α a MCP-1 byly měřeny s použitím Human Serum Adipokine LINCOpex Kit na přístroji Luminex®200 (Linco Research, St Charles, MI, USA). Sérové koncentrace CRP byly měřeny s použitím ultra-senzitivního ELISA kitu (DSL, Oxon, UK).

7.2.4 Stanovení expresí mRNA

Celková RNA byla extrahována z 60 – 100 mg podkožní a viscerální tukové tkáně homogenizací na přístroji MagNA Lyser Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Germany) prostřednictvím MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Koncentrace a čistota RNA byla stanovena prostřednictvím spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf AG, Germany). Průměrná koncentrace RNA byla $70,1 \pm 4,7$ ug/ml, 260/280 nm absorbní poměr $1,78 \pm 0,02$. Integrita RNA byla testována pomocí vizualizace 18S a 28S ribozomálních proužků na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem. 0,1 – 1 ug celkové RNA bylo použito pro reverzní transkripci k syntéze prvního řetězce cDNA s použitím oligo(dT)₁₈ primeru dle instrukcí z RevertAid First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas Life Science, Lithuania). cDNA byla použita pro stanovení genové exprese leptinu, adiponektinu, resistinu, receptoru typu 1 pro adiponektin (AdipoR1), receptoru typu 2 pro adiponektin (AdipoR2), IL-6, TNF- α , MCP-1 a CD-68 (imunokompetentní buněčný znak) prostřednictvím PCR na přístroji ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s použitím TaqMan® Universal PCR Master Mix, NO AmpErase® UNG and specific TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Všechny PCR pro každý gen byly amplifikovány samostatně. Kontroly bez templátu cDNA byly provedeny při každé analýze a všechny vzorky byly zkoumány minimálně dvakrát. Vzestup fluorescence byl měřen v reálném čase a údaje byly získány jako počet cyklických hodnot (C_T). Pro účely kompenzace odchylek v počátečním množství RNA a

účinnosti reverzní transkripce byl použit beta-2 mikroglobulin jako endogenní reference a výsledky byly normalizovány k těmto hodnotám. Relativní genová exprese byla počítána s použitím rovnice $2^{-\Delta\Delta(\text{CT}_{\text{cytokine}} - \text{CT}_{\text{B2M}})}$.

7.2.5 Imunohistochemické stanovení imunokompetentních buněk

Tenké řezy o velikosti 5 um byly odříznuty z formalínem fixovaných parafínových tkáňových bločků. Endogenní peroxidázová aktivita byla inhibována 3% H₂O₂ v metanolu po dobu 30 minut a následně vymyta 15 minut v čisté vodě. Nespecifická reaktivita byla potlačena přípravou řezů po dobu 2 hodin s 1% normálním ovčím sérem (Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko) s 1% hovězím fetálním albuminem ředěným v ChemMate Antibody Diluent (Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko). Řezy byly inkubovány s primárními myšími monoklonálními protilátkami CD68 klon KP1 (Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko), ředěnými s ChemMate antibody Diluent (Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Pro zobrazení řezů inkubovaných s primárními protilátkami byl použit HistofineR kit (Nichirei, Tokyo, Japonsko). Na všechny řezy byl nanesen chromogenní 3,3-diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate, Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko) a výplach byl proveden s Mayerovým hematoxylinem. Tkáňové řezy inkubované bez primárních protilátek byly použity jako negativní kontroly. Všechny řezy byly analyzovány v náhodném pořadí patologem, který nebyl informován o klinických údajích a byl počítán součet CD-68 pozitivních buněk na jedno zobrazovací pole.

7.2.6 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena s použitím softwaru SigmaStat (Jandel scientific, USA). T-test nebo Mann-Whitney Rank Sum test byly použity ke srovnání dat pacientek se selháním ledvin a kontrolních subjektů. Vztah mezi proměnnými byl počítán pomocí Pearsonova nebo Spearmanova korelačního testu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM).

7.3 Pref-1 a inzulínová rezistence

Tato část dizertační práce měla charakter průřezové studie. V první části byla měřena exprese mRNA pro Pref-1 v podkožní a viscerální tukové tkáni žen s obezitou 3. stupně podstupujících laparoskopickou bandáž žaludku a srovnávána se skupinou zdravých štíhlých žen, které podstoupily plánovanou laparoskopickou cholecystektomii.

Ve druhé podstudii na jiné skupině byla pacientům podávána dieta s velmi nízkým obsahem kalorií (2200 kJ/den) po dobu 3 týdnů a byl sledován vliv diety na cirkulující sérové hladiny Pref-1.

7.3.1 Soubor vyšetřovaných osob

Do první podstudie (exprese mRNA Pref-1 v tukové tkáni) bylo zařazeno 11 obézních žen bez DM 2. typu ($BMI 43,8 \pm 1,0 \text{ kg/m}^2$), které podstoupily laparoskopickou bandáž žaludku. V kontrolní skupině bylo 7 štíhlých žen odpovídajícího věku ($BMI 23,6 \pm 0,6 \text{ kg/m}^2$), které podstoupily laparoskopickou cholecystektomii. Chronická cholecystitida byla vyloučena použitím břišní sonografie, normálními hodnotami CRP a histologickým vyšetřením.

Do druhé podstudie (3 týdny diety s velmi nízkým obsahem kalorií) bylo zařazeno 19 obézních žen ($BMI 47,8 \pm 3,1 \text{ kg/m}^2$) bez DM 2. typu (Obézní), 12 obézních žen s DM 2. typu ($BMI 50,9 \pm 2,9 \text{ kg/m}^2$) (DM 2. typu) a 22 zdravých štíhlých kontrolních žen odpovídajícího věku ($BMI 23,2 \pm 0,4 \text{ kg/m}^2$).

Hmotnost všech pacientů byla stabilní nejméně po dobu 3 měsíců před začátkem studie. Pacienti s DM 2. typu byli léčeni dietou, metforminem nebo kombinací metforminu a glimepiridu. Diabetická léčba se po dobu studie neměnila. Nikdo z pacientů netrpěl infekčním onemocněním.

7.3.2 Antropometrické vyšetření a sběr vzorků krve a tukové tkáně

Všechny subjekty byly změřeny a zváženy a byl spočítán BMI. Antropometrické vyšetření pacientů a kontrolní skupiny v první podstudii bylo provedeno v klidovém stavu jeden den před operací. Odběry krevních vzorků pro hormonální vyšetření byly odebrány v před započítím anestezie. Sérum bylo získáno centrifugací a vzorky byly

následně zamraženy při -80°C a uchovány pro další analýzu.

Vzorky podkožní (z oblasti břicha) a viscerální (omentální) tukové tkáně pro analýzu exprese mRNA byly odebrány na počátku operace. Všechny vzorky byly odebrány přibližně ze stejné oblasti u všech pacientů. Vzorky tkáně byly odebrány z míst, které nebyly před tím chirurgicky mechanicky poškozeny, aby bylo zabráněno vlivu lokálního poškození na měřené tkáňové parametry. Vzorky tkání byly uloženy do stabilizačního media RNAlater reagent (Qiagen, Hilden, Německo) a uloženy při -80°C pro další analýzu.

V druhé podstudii byli všichni pacienti vyšetřeni před započtím nízkokalorické diety a po 3 týdnech jejího trvání. Vzorky krve byly odebrány mezi 7 a 8 hodinou po předchozím nočním lačnění. Sérum bylo získáno centrifugací a uloženo při -80°C pro další analýzu.

7.3.3 Hormonální a biochemické analýzy

Sérové koncentrace Pref-1 byly měřeny komerčními ELISA kity (R&D Systems, USA). Senzitivita byla 12 pg/ml a intra- a inter-variabilita analýz byla 3,7 a 6,2 %. Sérové koncentrace leptinu byly měřeny ELISA kitem (BioVendor, Czech Republic). Senzitivita byla 0,12 ng/ml a intra- a intervariabilita analýz byla 1,7 a 8,0 %. Sérové koncentrace adiponektinu byly měřeny komerčním RIA kitem (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA). Senzitivita byla 1,0 ug/ml a intra- intervariabilita analýz byla 1,7 a 9,2 %. Biochemické parametry (glykémie, glykovaný hemoglobin, inzulin, celkový cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceridy) byly měřeny standardními laboratorními metodami v Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN v Praze. HOMA index (homeostasis model assessment) byl počítán s použitím rovnice: lačná hladina inzulinu ($\mu\text{IU/ml}$) * lačná glykémie (mmol/l)/22,5.

7.3.4 Stanovení exprese mRNA pro Pref-1

Celková RNA byla extrahována z podkožní a viscerální tukové tkáně homogenizací na přístroji MagNA Lyser Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Germany) prostřednictvím MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Koncentrace a čistota RNA byla stanovena prostřednictvím spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf AG, Germany). Průměrná koncentrace

RNA byla $70,1 \pm 4,7$ ug/ml, 260/280 nm absorbní poměr $1,78 \pm 0,02$. Integrita RNA byla testována pomocí vizualizace 18S a 28S ribozomálních proužků na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem. 0,05 ug celkové RNA bylo použito pro reverzní transkripci k syntéze prvního řetězce cDNA s použitím oligo(dT) primeru dle instrukcí z RevertAid First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas Life Science, Lithuania). cDNA byla použita pro stanovení genové exprese Pref-1 prostřednictvím PCR na přístroji ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s použitím TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, NO AmpErase[®] UNG and specific TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Kontroly bez templátu cDNA byly provedeny při každé analýze a všechny vzorky byly zkoumány minimálně dvakrát. Vzestup fluorescence byl měřen v reálném čase a údaje byly získány jako počet cyklických hodnot (C_T). Pro účely kompenzace odchylek v počátečním množství RNA a účinnosti reverzní transkripce byla použita 18S rRNA jako endogenní reference a výsledky byly normalizovány k těmto hodnotám. Relativní genová exprese byla počítána s použitím rovnice $2^{-\Delta\Delta(C_T \text{ Pref-1} - C_T \text{ 18S rRNA})}$.

7.3.5 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena s použitím softwaru SigmaStat (Jandel scientific, USA). T-test nebo Mann-Whitney Rank Sum test byly použity ke srovnání dat kontrolní skupiny, obézních pacientek a diabetiček. Korelace byly počítány s použitím Spearmanova nebo Pearsonova korelačního testu.

8 Výsledky

8.1 *Systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a inzulínová rezistence u kriticky nemocných*

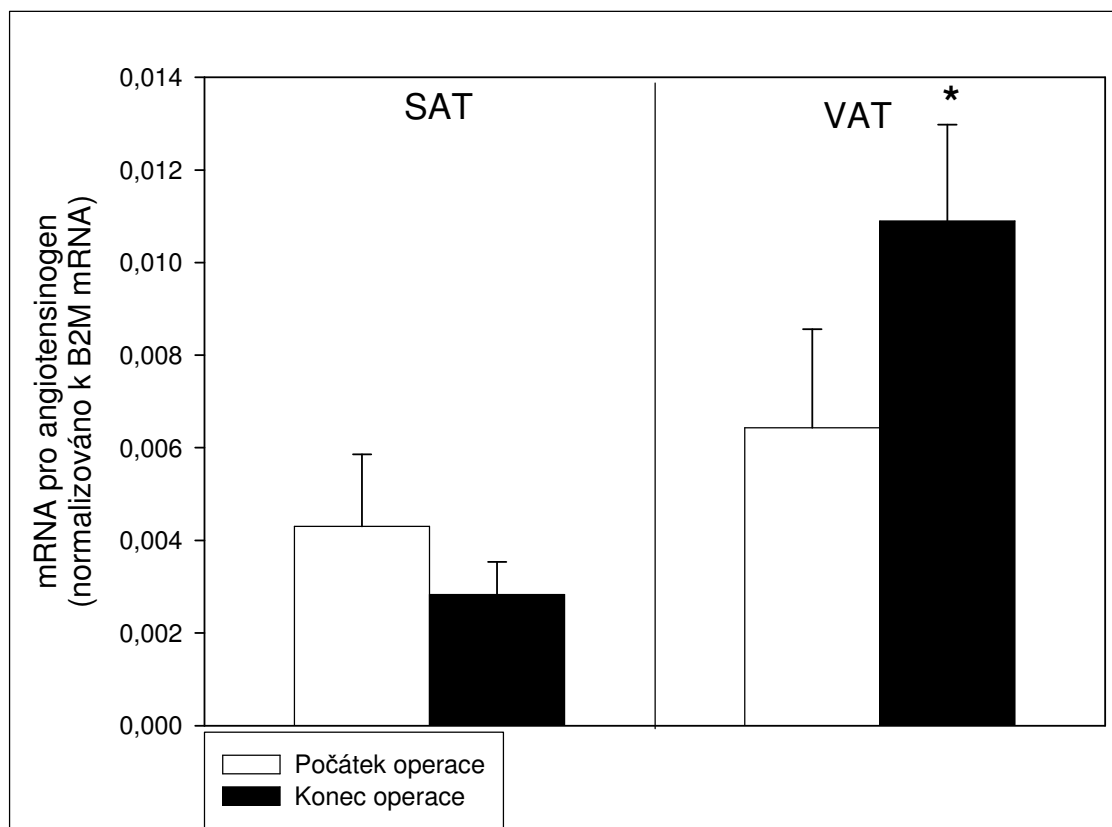
Sérové hladiny glukózy a inzulínu byly signifikantně vyšší na konci operace, což naznačuje rozvoj inzulínové rezistence (tab. 7). Naopak sérové koncentrace adiponektinu pouze vykazovaly tendenci k poklesu v průběhu operace, ale tato změna nedosáhla statistické významnosti (tab. 7).

Na počátku operace nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi mRNA angiotenzinogenu (AGT), angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE) a receptoru 1 pro angiotenzin II (AGTR1) mezi podkožní a epikardiální tukovou tkání (tab. 7). Exprese mRNA pro angiotenzinogen vzrostla statisticky významně v epikardiální tukové tkáni na konci operačního zákroku, zatímco v podkožní tukové tkáni nebyla změna zaznamenána (tab. 7 a graf 1). Jak mRNA pro angiotenzin-konvertující enzym tak mRNA pro receptor typu 1 pro angiotenzin II se statisticky významně neměnila v průběhu operačního zákroku (tab. 7, graf 2 a 3). Nebyla nalezena korelace mezi hladinou krevní glukózy, sérovým inzulínem, sérovým adiponektinem a expresí angiotenzinogenu.

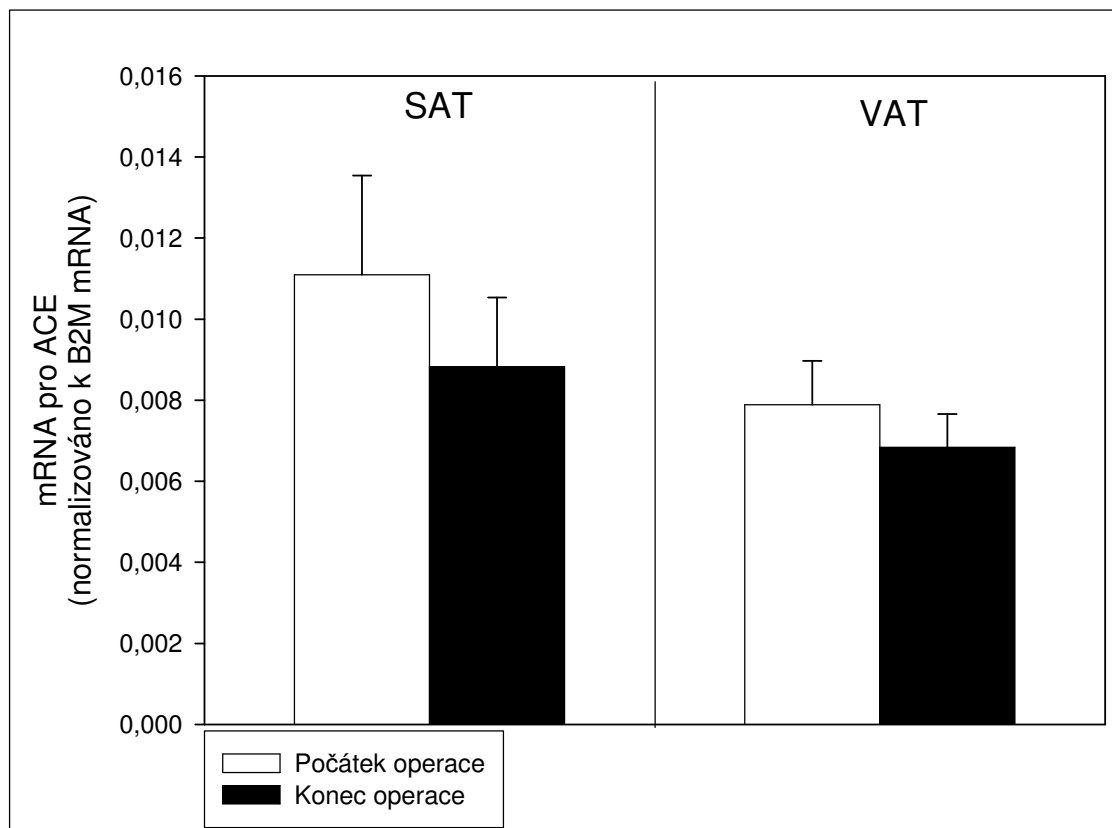
Tab. 7 - Biochemické charakteristiky pacientů podstupujících kardiologický zákrok (vyjádřeno jako průměr ± střední chyba průměru) a exprese mRNA pro angiotenzinogen (AGT), ACE a receptor typu 1 pro angiotenzin II (vyjádřeno jako průměr ± střední chyba průměru; normalizováno k beta-2 mikroglobulinu). Statistická významnost byla vypočítána pomocí párového t-testu. * značí $p < 0,05$ vs. počátek operace.

	Počátek operace	Konec operace
Krevní glykémie (mmol/l)	$5,9 \pm 1,1$	$8,6 \pm 1,2^*$
Sérové hladiny inzulínu (pg/ml)	130 ± 36	$341 \pm 86^*$
Sérové hladiny adiponektinu (ng/ml)	17 ± 8	12 ± 5
AGT mRNA v podkožní tukové tkáni	$0,004 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,0007$
AGT mRNA v epikardiální tukové tkáni	$0,006 \pm 0,002$	$0,011 \pm 0,002^*$
ACE mRNA v podkožní tukové tkáni	$0,011 \pm 0,002$	$0,009 \pm 0,002$
ACE mRNA v epikardiální tukové tkáni	$0,008 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$
Receptor pro angiotenzin II typ 1 mRNA v podkožní tukové tkáni	$0,00008 \pm 0,00002$	$0,00005 \pm 0,00001$
Receptor pro angiotenzin II typ 1 mRNA v epikardiální tukové tkáni	$0,00005 \pm 0,00001$	$0,00004 \pm 0,00001$

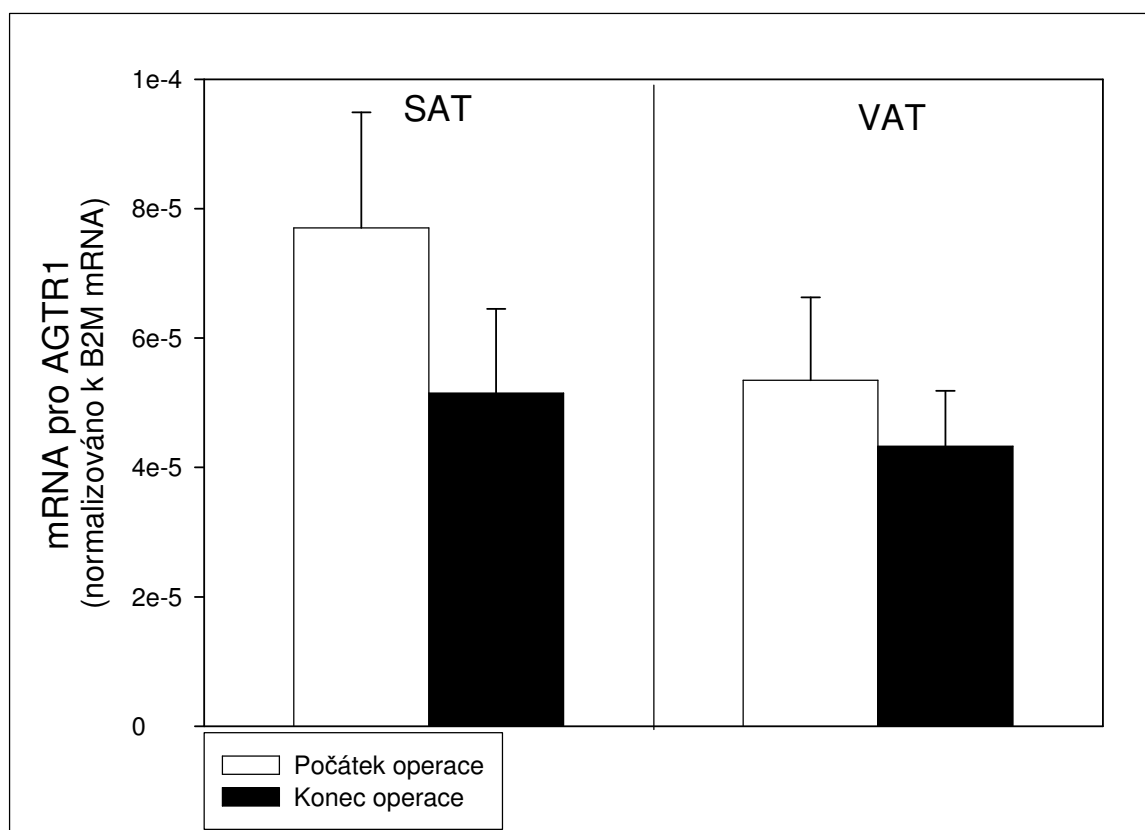
Graf 1 - Expres mRNA pro angiotenzinogen v podkožní (SAT) a epikardiální tukové tkáni (VAT) na počátku (bílé sloupce) a na konci (černé sloupce) operace. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Statistická významnost byla vypočítána pomocí párového t-testu. * značí $p < 0,05$ vs. VAT na počátku operace.



Graf 2 - Expres mRNA pro angiotenzin-konvertující enzym v podkožní (SAT) a epikardiální tukové tkáni (VAT) na počátku (bílé sloupce) a na konci (černé sloupce) operace. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM).



Graf 3 - Expres mRNA pro receptor typu 1 pro angiotenzin II (AGTR1) v podkožní (SAT) a epikardiální tukové tkáni (VAT) na počátku (bílé sloupce) a na konci (černé sloupce) operace. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM).



8.2 Úloha tukové tkáně při vzniku systémového zánětu u pacientů s chronickým selháním ledvin

8.2.1 Antropometrické parametry a klinické charakteristiky souboru

Základní charakteristiky pacientů se selháním ledvin a kontrolní skupiny jsou uvedeny v tab. 8. Pacienti se selháním ledvin měli statisticky významně vyšší koncentrace triglyceridů a inzulínu a naopak nižší hladiny HDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou (viz tab. 8). Obě skupiny se nelišily s ohledem na pohlaví, věk, BMI, celkový cholesterol a hladinu glykovaného hemoglobinu.

Tab. 8 - Klinické a biochemické parametry zdravé kontrolní skupiny a pacientek se selháním ledvin. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Statistická významnost byla vypočítána pomocí nepárového t-testu nebo Mann-Whitney Rank Sum testu. * značí $p < 0,05$ vs. kontrolní skupina.

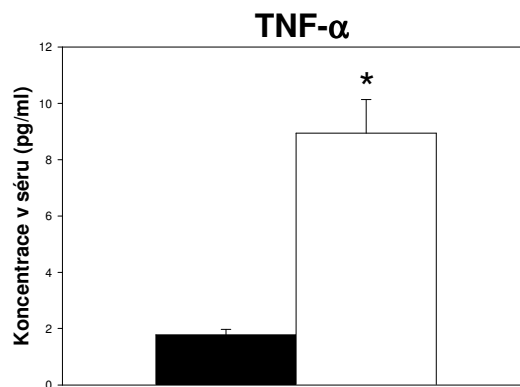
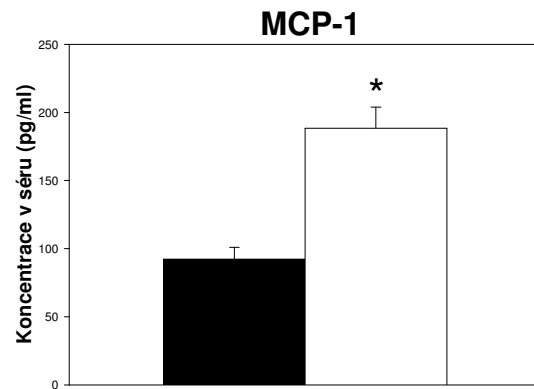
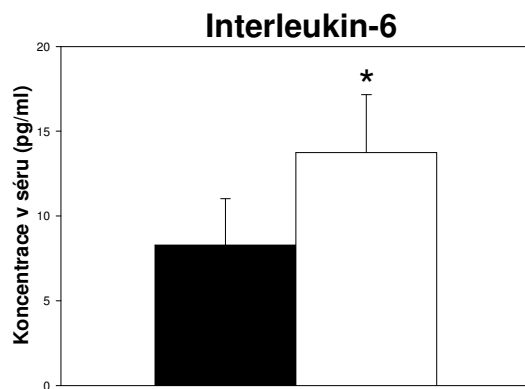
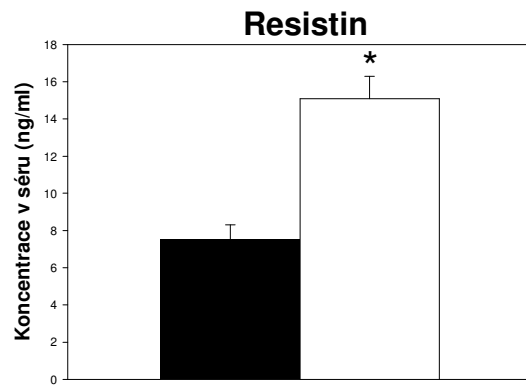
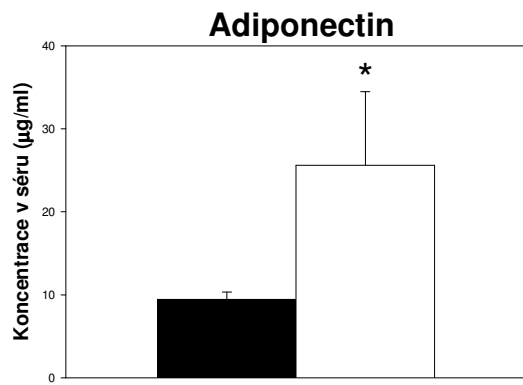
	Kontrolní skupina	Pacienti se selháním ledvin
Počet subjektů	17	15
Body mass index (kg/m^2)	$27,1 \pm 1,1$	$27,6 \pm 1,1$
HbA1c (%)	$3,9 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$
Inzulín (pg/ml)	$139,2 \pm 40,1$	$314,7 \pm 47,9^*$
Cholesterol (mmol/l)	$5,1 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,4$
HDL Cholesterol (mmol/l)	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2^*$
Triglyceridy (mmol/l)	$1,7 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3^*$
CRP (mg/l)	$3,4 \pm 0,6$	$11,9 \pm 4,5^*$

8.2.2 Sérové koncentrace hormonů a cytokinů a jejich vztah k BMI a CRP

Pacienti se selháním ledvin měli 4-krát vyšší hodnoty CRP ve srovnání s kontrolní skupinou (tab. 8). Sérové hladiny adiponektinu, resistinu, interleukinu-6, MCP-1 byly ~ 2-krát vyšší ve skupině se selháním ledvin než v kontrolní skupině (Graf 4). Hladiny TNF- α byly ve skupině se selháním ledvin 4-krát vyšší (Graf 4). Ve skupině se selháním ledvin nebyly oproti kontrolní skupině nalezeny změny v sérových

hladinách leptinu (selhání ledvin vs. kontrolní skupina; $38,6 \pm 8,4$ ng/ml vs. $22,9 \pm 3,7$ ng/ml; $P=0,21$). Sérové hladiny resistinu pozitivně korelovaly s CRP ale nikoliv s BMI ($p=0,03$, $r=0,53$).

Graf 4 - Sérové koncentrace adiponektinu, resistinu, interleukinu-6, TNF- α a MCP-1 u zdravých kontrolních subjektů (tmavé sloupce) a pacientů se selháním ledvin (bílé sloupce). Vzorke byly odebrány po nočním lačnění. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM s $n=17$ pro kontrolní skupinu a $n=15$ pro skupinu se selháním ledvin. Statistická významnost byla vypočítána pomocí T-testu nebo Mann-Whitney Rank Sum testu. * značí $p < 0.05$ vs. kontrolní skupina.



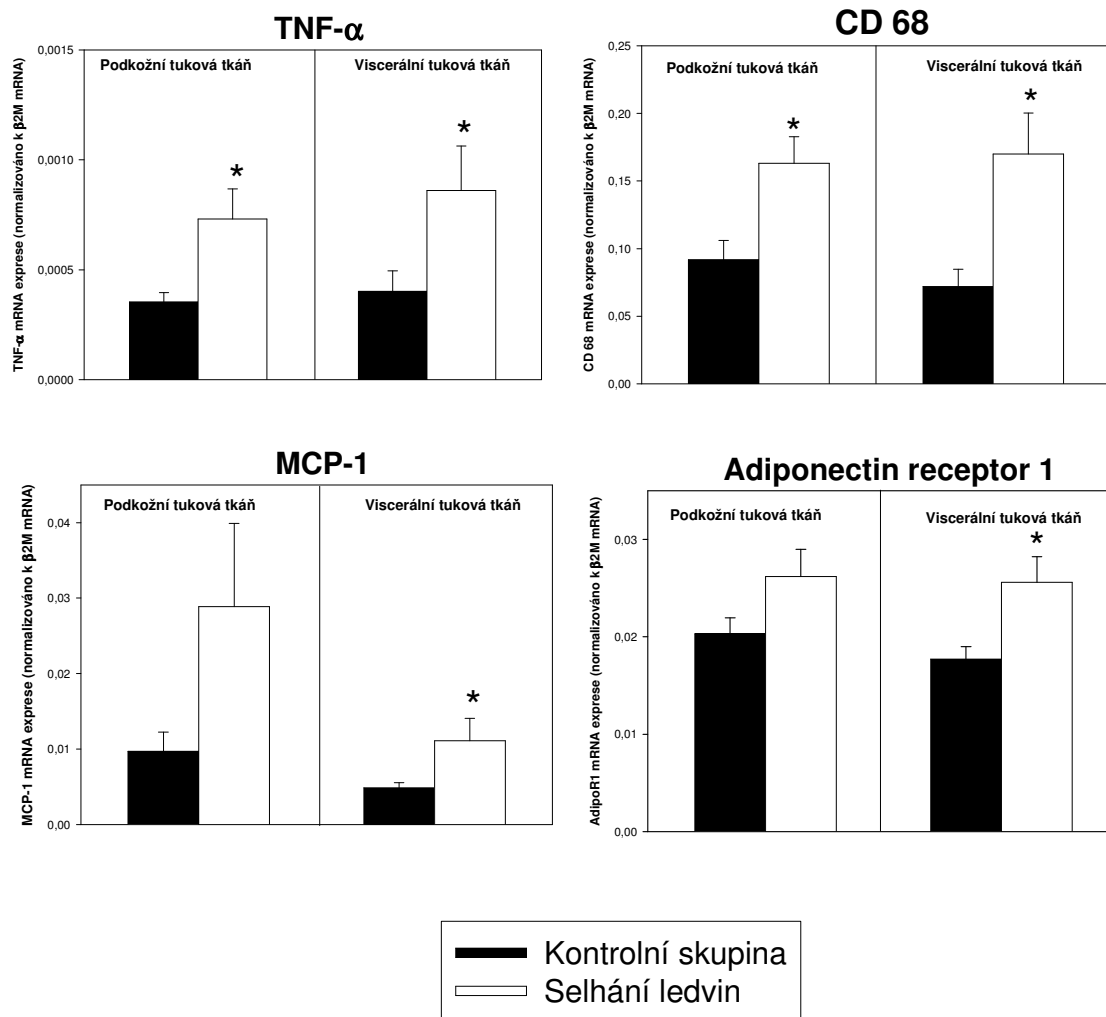
8.2.3 Změny exprese mRNA hormonů tukové tkáně a cytokinů a vztah k hladinám v cirkulaci.

Expres mRNA pro adiponektin, receptor 2 pro adiponektin, leptin, interleukin-6 a resistin v podkožní ani ve viscerální tukové tkáni u pacientů se selháním ledvin se nelišila od kontrolní skupiny. Expres mRNA pro TNF- α a marker imunokompetentních buněk CD68 byla signifikantně vyšší jak v podkožní tak ve viscerální tukové tkáni pacientů se selháním ledvin (Graf 5). Expres mRNA pro receptor 1 pro adiponektin a MCP-1 byla vyšší ve viscerální tukové tkáni ale nikoliv v podkožní tukové tkáni pacientů se selháním ledvin ve srovnání s kontrolní skupinou (Graf 5).

Expres mRNA pro leptin jak ve viscerální tak v podkožní tukové tkáni korelovala s cirkulujícími hladinami leptinu ($p=0,002$, $r=0,68$; $p=0,04$, $r=0,49$; respektive). Podobný vztah platil pro expresi mRNA pro interleukin-6 ve viscerální tukové tkáni a jeho cirkulující hladiny ($p=0,02$, $r=0,57$). Pro další sledované adipokiny nebyla nalezena signifikantní korelace mezi expresí mRNA a cirkulujícími hladinami.

Při srovnání podkožní a viscerální tukové tkáně u pacientů se selháním ledvin a kontrolní skupinou nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi expresí mRNA studovaných adipokinů.

Graf 5 - Expres mRNA pro TNF- α , CD 68, MCP-1 a receptor 1 pro adiponektin v podkožní a viscerální tukové tkáni u zdravých kontrolních subjektů (tmavé sloupce) a pacientů se selháním ledvin (bílé sloupce). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. $n=17$ pro kontrolní skupinu a $n=15$ pro skupinu se selháním ledvin. Statistická významnost byla vypočítána pomocí T-testu nebo Mann-Whitney Rank Sum testu. * značí $p < 0.05$ vs. kontrolní skupina.

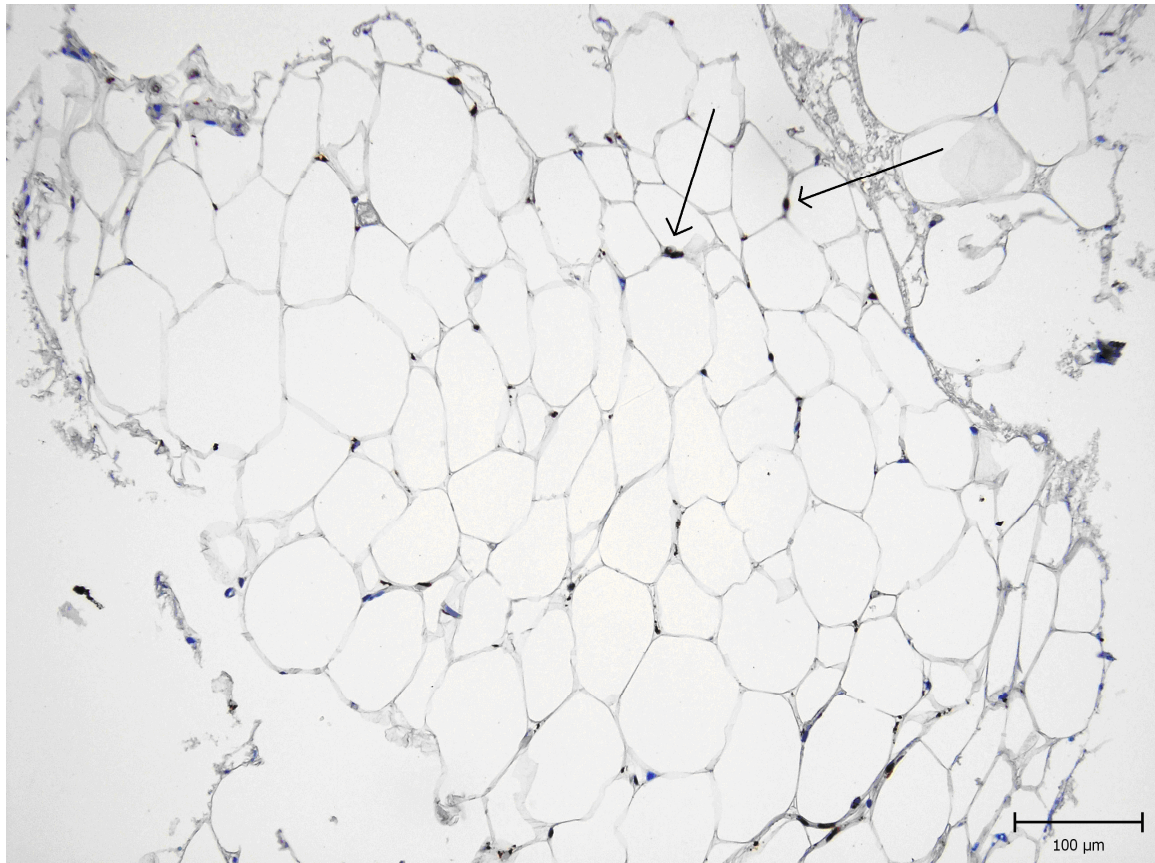


8.2.4 Imunohistochemické vyšetření tukové tkáně

Ve skupině pacientů se selháním ledvin byla nalezena zvýšená infiltrace jak viscerální tak podkožní tukové tkáně CD-68 pozitivními imunokompetentními buňkami (selhání

ledvin oproti kontrolní skupině $13,4 \pm 4,9$ vs. $3,1 \pm 1,8$ buněk na HPF, $p=0,03$ pro viscerální tukovou tkáň a $11,3 \pm 2,4$ vs. $6,1 \pm 1,7$ buněk na HPF, $p=0,04$ pro podkožní tukovou tkáň).

Obr. 4 – Imunohistochemické barvení viscerální tukové tkáně na CD-68 pozitivní imunokompetentní buňky u pacientky se selháním ledvin (zvětšení 200x)



8.3 Pref-1 a inzulínová rezistence

8.3.1 Expresa mRNA Pref-1 v podkožní a viscerální tukové tkáni u pacientek s obezitou a u kontrolní skupiny štíhlých žen

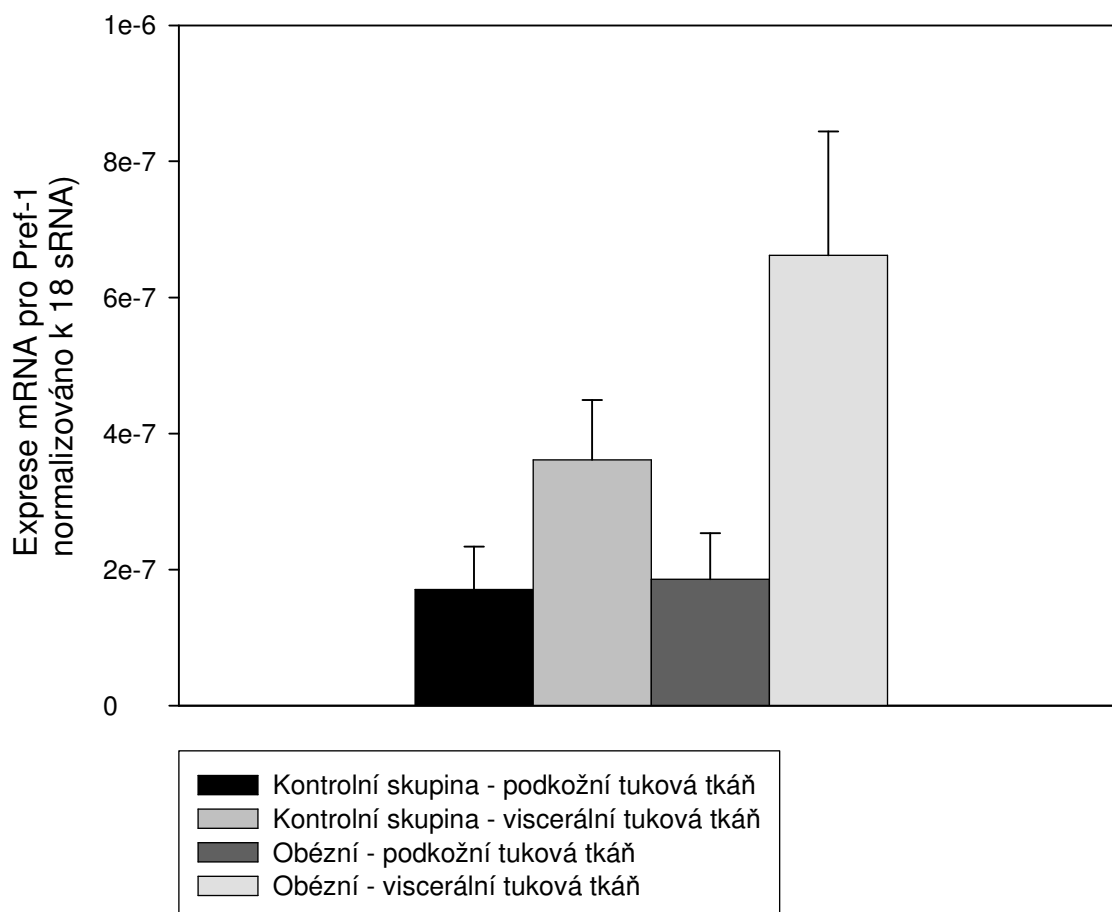
Srovnání 11 obézních žen a 7 zdravých pacientek z kontrolní skupiny v první podstudii je uvedeno v tab. 9.

Tab. 9 - Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní skupiny a obézních žen bez DM 2. typu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Statistická významnost byla vypočítána pomocí nepárového t-testu nebo Mann-Whitney Rank Sum testu. * značí $p < 0.05$ vs. kontrolní skupina.

Skupina	Kontrolní skupina	Obézní
Počet subjektů	7	11
Věk (roky)	47,7 \pm 3,9	40,8 \pm 3,4
BMI (kg/m ²)	23,6 \pm 0,6	43,8 \pm 1,0*
Glykémie (mmol/l)	4,22 \pm 0,33	5,41 \pm 0,81
Cholesterol (mmol/l)	5,04 \pm 0,42	4,39 \pm 0,28
Triglyceridy (mmol/l)	1,06 \pm 0,19	1,81 \pm 0,38
Insulin (mIU/l)	7,6 \pm 1,5	29,7 \pm 6,0*
HOMA index	1,43 \pm 0,20	7,62 \pm 2,60*
Leptin (ng/ml)	7,4 \pm 1,3	49,9 \pm 3,0*
Adiponektin (μ g/ml)	21,1 \pm 3,7	12,6 \pm 1,9*

Expresa mRNA pro Pref-1 měla tendenci ke zvýšení ve viscerální tukové tkáni ve srovnání s podkožní tukovou tkání jak u zdravé kontrolní skupiny tak u obézních pacientek. Obézní pacientky měly tendenci ke zvýšení exprese mRNA pro Pref-1 ve viscerální tukové tkáni ve srovnání s kontrolní skupinou (Graf 6). Všechny tyto výsledky byly hraniční, nicméně nedosáhly statistické významnosti.

Graf 6 - Expres mRNA pro Pref-1 v podkožní tukové tkáni a viscerální tukové tkáni u kontrolní skupiny a obézních pacientů. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM.



8.3.2 Srovnání kontrolní skupiny, pacientek s obezitou a obezitou a DM 2. typu

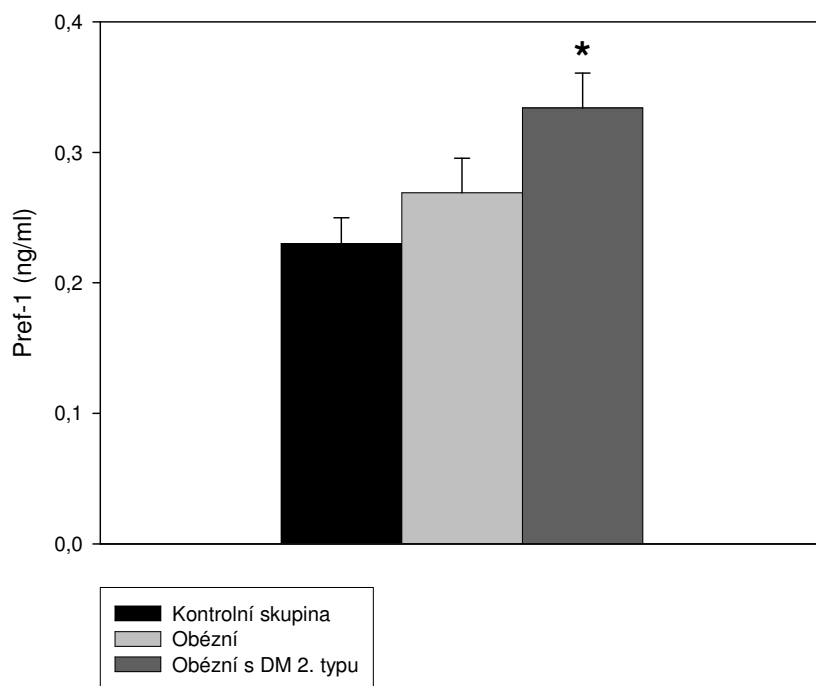
Srovnání kontrolní skupiny, obézních pacientů a obézních pacientů s DM 2. typu je uvedeno v tab. 10. Sérové koncentrace Pref-1 byly statisticky významně vyšší u obézních pacientů s DM 2. typu ve srovnání s kontrolní skupinou, hladiny u obézních pacientů bez DM 2. typu se od kontrolní skupiny nelišily (Graf 7).

Tab. 10 - Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní skupiny zdravých žen, obézních žen bez DM 2. typu a obézních žen s DM 2. typu.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Statistická významnost byla vypočítána pomocí t-testu nebo Mann-Whitney Rank Sum testu. * značí p<0.05 vs. kontrolní skupina; ° značí p<0.01 obézní s DM 2. typu vs. obézní

Skupina	Kontrolní skupina	Obézní bez DM 2. typu	Obézní s DM 2. typu
Počet subjektů	22	19	12
Věk (roky)	45,6 ± 2,5	48,2 ± 2,3	54,2 ± 1,8
BMI (kg/m²)	23,2 ± 0,4	47,8 ± 3,1*	50,9 ± 2,9*
Glykémie (mmol/l)	4,47 ± 0,16	5,14 ± 0,22*	10,48 ± 1,1*°
Cholesterol (mmol/l)	5,03 ± 0,14	4,82 ± 0,25	4,7 ± 0,25
Triglyceridy (mmol/l)	1,03 ± 0,11	1,50 ± 0,10*	3,43 ± 1,45*°
Insulin (mIU/l)	13,7 ± 1,5	27,3 ± 3,8*	55,7 ± 16,8*°
HOMA index	2,83 ± 0,34	6,46 ± 0,98*	22,51 ± 5,32*°
Leptin (ng/ml)	13,5 ± 1,7	50,7 ± 3,8*	52,7 ± 7,7
Adiponektin (µg/ml)	23,6 ± 2,2	17,2 ± 2,3*	16,2 ± 2,7

Graf 7 - Sérové koncentrace Pref-1 u kontrolní skupiny, obézních a obézních s DM 2. typu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Statistická významnost byla vypočítána pomocí t-testu nebo Mann-Whitney Rank Sum testu. * značí $p < 0,05$ obézní s DM 2. typu vs. kontrolní skupina.



V kombinované populaci zdravých neobézních žen a obézních žen s DM 2. typu korelovaly cirkulující hladiny Pref-1 s krevní glykemií ($r=0,348$, $p=0,010$), hladinami inzulínu ($r=0,390$, $p=0,004$), s HOMA-indexem ($r=0,426$, $p=0,002$), hladinami leptinu ($r=0,384$, $p=0,003$), ale ne s BMI, cholesterolem, triglyceridy a hladinou adiponektinu.

Při porovnání kontrolní skupiny zdravých neobézních žen a skupiny obézních žen bez DM 2. typu nebyla nalezena korelace hladin Pref-1 s žádným ze sledovaných faktorů.

8.3.3 Vliv diety s velmi nízkým obsahem kalorií na antropometrické, biochemické a hormonální parametry u obézních pacientek a obézních pacientek s DM 2. typu.

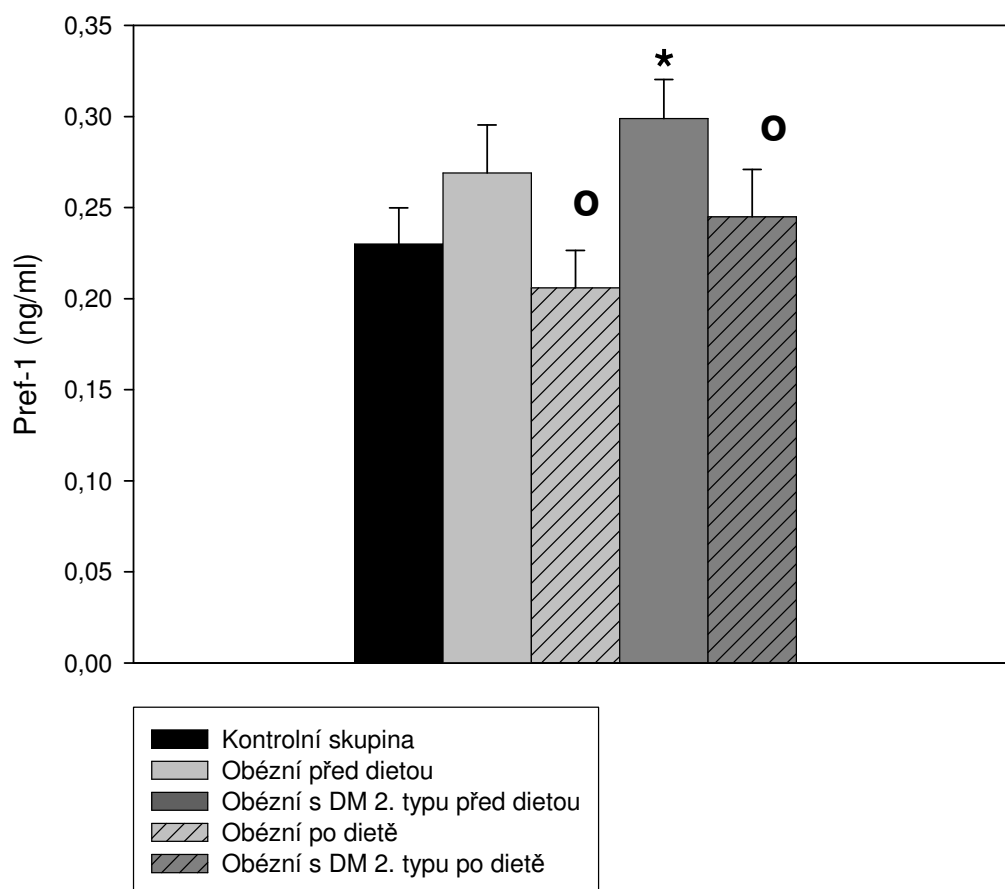
Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky 12 obézních žen s DM 2. typu před (DM 2. typu před dietou) a po 3 týdnech diety s velmi nízkým obsahem

kalorií (DM 2. typu po dietě); a 19 obézních pacientek bez DM 2. typu (Obézní před dietou) a po 3 týdnech diety s velmi nízkým obsahem kalorií (Obézní po dietě) jsou uvedeny v tab. 11. Sérové hladiny Pref-1 v obou skupinách signifikantně poklesly po 3 týdnech diety s velmi nízkým obsahem kalorií (graf 8).

Tab. 11 - Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky 12 obézních žen s DM 2. typu před (DM 2. typu před dietou) a po 3 týdnech diety s velmi nízkým obsahem kalorií (DM 2. typu po dietě); a 19 obézních pacientek bez DM 2. typu (Obézní před dietou) a po 3 týdnech diety s velmi nízkým obsahem kalorií (Obézní po dietě). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Statistická významnost byla vypočítána pomocí t-testu nebo Mann-Whitney Rank Sum testu. * značí $p < 0.05$ DM 2. typu před dietou vs. DM 2. typu po dietě, nebo Obézní před dietou vs. Obézní po dietě.

Skupina	Obézní s DM 2. typu		Obézní bez DM 2. typu	
	DM 2. typu před dietou	DM 2. typu po dietě	Obézní před dietou	Obézní po dietě
Počet subjektů	12	12	19	19
BMI (kg/m ²)	50,9 \pm 2,9	47,4 \pm 2,7*	48,2 \pm 2,3	45,7 \pm 2,0*
Glykémie (mmol/l)	10,48 \pm 1,1	7,43 \pm 0,80*	5,14 \pm 0,22	5,09 \pm 0,25
Cholesterol (mmol/l)	4,7 \pm 0,25	3,76 \pm 0,24*	4,82 \pm 0,25	4,16 \pm 0,34*
Triglyceridy (mmol/l)	3,43 \pm 1,45	2,32 \pm 0,68	1,50 \pm 0,10	1,58 \pm 0,29
Insulin (mIU/l)	55,7 \pm 16,8	31,4 \pm 5,2*	27,3 \pm 3,8	26,3 \pm 2,8
HOMA index	22,51 \pm 5,32	9,68 \pm 1,44*	6,46 \pm 0,98	5,68 \pm 0,67
Leptin (ng/ml)	52,7 \pm 7,7	45,2 \pm 7,0*	50,7 \pm 3,8	45,7 \pm 5,0
Adiponektin (μ g/ml)	16,2 \pm 2,7	15,5 \pm 2,4	17,2 \pm 2,3	18,7 \pm 2,3

Graf 8 - Sérové hladiny Pref-1 u kontrolní skupiny, obézních pacientů před dietou, obézních pacientů po 3 týdnech diety, pacientů s DM 2. typu před dietou, pacientů s DM 2. typu po 3 týdnech diety. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Statistická významnost byla vypočítána pomocí t-testu nebo Mann-Whitney Rank Sum testu. * značí $p < 0.01$ DM 2. typu vs. kontrolní skupina; o $p < 0,01$ DM 2. typu po dietě vs. DM 2. typu před dietou, nebo obézní po dietě vs. obézní před dietou.



9 Diskuze

9.1 *Systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně a inzulínová rezistence u kriticky nemocných*

Tuková tkáň byla již dříve identifikována jako zdroj komponent systému renin-angiotenzin-aldosteron (19); nicméně dosud nebylo popsáno, jakým způsobem odpovídá lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně na větší stresové podněty. Cílem naší studie bylo zjistit, jestli lokální produkce komponent systému renin-angiotenzin-aldosteron v tukové tkáni přispívá ke vzniku inzulínové rezistence po kardiochirurgickém zákroku. V této studii byli vybráni pacienti podstupující plánovanou srdeční operaci jako model inzulínové rezistence akutně vyvolané chirurgickým zákrokem. I přes poměrně heterogenní klinické charakteristiky souboru a malý počet pacientů tato studie prokazuje jednotnou odpověď organismu na stresový podnět. Operace významně zvýšila hladinu krevní glykémie stejně jako cirkulující hladiny inzulínu, což naznačuje rozvoj inzulínové rezistence. V této studii nicméně nebyla přímo měřena úroveň inzulínové rezistence, ale její přítomnost v pooperačním období po větší chirurgické operaci byla prokázána v jiných studiích (129). Sérové hodnoty adiponektinu vykazovaly tendenci ke snížení, ale nebylo dosaženo hranice statistické významnosti, což mohlo být částečně dáno také relativně malým počtem pacientů ve studii.

Výsledky této studie potvrzují, že hlavní komponenty systému renin-angiotenzin-aldosteron (např. angiotenzinogen, angiotenzin-konvertující enzym, receptor typu 1 pro angiotenzin II) jsou exprimovány jak v podkožní tak i epikardiální tukové tkáni. Naše studie navíc prokázala, že kardiochirurgický zákrok zvýšil expresi mRNA pro angiotenzinogen v epikardiální ale nikoliv v podkožní tukové tkáni, což naznačuje možné zapojení epikardiální tukové tkáně do vzniku lokální a případně i systémové inzulínové rezistence. Zvýšená exprese komponent systému renin-angiotenzin-aldosteron (angiotenzinogen, receptor typu 1 pro angiotenzin II) v lidské viscerální tukové tkáni oproti podkožní tukové tkáni u jedinců s normální i zvýšenou hmotností byla prokázána ve studii Giacchetiho a spol. (130). V naší studii jsme našli zvýšenou expresi mRNA pro angiotenzinogen v epikardiální tukové tkáni u všech pacientů nezávisle na předchozí léčbě inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu (ramipril) nebo statinů, přičemž u obou typů těchto léčiv je znám příznivý vliv na inzulínovou senzitivitu (131; 132). Údaje z naší studie tedy dále potvrzují pohled na

podkožní a viscerální tukovou tkáň jako na dva heterogenní orgány s různou expresí genů, produkcí proteinů a spojením s kardiovaskulárními chorobami, což je ve shodě s dříve provedenými studiemi, které také potvrzují rozdílnou genovou expresi tukové tkáně v těchto lokalizacích (33; 133). V naší studii nebyla nalezena korelace mezi krevní glykemií, sérovými koncentracemi inzulínu a adiponektinu a expresí mRNA pro angiotenzinogen v epikardiální tukové tkáni.

Nebyly také nalezeny rozdíly v expresi mRNA pro angiotenzin-konvertující enzym a receptor typu 1 pro angiotenzin II v tukové tkáni během kardiochirurgické operace, a také nebyly nalezeny rozdíly mezi podkožní a epikardiální tukovou tkání s ohledem na produkci angiotenzin-konvertujícího enzymu a receptoru typu 1 pro angiotenzin II. To je v rozporu se studií Giacchetiho a spol., která prokázala vyšší expresi mRNA receptoru typu 1 pro angiotenzin II ve viscerální tukové tkáni oproti podkožní tukové tkáni (130). V naší studii ale byl použit jiný zdroj viscerální tukové tkáně (epikardiální tuk) a jiný zdroj podkožní tukové tkáně (tuková tkáň z oblasti hrudníku).

V naší studii nebyl hodnocen vliv angiotenzinogenu produkovaného tukovou tkání na systémové změny krevního tlaku v pooperačním období, ačkoliv tento účinek je tradičně nejdůležitějším systémovým účinkem systému renin-angiotenzin-aldosteron. Vyhodnocení změn krevního tlaku v pooperačním období nebylo možné z důvodu hemodynamické nestability pacientů s častou nutností použití farmakologické nebo mechanické podpory oběhu (např. katecholaminy, intraaortální balónová pumpa apod.).

Naše studie naznačuje, že zvýšená exprese mRNA pro angiotenzinogen v epikardiální tukové tkáni vede ke zvýšené produkci angiotenzinu II. Angiotenzin II pak může interferovat s inzulínovou signální kaskádou. Naše data ukazují, že zvýšená produkce angiotenzinogenu v epikardiální tukové tkáni může společně se zvýšenou produkcí dalších prozánětlivých faktorů přispívat k rozvoji inzulínové rezistence u kriticky nemocných pacientů.

9.2 Úloha tukové tkáně při vzniku systémového zánětu u pacientů s chronickým selháním ledvin

Předchozí studie prokázaly, že tuková tkáň je důležitým endokrinním orgánem produkujícím mnoho hormonů a cytokinů včetně prozánětlivých faktorů jako TNF- α , interleukin-6 a dalších (134; 135). Produkce prozánětlivých cytokinů je také zvýšena u pacientů s obezitou a/nebo kardiovaskulárními onemocněními, což naznačuje etiopatogenetickou souvislost těchto faktorů s rozvojem aterosklerózy a inzulínové rezistence (136; 137). Jak experimentální tak klinické studie prokázaly, že tuková tkáň u obézních pacientů je charakterizována zvýšenou infiltrací imunokompetentními buňkami, které představují nejdůležitější producenty prozánětlivých faktorů (138; 139). Hypotéza etiopatogenetické souvislosti zánětlivé reakce tukové tkáně s rozvojem inzulínové rezistence/aterosklerózy byla také podpořena studiemi, které dokládají, že částečná inhibice zánětu v tukové tkáni transgenní (140) nebo farmakologickou manipulací zlepšuje inzulínovou senzitivitu a zpomaluje progresi aterosklerózy (141; 142).

V této studii jsme prokázali podobně jako v předchozích studiích (30), že pacienti se selháním ledvin mají výrazně zvýšené hladiny cirkulujících prozánětlivých cytokinů. Toto zvýšení je vysvětlováno kombinací zvýšené systémové produkce těchto faktorů díky subklinickému zánětu a případně také díky jejich snížené degradaci ledvinami. Naše současná studie ukazuje, že tuková tkáň pacientů se selháním ledvin by mohla být významným zdrojem prozánětlivých cytokinů. Již dříve bylo prokázáno, že systémová aktivace imunitní odpovědi kardiochirurgickým zákrokem výrazně zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů v podkožní a epikardiální tukové tkáni podobně jako v nynější studii (27; 33; 143; 144). Domníváme se proto, že aktivace imunokompetentních buněk v tukové tkáni může představovat důležitou a univerzální část systémové zánětlivé reakce aktivované různými signály.

Ve skupině pacientů se selháním ledvin jsme našli, podobně jako v předchozích studiích (145; 146) charakteristickou dyslipidémii se zvýšením triglyceridů a snížením HDL cholesterolu. 4 z 15 pacientů byli léčeni statiny pro hyperlipidémii. U statinů je znám jejich protizánětlivý účinek (1), a jejich podání pacientům mohlo tedy částečně ovlivnit výsledky studie. V analýze podskupiny pacientů se selháním ledvin užívajících statiny nicméně nebyl pozorován rozdíl oproti skupině bez terapie statiny s ohledem na hladinu prozánětlivých cytokinů nebo CRP.

Nikdo ze subjektů ve studii neměl diabetes mellitus. Obě skupiny měly podobnou hladinu HbA1c, ale skupina se selháním ledvin měla statisticky vyšší hladiny inzulínu. Zvýšené hladiny inzulínu ve skupině se selháním ledvin jsou pravděpodobně ukazatelem zvýšené inzulínové rezistence způsobené prozánětlivými cytokiny nebo jinými faktory (147; 148). Navíc se na nich může také podílet snížená degradace inzulínu v důsledku poruchy renální funkce.

Profil prozánětlivých cytokinů a zvýšená infiltrace jak viscerální tak podkožní tukové tkáně CD-68 pozitivními imunokompetentními buňkami u pacientů se selháním ledvin je podobná jako u pacientů s obezitou a s inzulínovou rezistencí. Jak podkožní tak viscerální tuková tkáň pacientů se selháním ledvin se vyznačuje významným zvýšením exprese markeru přítomnosti imunokompetentních buněk CD-68 a zvýšenou infiltrací CD-68 pozitivními imunokompetentními buňkami podobně, jako to bylo popsáno u pacientů s obezitou (139). Tento náález potvrzuje zvýšenou přítomnost imunokompetentních buněk v tukové tkáni pacientů se selháním ledvin. Tyto buňky mohou společně s adipocyty výrazně přispívat ke zvýšení produkce prozánětlivých faktorů v tukové tkáni těchto pacientů.

Zatímco některé charakteristiky endokrinní funkce tukové tkáně u pacientů se selháním ledvin byly podobné jako u pacientů s obezitou, byly nalezeny také některé významné rozdíly. Například zvýšené hladiny cirkulujících prozánětlivých cytokinů u pacientů se selháním ledvin byly doprovázeny zvýšenou hladinou adiponektinu. U pacientů s obezitou, aterosklerózou, inzulínovou rezistencí a DM 2. typu jsou obvykle nacházeny snížené hladiny adiponektinu (149; 150), zatímco u štíhlých a fyzicky aktivních jedinců jsou hladiny adiponektinu zvýšené (151; 152). Adiponektin cirkuluje v různých isoformách a jeho HMW (high molecular weight) isoforma je považována za nejvíce spojenou s inzulínovou senzitivitou (153). Nedávno bylo studováno složení isoform adiponektinu u pacientů se selháním ledvin a bylo podobné jako u zdravých kontrolních subjektů (154). V naší studii jsme prokázali, že pacienti se selháním ledvin mají nejen zvýšené cirkulující hladiny adiponektinu, ale také zvýšenou expresi mRNA pro receptor typu 1 pro adiponektin ve viscerální tukové tkáni. Tento náález je v souladu s výsledky Shen a spol., kteří našli také zvýšenou expresi mRNA pro receptor typu 1 pro adiponektin na mononukleárních buňkách v periferní krvi pacientů se selháním ledvin v porovnání se zdravými kontrolními subjekty (154). Zvýšení receptoru typu 1 pro adiponektin ve viscerální

tukové tkáni by mohlo představovat kompenzatorní protizánětlivou odpověď na uremické prostředí. Nicméně interakce mezi adiponektinem a jeho receptorem se zdá být velmi komplexní. Její regulace a fyziologické a patofyziologické vztahy nepochybně vyžadují další zkoumání. Také klinický význam a faktory kontrolující expresi receptoru pro adiponektin nejsou jasné a u pacientů se selháním ledvin nepochybně vyžadují také další výzkum.

Naše výsledky prokázaly u pacientů se selháním ledvin zvýšenou infiltraci tukové tkáně imunokompetentními buňkami a zvýšenou expresí prozánětlivých cytokinů. Teprve další výzkumy mohou prokázat, zda produkce prozánětlivých molekul tukovou tkání má zásadní význam při rozvoji zánětlivé reakce u pacientů s renálním selháním.

9.3 Pref-1 a inzulínová rezistence

Nejdůležitějším nálezem této studie je, že bazální sérové koncentrace Pref-1 jsou významně vyšší u obézních pacientů s DM 2. typu ve srovnání s kontrolní skupinou, zatímco u obézních pacientů bez DM 2. typu se sérové koncentrace neliší od kontrolní skupiny. Dále bylo prokázáno, že dieta s velmi nízkým obsahem kalorií podávaná po dobu 3 týdnů snižuje sérové koncentrace Pref-1 u obézních pacientů jak s DM 2. typu tak bez současné přítomnosti DM 2. typu. Expres mRNA pro Pref-1 pouze vykazovala tendenci ke zvýšení ve viscerální tukové tkáni ve srovnání s podkožní tukovou tkání jak u zdravých subjektů tak u obézních pacientů. Obézní pacienti vykazovali dále tendenci k vyšší expresi Pref-1 ve viscerální tukové tkáni. Žádné z těchto srovnání však nedosáhlo statistické významnosti.

Fenotyp obézních pacientů s DM 2. typu se liší od obézních pacientů bez DM 2. typu mimo jiné stupněm inzulínové rezistence. Naše výsledky naznačují, že obézní pacienti s DM 2. typu mají vyšší cirkulující hladiny Pref-1 ve srovnání s kontrolní skupinou. Vyšší hladiny Pref-1 u obézních pacientů s DM 2. typu také korelují s hladinou inzulínu, glykemií a hladinou leptinu. Nález úzkého spojení zvýšených hladin Pref-1 se zvýšením stupně inzulínové rezistence u diabetických pacientů je v souladu s myším modelem nadprodukce Pref-1, kdy tyto myši vykazují také vysoký stupeň inzulínové rezistence (125; 126). V naší studii jsme také sledovali možný vliv redukce hmotnosti na cirkulující hladiny Pref-1. V této studii bylo stejně jako v předchozích studiích prokázáno, že dieta s velmi nízkým obsahem kalorií zlepšuje inzulínovou senzitivitu (8) a nově také, že pokles tělesné hmotnosti je doprovázen snížením cirkulujících hladin Pref-1 u obézních pacientů s i bez DM 2. typu. Ověření možnosti, že zlepšení inzulínové senzitivity je způsobeno zvýšenou diferenciací preadipocytů v prostředí nižších koncentrací Pref-1 a/nebo dalších faktorů inhibujících diferenciaci preadipocytů (např. angiotenzinu II), vyžaduje další výzkum. *Naše studie tedy prokázala, že bazální hodnoty Pref-1 jsou v porovnání s kontrolní skupinou významně vyšší u obézních žen s DM 2. typu ale nikoliv u obézních žen bez DM 2. typu. Dále naše studie prokázala, že dieta s velmi nízkým obsahem kalorií snižuje tělesnou hmotnost a cirkulující hladiny Pref-1 jak u obézních žen s DM 2. typu tak i u obézních žen bez diabetu. Tyto poznatky podporují hypotézu, že Pref-1 může mít význam v ovlivnění stupně inzulínové rezistence.*

10 Závěr

V oblasti hyperglykémie a inzulínové rezistence probíhá v posledních letech rozsáhlý výzkum, jehož cílem je jak rozpoznání patofyziologických mechanismů tak i následné zaměření na klinické výsledky s cílem zlepšit prognózu pacientů. Ukazuje se, že tuková tkáň jakožto nejobemnější endokrinně aktivní orgán lidského těla hraje v procesu hyperglykémie a inzulínové rezistence jednu z hlavních rolí. Výsledky našich studií úlohu tukové tkáně při vzniku inzulínové rezistence potvrzují.

Lokální systém renin-angiotenzin-aldosteron tukové tkáně představuje se svým vlivem na inzulínovou senzitivitu novou potenciální modalitu, jak ovlivnit hyperglykémii u kriticky nemocných. Mohlo by se jednat o slibnou cestu, jelikož pozitivní vliv léků blokujících systém renin-angiotenzin-aldosteron byl prokázán u pacientů s arteriální hypertenzí, srdečním selháním i inzulínovou rezistencí u metabolického syndromu. Vliv podávání léků blokujících systém renin-angiotenzin-aldosteron kriticky nemocným pacientům bude nutné v budoucnu dále ověřit.

Naše studie také ukazují, že pro udržení či naopak poruchy glukózové a lipidové homeostázy jsou nutné jak správně regulované procesy adipogeneze a metabolismu tukové tkáně, tak i další faktory jako je například přítomnost subklinického zánětu v tukové tkáni. Tuková tkáň se může podílet díky zvýšené infiltraci imunokompetentními buňkami, produkcí prozánětlivých cytokinů a následném zhoršení inzulínové rezistence na vyšší kardiovaskulární mortalitě a morbiditě pacientů se selháním ledvin. Léčba vedoucí ke snížení zánětu v tukové tkáni by mohla zlepšit i prognózu pacientů se selháním ledvin.

Pref-1 pak představuje nový faktor podílející se na diferenciaci preadipocytů. Jeho vyšší hladiny u obézních pacientů s DM 2. typu mohou být obrazem či etiologickým faktorem potencionálně zhoršujícím inzulínovou rezistenci. Pref-1 je bezpochyby velmi zajímavou molekulou pro další výzkum. Léky snižující jeho hladinu by v budoucnosti mohly vést k pozitivnímu ovlivnění diferenciaci nových adipocytů a tím zlepšení inzulínové senzitivity u pacientů s inzulínovou rezistencí.

11 Literatura

1. Dandona P: Effects of antidiabetic and antihyperlipidemic agents on C-reactive protein. *Mayo Clin Proc* 83:333-342, 2008
2. Smyth S, Heron A: Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med* 12:75-80, 2006
3. Shulman GI: Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176, 2000
4. Reaven GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607, 1988
5. Reaven G: Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation* 106:286-288, 2002
6. Haffner SM: Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 92:18J-26J, 2003
7. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339:229-234, 1998
8. Anderlova K, Kremen J, Dolezalova R, Housova J, Haluzikova D, Kunesova M, Haluzik M: The influence of very-low-calorie-diet on serum leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in obese women. *Physiol Res* 55:277-283, 2006
9. Housa D, Housova J, Vernerova Z, Haluzik M: Adipocytokines and cancer. *Physiol Res* 55:233-244, 2006
10. Housová J, Kiziová J, Anderlová K, Papežová H, Haluzík M: Serum concentrations of adiponectin in patients with restrictive and purgative subtype of mental anorexia. *Čas Lék Česk* 144:278-281, 2005
11. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB: Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 83:S192-203, 2007
12. 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
13. Brix-Christensen V, Gjedsted J, Andersen SK, Vestergaard C, Nielsen J, Rix T, Nyboe R, Andersen NT, Larsson A, Schmitz O, Tonnesen E: Inflammatory response during hyperglycemia and hyperinsulinemia in a porcine endotoxemic model: the contribution of essential organs. *Acta Anaesthesiol Scand* 49:991-998, 2005
14. Matsuzawa Y, Shimomura I, Kihara S, Funahashi T: Importance of adipocytokines in obesity-related diseases. *Horm Res* 60 Suppl 3:56-59, 2003
15. Petersen KF, Shulman GI: Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 119:S10-16, 2006
16. Staiger H, Haring HU: Adipocytokines: fat-derived humoral mediators of metabolic homeostasis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113:67-79, 2005
17. Calabro P, Yeh ET: Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem* 42:63-91, 2007
18. Wellen KE, Hotamisligil GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-1119, 2005
19. Engeli S, Negrel R, Sharma AM: Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35:1270-1277, 2000

20. Iacobellis G, Sharma AM: Epicardial adipose tissue as new cardio-metabolic risk marker and potential therapeutic target in the metabolic syndrome. *Curr Pharm Des* 13:2180-2184, 2007
21. Jones BH, Standridge MK, Taylor JW, Moustaid N: Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol* 273:R236-242, 1997
22. Cooper ME: The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. *Am J Hypertens* 17:16S-20S; quiz A12-14, 2004
23. Kim S, Soltani-Bejnood M, Quignard-Boulangé A, Massiera F, Teboul M, Ailhaud G, Kim JH, Moustaid-Moussa N, Voy BH: The adipose Renin-Angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal Renin-Angiotensin system. *J Biomed Biotechnol* 2006:27012, 2006
24. Ganong WF: Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 205:213-219, 1994
25. Ferder L, Inserra F, Martínez-Maldonado M: Inflammation and the metabolic syndrome: role of angiotensin II and oxidative stress. *Curr Hypertens Rep* 8:191-198, 2006
26. Kurata A, Nishizawa H, Kihara S, Maeda N, Sonoda M, Okada T, Ohashi K, Hibuse T, Fujita K, Yasui A, Hiuge A, Kumada M, Kuriyama H, Shimomura I, Funahashi T: Blockade of Angiotensin II type-1 receptor reduces oxidative stress in adipose tissue and ameliorates adipocytokine dysregulation. *Kidney Int* 70:1717-1724, 2006
27. 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*, 2006
28. Yao Q, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P: Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. *Scand J Urol Nephrol* 38:405-416, 2004
29. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF: Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 116:85-97, 2007
30. Yao Q, Axelsson J, Heimbürger O, Stenvinkel P, Lindholm B: Systemic inflammation in dialysis patients with end-stage renal disease: causes and consequences. *Minerva Urol Nefrol* 56:237-248, 2004
31. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J: Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 15:953-960, 2000
32. Mistrík E, Bláha V, Dusilová-Sulková S, Sobotka L: The MIAC (malnutrition, inflammation, atherosclerosis, calcification) syndrome. *Vnitř Lék* 53:1092-1099, 2007
33. 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
34. Villena JA, Kim KH, Sul HS: Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm Metab Res* 34:664-670, 2002
35. Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique CM, Stas S, Sowers JR: Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Oxidative Stress in Cardiovascular Insulin Resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007

36. Reid IA, Morris BJ, Ganong WF: The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 40:377-410, 1978
37. Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russell RP, Hermann J: Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1:287-291, 1979
38. Carey RM, Siragy HM: Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24:261-271, 2003
39. Reudelhuber TL: The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:155-159, 2005
40. Pagliaro P, Penna C: Rethinking the renin-angiotensin system and its role in cardiovascular regulation. *Cardiovasc Drugs Ther* 19:77-87, 2005
41. Stanton A: Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs* 3:389-394, 2003
42. van Kats JP, Chai W, Duncker DJ, Schalekamp MA, Danser AH: Adrenal angiotensin: origin and site of generation. *Am J Hypertens* 18:1104-1110, 2005
43. Brown B, Hall AS: Renin-angiotensin system modulation: the weight of evidence. *Am J Hypertens* 18:127S-133S, 2005
44. Atlas SA: The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 13:9-20, 2007
45. Pitt B: "Escape" of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. *Cardiovasc Drugs Ther* 9:145-149, 1995
46. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P: Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med* 334:939-945, 1996
47. Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, Messerli FH, Schmieder RE: A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med* 115:41-46, 2003
48. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW: Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* 42:1050-1065, 2003
49. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S: Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-883, 1999
50. Heron-Milhavet L, Haluzik M, Yakar S, Gavrilova O, Pack S, Jou WC, Ibrahimi A, Kim H, Hunt D, Yau D, Asghar Z, Joseph J, Wheeler MB, Abumrad NA, LeRoith D: Muscle-specific overexpression of CD36 reverses the insulin resistance and diabetes of MKR mice. *Endocrinology* 145:4667-4676, 2004
51. Ruilope LM, Rosei EA, Bakris GL, Mancina G, Poulter NR, Taddei S, Unger T, Volpe M, Waeber B, Zannad F: Angiotensin receptor blockers: therapeutic targets and cardiovascular protection. *Blood Press* 14:196-209, 2005
52. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP: Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent

- antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation* 111:1012-1018, 2005
53. Pool JL: Direct renin inhibition: focus on aliskiren. *J Manag Care Pharm* 13:21-33, 2007
54. Engeli S, Sharma AM: Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm Metab Res* 32:485-499, 2000
55. Schling P, Mallow H, Trindl A, Loffler G: Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:336-341, 1999
56. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA: Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R943-949, 2004
57. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H: Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359:995-1003, 2002
58. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmaki K, Dahlof B, de Faire U, Morlin C, Karlberg BE, Wester PO, Bjorck JE: Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 353:611-616, 1999
59. Scheen AJ: Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs* 64:2537-2565, 2004
60. Vermes E, Ducharme A, Bourassa MG, Lessard M, White M, Tardif JC: Enalapril reduces the incidence of diabetes in patients with chronic heart failure: insight from the Studies Of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 107:1291-1296, 2003
61. Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, Holman RR: Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* 368:1096-1105, 2006
62. Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH, Jr.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 46:821-826, 2005
63. Andraws R, Brown DL: Effect of inhibition of the renin-angiotensin system on development of type 2 diabetes mellitus (meta-analysis of randomized trials). *Am J Cardiol* 99:1006-1012, 2007
64. Gillespie EL, White CM, Kardas M, Lindberg M, Coleman CI: The impact of ACE inhibitors or angiotensin II type 1 receptor blockers on the development of new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28:2261-2266, 2005
65. Meade MO, Richardson WS: Selecting and appraising studies for a systematic review. *Ann Intern Med* 127:531-537, 1997
66. Schulz KF, Chalmers I, Hayes RJ, Altman DG: Empirical evidence of bias. Dimensions of methodological quality associated with estimates of treatment effects in controlled trials. *JAMA* 273:408-412, 1995
67. Hansson L, Lindholm LH, Ekblom T, Dahlof B, Lanke J, Schersten B, Wester PO, Hedner T, de Faire U: Randomised trial of old and new antihypertensive drugs in

- elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension-2 study. *Lancet* 354:1751-1756, 1999
68. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA* 288:2981-2997, 2002
69. Wing LM, Reid CM, Ryan P, Beilin LJ, Brown MA, Jennings GL, Johnston CI, McNeil JJ, Macdonald GJ, Marley JE, Morgan TO, West MJ: A comparison of outcomes with angiotensin-converting--enzyme inhibitors and diuretics for hypertension in the elderly. *N Engl J Med* 348:583-592, 2003
70. Braunwald E, Domanski MJ, Fowler SE, Geller NL, Gersh BJ, Hsia J, Pfeffer MA, Rice MM, Rosenberg YD, Rouleau JL: Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease. *N Engl J Med* 351:2058-2068, 2004
71. Dahlof B, Sever PS, Poulter NR, Wedel H, Beevers DG, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J: Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 366:895-906, 2005
72. Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A: The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* 21:875-886, 2003
73. Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Marchlewska A, Heimbürger O, Barany P, Hoff CM, Holmes CJ, Suliman M, Lindholm B, Schalling M, Nordfors L: A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney Int Suppl*:S172-176, 2003
74. Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B, Zanchetti A: Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 363:2022-2031, 2004
75. Moriuchi A, Yamasaki H, Shimamura M, Kita A, Kuwahara H, Fujishima K, Satoh T, Fukushima K, Fukushima T, Hayakawa T, Mizuguchi H, Nagayama Y, Abiru N, Kawasaki E, Eguchi K: Induction of human adiponectin gene transcription by telmisartan, angiotensin receptor blocker, independently on PPAR-gamma activation. *Biochem Biophys Res Commun* 356:1024-1030, 2007
76. Shangraw RE, Jahoor F, Miyoshi H, Neff WA, Stuart CA, Herndon DN, Wolfe RR: Differentiation between septic and postburn insulin resistance. *Metabolism* 38:983-989, 1989
77. Van den Berghe G: Novel insights into the neuroendocrinology of critical illness. *Eur J Endocrinol* 143:1-13, 2000
78. Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H, Bouillon R: Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 354:449-461, 2006
79. Fink MP, Evans TW: Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report from a Round Table Conference held in Brussels. *Intensive Care Med* 28:369-375, 2002

80. Golden SH, Peart-Vigilance C, Kao WH, Brancati FL: Perioperative glycemic control and the risk of infectious complications in a cohort of adults with diabetes. *Diabetes Care* 22:1408-1414, 1999
81. Parsons MW, Barber PA, Desmond PM, Baird TA, Darby DG, Byrnes G, Tress BM, Davis SM: Acute hyperglycemia adversely affects stroke outcome: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *Ann Neurol* 52:20-28, 2002
82. Winocour PD: Platelets, vascular disease, and diabetes mellitus. *Can J Physiol Pharmacol* 72:295-303, 1994
83. Krinsley JS: Effect of an intensive glucose management protocol on the mortality of critically ill adult patients. *Mayo Clin Proc* 79:992-1000, 2004
84. Alonso de Vega JM, Diaz J, Serrano E, Carbonell LF: Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 30:1782-1786, 2002
85. Cely CM, Arora P, Quartin AA, Kett DH, Schein RM: Relationship of baseline glucose homeostasis to hyperglycemia during medical critical illness. *Chest* 126:879-887, 2004
86. Umpierrez GE, Isaacs SD, Bazargan N, You X, Thaler LM, Kitabchi AE: Hyperglycemia: an independent marker of in-hospital mortality in patients with undiagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:978-982, 2002
87. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC: Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet* 355:773-778, 2000
88. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC: Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* 32:2426-2432, 2001
89. Lapot M, Ciechanowska M, Malewski T, Misztal T, Mateusiak K, Przekop F: The effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor genes in the discrete regions of the hypothalamus and pituitary of anestrous ewes. *Reprod Biol* 7:55-71, 2007
90. Girotti M, Weinberg MS, Spencer RL: Differential responses of hypothalamus-pituitary-adrenal axis immediate early genes to corticosterone and circadian drive. *Endocrinology* 148:2542-2552, 2007
91. Thorell A, Loftenius A, Andersson B, Ljungqvist O: Postoperative insulin resistance and circulating concentrations of stress hormones and cytokines. *Clin Nutr* 15:75-79, 1996
92. Spellman CW: Islet cell dysfunction in progression to diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc* 107 Suppl:S1-5, 2007
93. Rolih CA, Ober KP: The endocrine response to critical illness. *Med Clin North Am* 79:211-224, 1995
94. Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Reimers JI, Pociot F, Andersen HU, Karlsen A, Bjerre U, Bergholdt R: Cytokines and the endocrine system. I. The immunoendocrine network. *Eur J Endocrinol* 133:660-671, 1995
95. Petit F, Bagby GJ, Lang CH: Tumor necrosis factor mediates zymosan-induced increase in glucose flux and insulin resistance. *Am J Physiol* 268:E219-228, 1995
96. Mehta VK, Hao W, Brooks-Worrell BM, Palmer JP: Low-dose interleukin 1 and tumor necrosis factor individually stimulate insulin release but in combination cause suppression. *Eur J Endocrinol* 130:208-214, 1994
97. Davey KA, Garlick PB, Warley A, Southworth R: Immunogold labeling study of the distribution of GLUT-1 and GLUT-4 in cardiac tissue following stimulation by insulin or ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2009-2019, 2007

98. Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS: Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol* 195:485-494, 2007
99. Zulet MA, Puchau B, Navarro C, Marti A, Martinez JA: Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies. *Nutr Hosp* 22:511-527, 2007
100. Grune T, Berger MM: Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:712-717, 2007
101. Hsiai T, Berliner JA: Oxidative stress as a regulator of murine atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 8:1222-1229, 2007
102. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H: Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52:581-587, 2003
103. Sarkar FH, Li Y: NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front Biosci* 13:2950-2959, 2008
104. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
105. Avena R, Mitchell ME, Nylen ES, Curry KM, Sidawy AN: Insulin action enhancement normalizes brachial artery vasoactivity in patients with peripheral vascular disease and occult diabetes. *J Vasc Surg* 28:1024-1031; discussion 1031-1022, 1998
106. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX: Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 17:2034-2047, 2006
107. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 9:S16-23, 1998
108. Kaysen GA, Eiserich JP: The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15:538-548, 2004
109. Trevisan R, Dodesini AR, Lepore G: Lipids and renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17:S145-147, 2006
110. Sandhu S, Wiebe N, Fried LF, Tonelli M: Statins for improving renal outcomes: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 17:2006-2016, 2006
111. Jofre R, Rodriguez-Benitez P, Lopez-Gomez JM, Perez-Garcia R: Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 17:S274-280, 2006
112. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM: The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 62:1524-1538, 2002
113. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK: Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int* 63:179-185, 2003
114. Touyz RM, Yao G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL: p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:512-518, 2005
115. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW: Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 94:437-444, 1994

116. Touyz RM: Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248-252, 2004
117. Schiffrin EL, Touyz RM: From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H435-446, 2004
118. Qunibi WY: Reducing the burden of cardiovascular calcification in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16 Suppl 2:S95-102, 2005
119. Shoji T, Nishizawa Y: Chronic kidney disease as a metabolic syndrome with malnutrition--need for strict control of risk factors. *Intern Med* 44:179-187, 2005
120. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809, 1998
121. Wang Y, Kim KA, Kim JH, Sul HS: Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr* 136:2953-2956, 2006
122. Kim KA, Kim JH, Wang Y, Sul HS: Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 27:2294-2308, 2007
123. Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS: Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem J* 364:137-144, 2002
124. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS: Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* 22:5585-5592, 2002
125. Lee K, Villena JA, Moon YS, Kim KH, Lee S, Kang C, Sul HS: Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest* 111:453-461, 2003
126. Villena JA, Choi CS, Wang Y, Kim S, Hwang YJ, Kim YB, Cline G, Shulman GI, Sul HS: Resistance to high fat diet-induced obesity but exacerbated insulin resistance in mice overexpressing Pref-1: a new model of partial lipodystrophy. *Diabetes*, 2008
127. Giralt M, Domingo P, Guallar JP, Rodriguez de la Concepcion ML, Alegre M, Domingo JC, Villarroya F: HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* 11:729-740, 2006
128. Koutkia P, Grinspoon S: HIV-associated lipodystrophy: pathogenesis, prognosis, treatment, and controversies. *Annu Rev Med* 55:303-317, 2004
129. Nygren J, Thorell A, Efendic S, Nair KS, Ljungqvist O: Site of insulin resistance after surgery: the contribution of hypocaloric nutrition and bed rest. *Clin Sci (Lond)* 93:137-146, 1997
130. Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, Guerrieri M, Mantero F: Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* 15:381-388, 2002
131. Ostergren J: Renin-angiotensin-system blockade in the prevention of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 76:S13-21, 2007
132. Huptas S, Geiss HC, Otto C, Parhofer KG: Effect of atorvastatin (10 mg/day) on glucose metabolism in patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 98:66-69, 2006
133. Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556, 2004

134. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415, 1995
135. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312, 2001
136. McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S: Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2407, 2002
137. Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S: Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 109:243-256, 2005
138. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-1830, 2003
139. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003
140. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 293:1673-1677, 2001
141. Esposito K, Ciotola M, Carleo D, Schisano B, Saccomanno F, Sasso FC, Cozzolino D, Assaloni R, Merante D, Ceriello A, Giugliano D: Effect of rosiglitazone on endothelial function and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 29:1071-1076, 2006
142. Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α Activation Increases Adiponectin Receptors and Reduces Obesity-Related Inflammation in Adipose Tissue: Comparison of Activation of PPAR α , PPAR γ , and Their Combination. *Diabetes* 54:3358-3370, 2005
143. 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
144. Roubicek T, Dolinkova M, Blaha J, Haluzikova D, Bosanska L, Mraz M, Kremen J, Haluzik M: Increased angiotensinogen production in epicardial adipose tissue during cardiac surgery: possible role in a postoperative insulin resistance. *Physiol Res* 57: 911-917, 2008
145. Harper CR, Jacobson TA: Managing dyslipidemia in chronic kidney disease. *J Am Coll Cardiol* 51:2375-2384, 2008
146. Sniderman A, Vu H, Cianflone K: Effect of moderate hypertriglyceridemia on the relation of plasma total and LDL apo B levels. *Atherosclerosis* 89:109-116, 1991
147. Pickkers P, Hoedemaekers A, Netea MG, de Galan BE, Smits P, van der Hoeven JG, van Deuren M: Hypothesis: Normalisation of cytokine dysbalance explains the favourable effects of strict glucose regulation in the critically ill. *Neth J Med* 62:143-150, 2004
148. Becker B, Kronenberg F, Kielstein JT, Haller H, Morath C, Ritz E, Fliser D: Renal insulin resistance syndrome, adiponectin and cardiovascular events in patients with kidney disease: the mild and moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol* 16:1091-1098, 2005
149. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S,

- Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83, 1999
150. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-1599, 2000
151. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM: Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3815-3819, 2001
152. Housova J, Anderlova K, Krizova J, Haluzikova D, Kremen J, Kumstyrova T, Papezova H, Haluzik M: Serum adiponectin and resistin concentrations in patients with restrictive and binge/purge form of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1366-1370, 2005
153. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE: Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279:12152-12162, 2004
154. Shen YY, Charlesworth JA, Kelly JJ, Loi KW, Peake PW: Up-regulation of adiponectin, its isoforms and receptors in end-stage kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 22:171-178, 2007

12 Seznam publikovaných článků a abstrakt

1. Publikace, které jsou podkladem práce:

Roubicek T, Dolinkova M, Blaha J, Haluzikova D, Bosanska L, Mraz M, Kremen J, Haluzik M. Increased angiotensinogen production in epicardial adipose tissue during cardiac surgery: possible role in a postoperative insulin resistance. *Physiol. Res.* 2008, 57: 911-917. – IF 1,5

Roubicek T, Bartlova M, Krajickova J, Haluzikova D, Mraz M, Lacinova Z, Kudla M, Teplan V, Haluzik M. Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end stage renal disease. *Nutrition*, 2009 – v tisku, IF 2,1

2. Další publikace v impaktovaných časopisech:

Hovorka R, Kremen J, Blaha J, Matias M, Anderlova K, Bosanska L, Roubicek T, Wilinska ME, Chassin LJ, Svacina S, Haluzik M. Blood glucose control by a model predictive control algorithm with variable sampling rate vs. a routine glucose management protocol in cardiac surgery patients: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2007, 92, 8: 2960-4. – IF 5,49

Haluzikova D, Dostalova I, Kavalkova P, Roubicek T, Mraz M, Papezova H, Haluzik M. Serum concentrations of adipocyte fatty acid binding protein in patients with anorexia nervosa. *Physiol Res.* 2008 Jul 25. - v tisku. - IF 1,5

3. Publikace v časopisech bez impakt faktoru se vztahem k tématu práce:

Roubíček T, Křemen J, Bošanská L, Svačina Š, Haluzík M. Hyperglykémie a inzulinorezistence u kriticky nemocných: příčiny, důsledky a možnosti léčebného ovlivnění – review. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa.* 2007, 10, 3: 27-33.

Roubíček T, Křemen J, Bláha J, Matias M, Kopecký P, Rulíšek J, Anderlová K, Bošanská L, Mráz M, Chassin LJ, Hovorka R, Svačina Š, Haluzík M. Pilot study to evaluate blood glucose control by a model predictive control algorithm with variable sampling rate vs. routine glucose management protocol in peri- and postoperative period in cardiac surgery patients. *Čas Lék Česk.* 2007; 146 (11): 868-73.

4. Další publikace:

Haluzíková D, Roubíček T, Haluzík M. Adiponectin and atherosclerosis. *Vnitř Lék.* 2007; 53 (4): 359-63.

Lacinová Z, Michalský D, Kasalický M, Dolinková M, Haluzíková D, Roubíček T, Krajíčková J, Mráz M, Matoulek M, Haluzík M. The influence of obesity on the gene expression of adiponectin and its receptor in subcutaneous adipose tissue. *Vnitř Lék.* 2007; 53 (11): 1190-7.

Bošanská L, Lacinová Z, Roubíček T, Mráz M, Bártlová M, Doležalová R, Housová J, Křemen J, Haluzíková D, Matoušek M, Haluzík M. The influence of very-low-calorie diet on soluble adhesion molecules and their gene expression in adipose tissue of obese women. *Čas Lék Česk.* 2008; 147 (1): 32-7.

Křemen J, Bláha J, Kopecký P, Bošanská L, Kotrlíková E, Roubíček T, Anderlová K, Svačina S, Matias M, Rulíšek J, Hovorka R, Haluzík M. The treatment of hyperglycaemia in critically ill patients: comparison of standard protocol and computer algorithm. *Vnitř Lék.* 2007; 53 (12): 1269-73.

5. Abstrakta se vztahem k tématu práce:

Roubíček T, Křemen J, Bláha J, Dolinková M, Bošanská L, Svačina Š, Haluzík M. Zvýšená produkce angiotensinogenu v epikardiální tukové tkáni při kardiologickém zákroku: možný vliv na pooperační inzulinovou rezistenci. In: Sborník. ČR, Praha, 2007, s. 47, 8. studentská vědecká konference. ČR, Praha, 22.5.2007.

Roubíček T, Křemen J, Bláha J, Dolinková M, Bošanská L, Svačina Š, Haluzík M. Zvýšená produkce angiotensinogenu v epikardiální tukové tkáni při kardiologickém zákroku: možný vliv na pooperační inzulinovou rezistenci. In: *Vnitř Lék.* 2007, 53 (5), 597. Dny mladých internistů. ČR, Olomouc, 31.5.-1.6.2007.

Roubíček T, Křemen J, Bláha J, Dolinková M, Bošanská L, Svačina Š, Haluzík M. Zvýšená produkce angiotensinogenu v epikardiální tukové tkáni při kardiologickém zákroku: možný vliv na pooperační inzulinovou rezistenci. In: *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa.* 2008. 44. Diabetologické dny. ČR, Luhačovice, 17.-19.4.2008.

6. Další abstrakta:

Roubíček T, Křemen J, Bláha J, Matias M, Kopecký P, Rulíšek J, Anderlová K, Bošanská L, Chassis LJ, Hovorka R, Svačina Š, Haluzík M. Srovnání počítačového algoritmu s variabilním intervalem měření glykémie a standardního protokolu pro intenzivní inzulinovou terapii v peri a pooperačním období u kardiologických pacientů. In: *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa.* 2007, 10, 1, 44-45. 43. Diabetologické dny. ČR, Luhačovice, 19.-21.4.2007.

Bošanská L, Lacinová Z, Doležalová R, Dolinková M, Mráz M, Roubíček T, Křemen J, Haluzíková D, Matoušek M, Haluzík M. Vliv nízkokalorické diety na sérové koncentrace a expresi cytoadhezivních molekul v tukové tkáni u obézních žen. In: *Vnitř Lék.* 2007, 53 (5), 602. Dny mladých internistů. ČR, Olomouc, 31.5.-1.6.2007.

Bošanská L, Lacinová Z, Doležalová R, Dolinková M, Mráz M, Roubíček T, Křemen J, Haluzíková D, Matoušek M, Haluzík M. Vliv nízkokalorické diety na sérové koncentrace a expresi cytoadhezivních molekul v tukové tkáni u obézních

žen. In: Sborník. ČR, Praha, 2007, 36, 8. studentská vědecká konference. ČR, Praha, 22.5.2007.

Mráz M, Křemen J, Bláha J, Matias M, Kopecký P, Rulíšek J, Kotlíková E, Roubíček T, Bošanská L, Svačina Š, Hovorka R, Haluzík M. Srovnání počítačového algoritmu s variabilním intervalem pro měření glykémie a standardního protokolu pro intenzivní inzulinovou terapii u kriticky nemocných pacientů. . In: Vnitř Lék. 2007, 53 (5), 606. Dny mladých internistů. ČR, Olomouc, 31.5.-1.6.2007.

Mráz M, Křemen J, Bláha J, Matias M, Kopecký P, Rulíšek J, Kotlíková E, Roubíček T, Bošanská L, Svačina Š, Hovorka R, Haluzík M. Srovnání počítačového algoritmu s variabilním intervalem pro měření glykémie a standardního protokolu pro intenzivní inzulinovou terapii u kriticky nemocných pacientů. . In: Sborník. ČR, Praha, 2007, 46, 8. studentská vědecká konference. ČR, Praha, 22.5.2007.

Křemen J, Bláha J, Matias M, Mráz M, Bošanská L, Roubíček T, Chassis L, Hovorka R, Svačina Š, Haluzík M. Randomized controlled trial comparing blood glucose control using model predictive control algorithm with variable sampling rate (eMPC) vs. standard glucose management protocol in cardiac surgery patients during peri- and postoperative period. European society of intensive care medicine, 7.-10.10.2007, Berlin, Germany. Intensive Care Medicine 2007, 33, Suppl. 2 / S52.

Křemen J, Bláha J, Matias M, Bošanská L, Roubíček T, Kotlíková E, Svačina Š, Hovorka R, Haluzík M. Comparison of arterial and interstitial glucose concentrations in critically ill patients. ESPEN 8.-11.9.2007, Praha.

Haluzík M, Bošanská L, Haluzíková D, Doležalová R, Roubíček T, Mráz M, Dolínková M, Matoušek M, Lacinová Z. The influence of very low calorie diet on serum concentrations and subcutaneous mRNA expression of endothelial cell adhesion molecules in obese, insulin-resistant women. 43rd EASD Annual Meeting, 17.-21.9.2007, Amsterdam.

Haluzík M, Křemen J, Bláha J, Matias M, Kopecký P, Rulíšek J, Bošanská L, Roubíček T, Anderlová K, Chassin LJ, Hovorka R, Svačina Š. Randomized controlled trial to evaluate blood glucose control by the model predictive control algorithm with variable sampling rate (eMPC) vs. routine glucose management protocol in peri- and postoperative period in cardiac surgery patients. 67th ADA Annual Scientific Sessions, 22.-26.6.2007, Chicago, USA. Diabetes 2007; 56 suppl. 1: A66.

Haluzík M, Haluzíková D, Doležalová R, Roubíček T, Bošanská L, Mráz M, Dolínková M, Matoušek M, Lacinová Z. The influence of very low calorie diet on serum concentrations and subcutaneous fat mRNA expression of endothelial cell adhesion molecules in obese, insulin resistant women. 5th World Congress on Insulin Resistance Syndrome, Boston, USA, 2007.

Bošanská L, Michalský D, Kasalický M, Haluzíková D, Roubíček T, Mráz M, Bártlová M, Jahodová J, Pavlovičová R, Matoušek M, Lacinová Z, Haluzík M. Zvýšená produkce cytoadhezivních molekul v tukové tkáni obézních jedinců: srovnání subkutánní a viscerální tukové tkáně. In: Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa. 2008 44. Diabetologické dny. ČR, Luhačovice, 17.-19.4.2008.

Mráz M, Kopecký P, Bláha J, Bártlová M, Křemen J, Bošanská L, Roubíček T, Svačina Š, Haluzík M. První zkušenosti s využitím kontinuální monitorace glykémie na jednotce intenzivní péče. In: Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa. 2008 44. Diabetologické dny. ČR, Luhačovice, 17.-19.4.2008.

Haluzík M, Michalský D, Kasalický M, Bošanská L, Roubíček T, Mráz M, Bártlová M, Haluzíková D, Pavlovičová R, Čechová M, Lacinová Z. Adipose tissue as a source of proinflammatory factors in obesity: the importance in the development of insulin resistance and diabetes. In: Biologically Active Peptide. 2007, 49-52. Biologically Active Peptide – 10. Konference. ČR, Praha, 11.-13.4.2007.

Haluzík M, Lacinová Z, Michalský D, Kasalický M, Bártlová M, Haluzíková D, Kaválková P, Bošanská L, Roubíček T, Matoušek M. Tuková tkáň a produkce cytoadhezivních molekul: vliv obezity a typu tukové tkáně. In: Sborník abstraktů. ČR, Plzeň, 2007, 27-27. Obezitologie 2007. ČR, Plzeň, 18.-20.10.2007.

7. Monografie:

Roubíček T et al. Hyperglykémie a její normalizace intenzifikovanou inzulínovou terapií u kriticky nemocných pacientů. – In: Haluzík M et al. Trendy soudobé diabetologie. Svazek 12, s. 11-30, Galén, Praha, 2008.

13 Příloha – Plná znění vybraných článků se vztahem k tématu práce